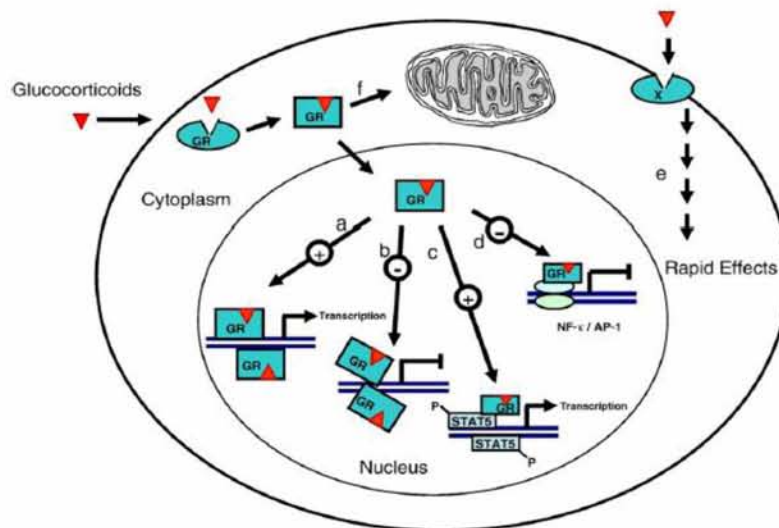




Διερεύνηση των βιοχημικών μηχανισμών
δράσης του τριτερπενοειδούς echinocystic
acid και του 3-O γλυκοσιδίου αυτού μέσω του
υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε
καρκινικά κύτταρα HeLa



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

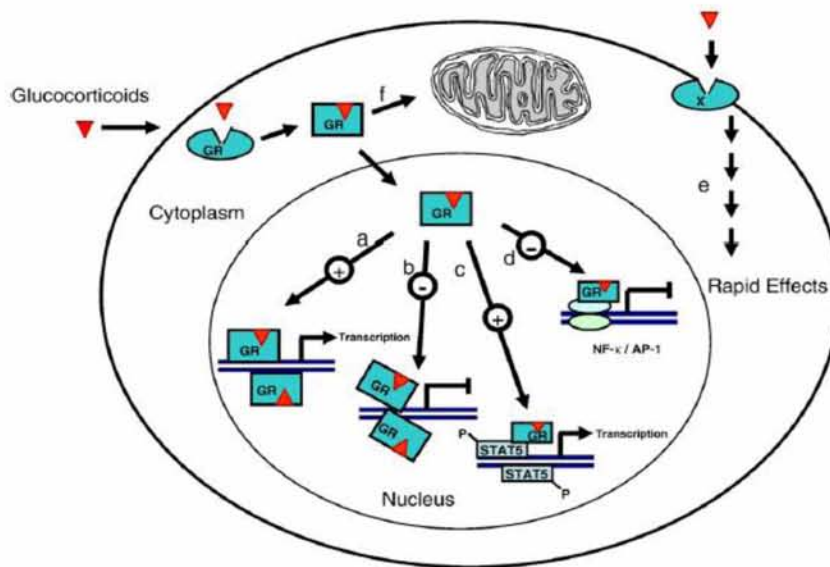
ΓΕΩΡΓΑΤΖΑ Θ. ΔΗΜΗΤΡΑ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ψαρρά Γ. Άννα-Μαρία

ΛΑΡΙΣΑ 2015



Investigation of the biochemical mechanisms of action of triterpenoid echinocystic acid and 3-O glucoside of echinocystic acid through glucocorticoid receptor signaling in HeLa cancer cells



DIPLOMA PROJECT

GEORGATZA TH. DIMITRA

Supervisor: Psarra G. Anna-Maria

Larissa 2015

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εγκρίθηκε ομόφωνα από την Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε από τη Γενική Συνέλευση Ειδικής Σύνοψης (ΓΣΕΣ) του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Π.Θ.) στην υπ' αριθμό συνεδρίασή του, με αριθμό πρωτοκόλλου #....., σύμφωνα με τον Εσωτερικό Κανονισμό Λειτουργίας του Προγράμματος Προπτυχιακών Σπουδών του ΤΒΒ.

Εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του ΤΒΒ του Π.Θ. (Λάρισα, 2015) στα πλαίσια της μερικής εκπλήρωσης των απαιτήσεων για την απόκτηση προπτυχιακού τίτλου σπουδών, όπως προβλέπεται από το Πρόγραμμα Προπτυχιακών Σπουδών του ΤΒΒ. Έγινε υπό την επίβλεψη της επίκουρου καθηγήτριας δρ. Α.-Μ. Γ. Ψαρρά, κατά το θερινό εξάμηνο του έτους 2015 και αποτελεί ένα μέρος της έρευνας που πραγματοποιείται στο χώρο του εργαστηρίου του Τμήματος. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Κώδικα Δεοντολογίας Ερευνών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

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

Λεωνίδας Δ. Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΤΒΒ, Π.Θ.

Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας, ΤΒΒ, ΠΘ

Φωτογραφία εξωφύλλου

Psarra AM, Sekeris CE (2008). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta* 1783(1):1-11.

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους αποτέλεσαν πολύτιμους αρωγούς σε αυτή μου την προσπάθεια. Αρχικά, λοιπόν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμότατα την τριμελή μου επιτροπή και ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της ομάδας της με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, για τις πολύτιμες συμβουλές και τη συνεχή καθοδήγησή της αλλά κυρίως για την εμπιστοσύνη και τη στήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή δρ. Λεωνίδα Δημήτριο και τη λέκτορα δρ. Σκαμνάκη Βασιλική για την αποδοχή τους να αποτελέσουν μέρος της συγκεκριμένης πειραματικής πτυχιακής εργασίας. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον υποψήφιο διδάκτορα του τμήματος, Γοργογιέτα Βύρωνα, και την απόφοιτο φοιτήτρια μεταπτυχιακών σπουδών, Κυλινδρή Παρασκευή για την πολύτιμη βοήθειά τους, τις χρήσιμες συμβουλές τους, τη στήριξη και τις επικοινωνητικές συζητήσεις μας, που συνέβαλαν καθοριστικά στην υλοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας. Δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω τα μέλη της ομάδας της κας Ψαρρά αλλά και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την όμορφη συνεργασία μας όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Κλείνοντας, θα ήθελα να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους και την οικογένεια μου για την αέναη υποστήριξη και συμπαράσταση κατά τη διάρκεια των σπουδών μου στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1 Στεροειδείς ορμόνες	13
1.2 Τα γλυκοκορτικοειδή	14
1.2.1 Γενικές πληροφορίες	14
1.2.2 Η δομή των γλυκοκορτικοειδών ορμονών	15
1.2.3 Γλυκοκορτικοειδή και κιρκάδιοι ρυθμοί.....	17
1.2.4 Βιολογικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών	19
1.2.5 Παρενέργειες της για θεραπευτικούς σκοπούς χορήγησης των γλυκοκορτικοειδών.....	22
1.2.6 Επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs).....	24
1.3 Πυρηνικοί υποδοχείς.....	27
1.4 Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών.....	27
1.4.1 Γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών	28
1.4.2 Δομή της πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών	29
1.4.3 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών	31
1.4.3.1 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα.....	32
1.4.3.1.1 Η κύρια ισομορφή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών: GRα	33
1.4.3.1.2 Ο GRβ ως προϊόν εναλλακτικού ματίσματος.....	34
1.4.3.1.3 Ο GRγ ως προϊόν εναλλακτικού ματίσματος.....	36
1.4.3.1.4 Οι GR-A και GR-P ως προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος ..	37
1.4.3.2 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από εναλλακτική θέση έναρξης της μετάφρασης	37

1.4.3.3	Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις	40
1.5	Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών	43
1.5.1	Γενωμική δράση	44
1.5.2	Μη γενωμική δράση	53
1.5.3	Μιτοχονδριακή δράση	54
1.6	Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών και μιτοχόνδρια	55
1.6.1	Ρόλος μιτοχονδρίων	55
1.6.2	Ρόλος του GR στα μιτοχόνδρια	56
1.6.2.1	Ρόλος του GR στην απόπτωση	57
1.7	Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών και γλυκονεογένεση	64
1.7.1	Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών στη ρύθμιση της γλυκονεογένεσης	64
1.7.2	Η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK)	66
1.8	Τα τριτερπένια	67
1.8.1	Γενικές πληροφορίες	67
1.8.2	Τα τριτερπενοειδή ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί παράγοντες	69
1.8.3	Το echinocystic acid και το 3-O γλυκοσίδιο αυτού	70
2.	ΣΚΟΠΟΣ	72
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	73
3.1	ΥΛΙΚΑ	73
3.1.1	Αντιδραστήρια	73
3.1.1.1	Χημικά	73
3.1.1.2	Θρεπτικά υλικά	74
3.1.1.3	Αντισώματα	74
3.1.1.4	Βακτηριακά στελέχη	75
3.1.1.5	Πλασμιδιακοί φορείς	75
3.1.1.6	Διαλύματα	75

3.1.2 Οργανολογία.....	78
3.1.2.1 Αναλώσιμα.....	79
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	79
3.2.1 Διαχείριση Κυτταροκαλλιιεργειών.....	79
3.2.1.1 Καρκινική κυτταρική σειρά HeLa	80
3.2.1.2 Απόψυξη κυττάρων.....	81
3.2.1.3 Καλλιέργεια κυττάρων HeLa.....	82
3.2.1.4 Θρυψινοποίηση κυττάρων	83
3.2.1.5 Ψύξη κυττάρων.....	84
3.2.1.6 Μέτρηση και στρώσιμο κυττάρων.....	85
3.2.2 Western-Blot Analysis	86
3.2.2.1 Προετοιμασία των δειγμάτων	86
3.2.2.2 Συλλογή κυτταρικών εκχυλισμάτων για Western Blot.....	87
3.2.2.3 Λύση κυττάρων.....	87
3.2.2.4 Ομογενοποίηση κυττάρων (Sonication)	88
3.2.2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Bradford	88
3.2.2.6 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE	91
3.2.2.7 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	91
3.2.2.8 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting).....	95
3.2.2.9 Western Blot για PEPCCK, GR, Caspase 3, Caspase 9, Caspase 9 cleaved, Bcl-2, p65 (NF-κB) & β-actin	97
3.2.3 Κατεργασία με ενεργό άνθρακα για παρασκευή cis-FBS.....	99
3.2.4 Μετασηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων	99
3.2.5 Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (pDNA) από μετασηματισμένα βακτηριακά κύτταρα σε μεσαία κλίμακα (midi prep).....	100
3.2.6 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων (Transfection)	100

3.2.6.1 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40-βGal & pMMTV-GRE-Luc	101
3.2.6.2 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40-βGal & p-NF-κB-Luc.....	105
3.2.6.3 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40-βGal, p-NF-κB-Luc, pEGFPC ₂ & pEGFPC ₂ -GR	106
3.2.7 Πρωτόκολλο λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης.....	110
3.2.7.1 Δοκιμασία λουσιφεράσης	110
3.2.7.2 Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης	112
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	113
4.1 Διερεύνηση της επίδρασης των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας και στα επίπεδα έκφρασης του GR	113
4.2 Διερεύνηση της επίδρασης των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στα επίπεδα έκφρασης της PERCK	116
4.3 Διερεύνηση της επίδρασης των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας και στα επίπεδα έκφρασης του NF-κB.....	118
4.4 Η επίδραση του GR στην επαγόμενη από τις ουσίες TFC 26 και TFC 27 καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB	120
4.5 Διερεύνηση της επίδρασης των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στη μιτοχονδριακά επαγόμενη απόπτωση.....	122
Συμπεράσματα.....	125
5. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	126
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	128

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) είναι στεροειδείς ορμόνες που ασκούν τη δράση τους μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor, GR). Ο GR είναι μέλος της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, ενεργοποιείται από τη δέσμευση της ορμόνης-προσδέτη και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας (transcription factor, TF) στον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια των κυττάρων, ελέγχοντας την έκφραση αρκετών γονιδίων-στόχων και συμμετέχοντας, έτσι, στη ρύθμιση ποικίλων βιολογικών διεργασιών. Μάλιστα, η κατανόηση του ακριβούς μηχανισμού δράσης των γλυκοκορτικοειδών έχει ιδιαίτερη βιοχημική σημασία, καθώς θα μπορούσε να οδηγήσει σε πιο στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις, αποκλείοντας τυχόν ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Τα GCs ρυθμίζουν πολλές και σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η κυτταρική ανάπτυξη, ο μεταβολισμός, η ανοσολογική απόκριση και η απόπτωση. Επιπλέον, λόγω της ισχυρής αντιφλεγμονώδους δράσης τους, τα GCs χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη φαρμακευτική για τη θεραπεία ασθενειών, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα ή χορηγούνται τοπικά σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως άσθμα, αλλεργική ρινίτιδα και δερματικές αλλεργίες. Ακόμα, συμβάλλουν στην αντιμετώπιση αυτοάνοσων διαταραχών και αιματολογικών καρκίνων. Ωστόσο, παρά την εξαιρετική αποτελεσματικότητά τους, η χρόνια χρήση τους προκαλεί δυσμενείς παρενέργειες, όπως διαβήτη, οστεοπόρωση, μυϊκή εξασθένηση, εμφάνιση καθυστερημένης ανάπτυξης στα παιδιά, ανακατανομή του λίπους, υπέρταση και επιβράδυνση στην επούλωση τραυμάτων.

Έτσι, προβάλλει επιτακτική η ανάγκη εύρεσης εκλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs), οι οποίοι θα ανοίξουν το δρόμο για νέες, πιο ασφαλείς θεραπείες, καθώς θα είναι το ίδιο αποτελεσματικοί με τα GCs, αλλά ταυτόχρονα θα παρουσιάζουν μειωμένες παρενέργειες. Τέτοιες ιδιότητες φαίνεται να έχουν ορισμένες φυτικής προέλευσης ουσίες, τα τριτερπένια, λόγω των δομικών ομοιοτήτων που παρουσιάζουν με τα GCs.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε εάν δύο τριτερπενοειδείς ενώσεις, το echinocystic acid και το 3-O-glycoside of echinocystic acid, ασκούν τη δράση τους, έστω και εν μέρει, μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Ορμώμενοι από πειράματα ανοσοϊστοχημείας που έδειξαν ότι οι ουσίες αυτές

επάγουν τη μετατόπιση του υποδοχέα στον πυρήνα, εκτελέστηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, από τα οποία προέκυψε ότι τα συγκεκριμένα τριτερπένια μειώνουν, σε συνδυασμό με την DEX, τα επίπεδα μορίων-στόχων του GR που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της γλυκόζης, όπως είναι η PEPCK, και στην απόπτωση, όπως είναι το αντιαποπτωτικό μόριο Bcl-2. Επίσης, σε συνδυασμό με την DEX, μειώνουν τα επίπεδα προκασπασών, όπως η προκασπάση 3 και η προκασπάση 9, υποδηλώνοντας την εμπλοκή τους σε μηχανισμούς μιτοχονδριακά επαγόμενης απόπτωσης. Επιπλέον, από δοκιμασίες λουσιφεράσης-γαλακτοσιδάσης έγινε φανερό ότι το echinocystic acid και το 3-O γλυκοσίδιο αυτού καταστέλλουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB ενώ τα επίπεδα του GR και το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές DEX ενισχύουν αυτή την ανοσοκατασταλτική τους δράση. Δοκιμασίες λουσιφεράσης έδειξαν, ακόμη, ότι τα συγκεκριμένα τριτερπένια δεν ενεργοποιούν, αντίθετα σε μικρό βαθμό καταστέλλουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR.

Επομένως, από τα αποτελέσματά μας αποδεικνύεται ότι τα τριτερπένια που μελετήσαμε αποτελούν ισχυρούς ρυθμιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με σημαντική αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση και γι' αυτό θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αρκετά αποτελεσματικά για θεραπευτικούς σκοπούς.

ABSTRACT

Glucocorticoids (GCs) are steroid hormones which exert their action via the glucocorticoid receptor (GR). GR is a member of the superfamily of nuclear receptors, activated by the binding of the hormone-ligand and acts as a transcription factor (TF) in the nucleus and mitochondria of cells, controlling the expression of several target genes and thus participating in the regulation of various biological processes. Indeed, an understanding of how GCs exert their action has particular biochemical importance, as it could lead to a more targeted therapeutic approaches, precluding any undesirable side effects.

GCs regulate many important cellular functions such as cell growth, metabolism, immune response and apoptosis. Moreover, because of their powerful anti-inflammatory action, GCs are widely used in pharmacy for the treatment of diseases, such as rheumatoid arthritis or they are topically administered to patients suffering from chronic inflammatory conditions such as asthma, allergic rhinitis and skin allergies. They also contribute to the treatment of autoimmune disorders and hematological cancers. However, despite their excellent efficacy, the chronic use of GCs causes adverse side effects such as diabetes, osteoporosis, muscle weakness, growth retardation in children, fat redistribution, hypertension and delayed wound healing.

Thus, there is an imperative need to find selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs), which will open the way for new, safer treatments, as they will be as effective as GCs, but they will have reduced side effects. Such properties seem to share some herbal substances, triterpenes, because of the structural similarities they have to GCs.

In this study it was investigated if two triterpenoid compounds, the echinocystic acid and 3-O-glycoside of echinocystic acid, exert their actions, even in part, through the glucocorticoid receptor. Driven by immunohistochemistry experiments that have shown that these substances induce GR translocation to the nucleus, Western Blot experiments were performed. These studies showed that these triterpenes, when administered with DEX, reduce the levels of GR target molecules involved in glucose metabolism, such as PEPCK, and apoptosis, such as the anti-apoptotic molecule Bcl-2. In combination with DEX, they also reduce procaspases' levels, such as procaspase 3 and procaspase 9, indicating their involvement in

regulation of mitochondrial induced apoptosis. Furthermore, luciferase-galactosidase assays revealed that echinocystic acid and 3-O glucoside of echinocystic acid, repress the transcriptional activity of NF- κ B, whereas the GR levels and the synthetic glucocorticoid DEX increase this immunosuppressive activity. Luciferase assays also showed that these triterpenes not only do not activate, but poorly repress the transcriptional activity of the GR.

Therefore, our results demonstrated that the triterpenes we studied are potent modulators of the glucocorticoid receptor with significant anti-inflammatory and anticancer activity and thus they could be used quite effectively for therapeutic purposes.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Στεροειδείς ορμόνες

Με βάση τη χημική τους σύσταση, οι ορμόνες μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις ομάδες: τα παράγωγα αμινοξέων, τις πεπτιδορμόνες, τα στεροειδή και τα παράγωγα λιπαρών οξέων (προσταγλαδίνες).

Οι στεροειδείς ορμόνες είναι λιπόφιλες ορμόνες που παράγονται από τη φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων, έχουν χρόνο ημιζωής μερικές ώρες και αποτελούν περίπου το 15% των ορμονών. Παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό, την αύξηση, την ανάπτυξη και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος [Psarra and Sekeris, 2007]. Σ' αυτές ανήκουν τα κορτικοστεροειδή, που περιλαμβάνουν τα αλατοκορτικοειδή και τα γλυκοκορτικοειδή, και τα σεξοτρόπα κορτικοειδή (γεννητικές ορμόνες), που περιλαμβάνουν τα ανδρογόνα, τα οιστρογόνα και την προγεστερόνη. Πρόδρομη ουσία όλων αυτών των ορμονών είναι η χοληστερόλη [Σμοκοβίτης, 2007].

Μετά την παραγωγή τους, που μπορεί να προκληθεί από ένα ερέθισμα, τα στεροειδή δεν αποθηκεύονται, αλλά εκκρίνονται αμέσως στο αίμα και μεταφέρονται μέσω πρωτεϊνών του πλάσματος στα κύτταρα-στόχους, όπου λόγω της υδροφοβικότητάς τους, διαπερνούν εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες με παθητική διάχυση. Μετά την είσοδό τους στο κύτταρο, οι στεροειδείς ορμόνες συνδέονται με τους υποδοχείς τους στο κυτταρόπλασμα και το σύμπλοκο στεροειδής ορμόνη-υποδοχέας ακολουθεί τη γενωμική οδό και εισέρχεται στον πυρήνα ή μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια. Και στις δύο περιπτώσεις, συνδέεται στο DNA και λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας, επηρεάζοντας τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Η άμεση σύνδεση του GR στο πυρηνικό DNA αποτελεί την κλασσική γενωμική οδό. Οι στεροειδείς ορμόνες, όμως, μπορούν να ακολουθήσουν και τη μη κλασσική γενωμική οδό, στην οποία το σύμπλοκο ορμόνη-υποδοχέας συνδέεται στο πυρηνικό DNA μέσω άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Οι εν λόγω επιδράσεις τους πραγματοποιούνται με πολύ γρήγορο ρυθμό, γεγονός που υποδεικνύει πως η ρύθμισή τους δεν υφίσταται σε μεταγραφικό επίπεδο, γι' αυτό και καλούνται «μη γενωμικές», ώστε να διακριθούν από τον κλασσικό γενωμικό τρόπο δράσης τους [Σμοκοβίτης, 2007].

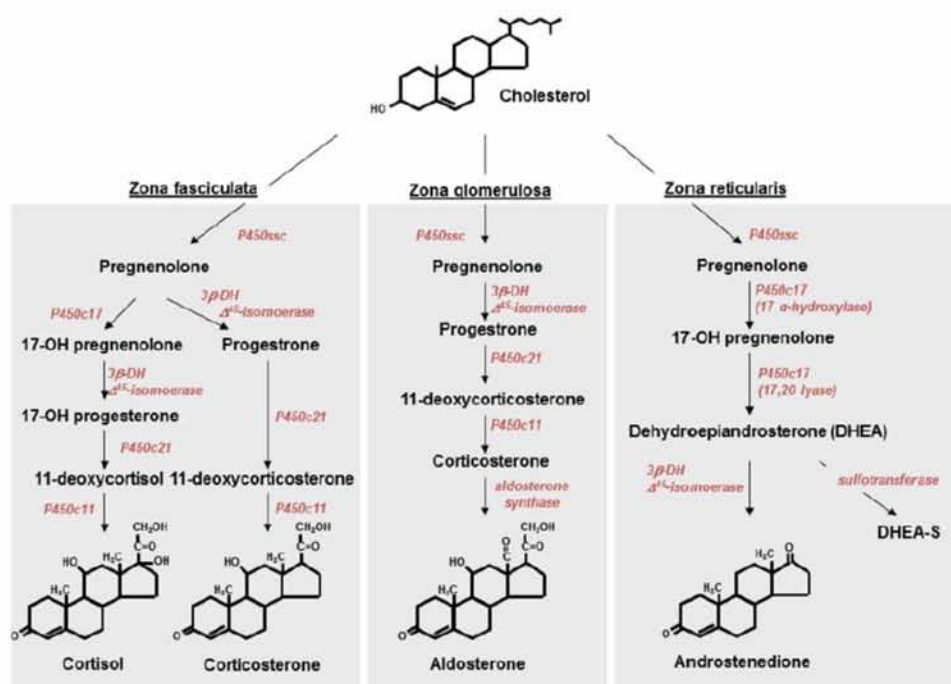
1.2 Τα γλυκοκορτικοειδή

1.2.1 Γενικές πληροφορίες

Οι γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες ανακαλύφθηκαν και πήραν το όνομά τους περί το 1930. Ο όρος «γλυκοκορτικοειδή» είναι σύνθετος: *απαρτίζεται από το πρώτο συνθετικό «γλυκο-», βάσει της παρατήρησης πως οι ουσίες αυτές διεγείρουν την ηπατική και τη νεφρική γλυκονεογένεση και από το δεύτερο συνθετικό «-κορτικοειδή», καθώς οι ορμόνες αυτές παράγονται στο φλοιό των επινεφριδίων [Long *et al.*, 1940].*

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs), με κυριότερους εκπροσώπους την κορτιζόλη, την κορτικοστερόνη και την κορτιζόνη, ανήκουν μαζί με τα αλατοκορτικοειδή και τις σεξοτρόπες κορτικοειδείς ορμόνες, στην οικογένεια των στεροειδών ορμονών και όπως είναι αναμενόμενο, μοιράζονται πολλές δομικές ομοιότητες, όπως είναι ο δακτύλιος του κυκλοπεντανοφαιναθρενίου [(Σμοκοβίτης, 2007); (Ortsäter H, 2012)].

Επιπλέον, σε ένα ζωντανό οργανισμό (*in vivo*), οι γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες, όπως και οι άλλες κατηγορίες των στεροειδών ορμονών, συντίθενται στον φλοιό των επινεφριδίων με πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη. Μέσα από μια σειρά αντιδράσεων, οι περισσότερες από τις οποίες καταλύονται από τα ένζυμα P450 του κυτοχρώματος, τα οποία κωδικοποιούνται από γονίδια, όπως το CYP11B1 (11-β-υδροξυλάση) [Nomura *et al.*, 1993], οι ορμόνες παραδίδονται στους ιστούς-στόχους με μεταφορικές πρωτεΐνες [McKay and Cidlowski, 2003] (Εικόνα 1.1).

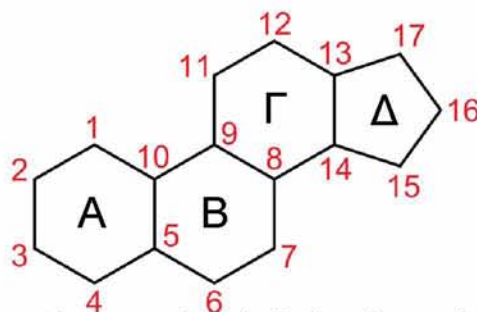


Εικόνα 1.1 Απεικόνιση της βιοσύνθεσης των στεροειδών ορμονών με πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη. Μέσω μίας σειράς ενζυμικών αντιδράσεων, η χοληστερόλη δίνει γένεση στα γλυκοκορτικοειδή, τα αλατοκορτικοειδή, τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα και την προγεστερόνη [Από Ortsäter *et al.*, 2012].

1.2.2 Η δομή των γλυκοκορτικοειδών ορμονών

Οι δομές των γλυκοκορτικοειδών ορμονών, όπως και όλων των στεροειδών ορμονών, βασίζονται σε ένα τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων (Εικόνα 1.2). Οι τέσσερις δακτύλιοι υποδηλώνονται ως Α, Β, Γ και Δ, αρχίζοντας από αριστερά, ενώ τα άτομα άνθρακα αριθμούνται ξεκινώντας από τον δακτύλιο Α. Οι τρεις εξαμελείς δακτύλιοι, Α, Β και Γ, υιοθετούν διαμορφώσεις τύπου ανάκλιντρου. Λόγω της δύσκαμπτης γεωμετρικής διάταξης των δακτυλίων αυτών, τα στεροειδή δεν υφίστανται τη συνηθισμένη αναστροφή δακτυλίων των κυκλοεξανίων.

Συνήθως φέρουν μία μεθυλική ομάδα στους άνθρακες C-10 και C-13 και μία αλκυλική πλευρική αλυσίδα στον άνθρακα C-17. Η περαιτέρω διαφοροποίησή τους επιτυγχάνεται από τη σύσταση των πλευρικών τους αλυσίδων, τον αριθμό των



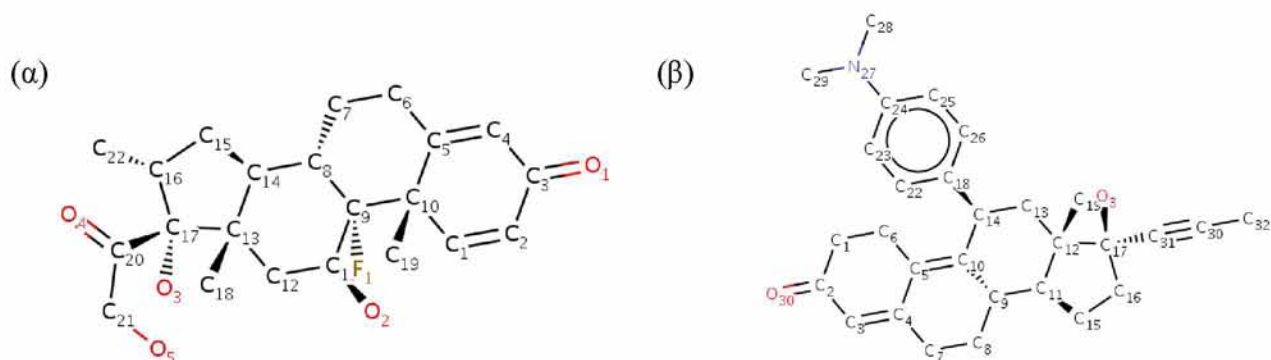
Εικόνα 1.2 Αναπαράσταση της βασικής δομής ενός κοινού στεροειδούς.

επιπρόσθετων μεθυλικών ομάδων και από τις λειτουργικές ομάδες που είναι προσδεδεδεμένες στους δακτυλίους.

Εκτός από τις γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες που έχουν απομονωθεί από φυσικές πηγές, χιλιάδες άλλες έχουν συντεθεί στα διάφορα φαρμακευτικά εργαστήρια, στα πλαίσια ερευνών για νέα φάρμακα. Η ερευνητική διαδικασία περιλαμβάνει συνήθως τροποποίηση της δομής του μορίου μιας φυσικής ορμόνης με χημικές μεθόδους και στη συνέχεια έλεγχο των βιολογικών ιδιοτήτων του τροποποιημένου γλυκοκορτικοειδούς.

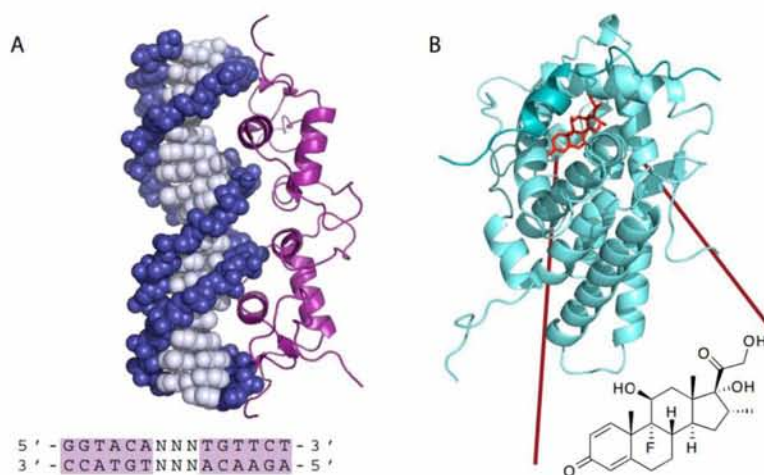
Στις πιο γνωστές συνθετικές μορφές γλυκοκορτικοειδών συγκαταλέγονται οι ενώσεις δεξαμεθαζόνη (Dexamethasone, DEX) και μifeπριστόνη (mifepristone ή

RU-486). Η ουσία DEX (Εικόνα 1.3α) είναι αγωνιστής του GR, με 25 φορές μεγαλύτερη συγγένεια για τον GR απ' ό τι η κορτιζόλη και χαρακτηρίζεται για τις ισχυρά αντι-φλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές της ιδιότητες. Η ουσία RU-486 (Εικόνα 1.3β) είναι μερικός ανταγωνιστής του GR και δρα ανασταλτικά στη δράση του.



Εικόνα 1.3 Αναπαράσταση των συνθετικών γλυκοκορτικοειδών (α) δεξαμεθαζόνη και (β) RU-486 ή μφεπριστόνη.

Με κρυσταλλογραφία ακτίνων X έχουν προσδιοριστεί οι δομές της περιοχής LBD του GR, συμπλοκοποιημένης με τον αγωνιστή δεξαμεθαζόνη (Εικόνα 1.4, B) [(Bledsoe *et al.*, 2002); (Kauppi *et al.*, 2003)] και με τον ανταγωνιστή RU-486 (Εικόνα 1.4, A) [Kauppi *et al.*, 2003]. Ανάλογη μελέτη πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας [Frego and Davidson, 2006].

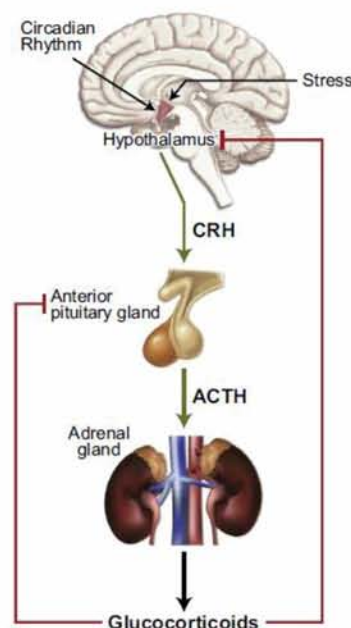


Εικόνα 1.4 Κρυσταλλογραφικές δομές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. **A)** Η περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα στο DNA (DBD) συνδεδεμένη στο DNA (PDB 1R4O) με τη συναινετική θέση DBD να προβλέπεται. **B)** Η περιοχή δέσμευσης του προσδέματος (LBD) συνδεδεμένη με δεξαμεθαζόνη (PDB 1M2Z).

1.2.3 Γλυκοκορτικοειδή και κιρκάδιο ρυθμοί

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι ορμόνες απαραίτητες για τη ζωή [Cole *et al.*, 1995], που συντίθενται και απελευθερώνονται από τη φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων. Η έκκρισή τους ρυθμίζεται από τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια (HPA axis) και τις αντίστοιχες ορμόνες αυτών και ακολουθεί έναν κιρκάδιο και παλμικό ρυθμό.

Εσωτερικά και εξωτερικά σήματα, όπως αιμορραγικές καταστάσεις, μεταβολές της θερμοκρασίας, τοξίνες, συγκινησιακές καταστάσεις, στρεσικοί παράγοντες και γενικά δυσμενείς για τον οργανισμό παράγοντες, διεγείρουν τον υποθάλαμο, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της απελευθερωτικής ορμόνης της επινεφριδιοφλοιοτρόπου ορμόνης ή κορτικοτροπίνης (corticotrophin-releasing hormone, CRH). Η CRH διεγείρει τη σύνθεση και έκκριση, από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, της επινεφριδιοφλοιοτρόπου ορμόνης ή κορτικοτροπίνης (adrenocorticotrophic hormone ή corticotrophin, ACTH), η οποία με τη σειρά της ελέγχει την παραγωγή και απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών από τη φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5 Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPAaxis). Η σύνθεση και η απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών υπόκειται σε κιρκάδια ρύθμιση από τον περικοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου. Η απελευθερωτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH), που εκκρίνεται από τον υποθάλαμο, διεγείρει την απελευθέρωση της επινεφριδιοφλοιστρόπου ορμόνης (ACTH) από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Με τη σειρά της, η ACTH επάγει την σύνθεση και έκκριση της κορτιζόλης από το φλοιό των επινεφριδίων στο αίμα. Η ομοιόσταση στα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών διατηρείται μέσω του βρόγχου αρνητικής ανατροφοδότησης, καταστέλλοντας την έκκριση της ACTH από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και της CRH από τον υποθάλαμο, όταν αυξηθεί η συγκέντρωση των γλυκοκορτικοειδών στο αίμα [Από Kadmiel and Cidlowski, 2013].

Ο άξονας HPA υπόκειται σε έναν έντονο μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης, καθώς αύξηση της συγκέντρωσης των γλυκοκορτικοειδών που εκκρίνονται από τη φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων, δρουν στον υποθάλαμο αναστέλλοντας την έκκριση της CRH, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει την έκκριση της ACTH. Τα αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών μπορούν, ακόμα, να δράσουν και απευθείας στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και να αναστείλουν την παραγωγή και έκκριση της ACTH, περιορίζοντας, έτσι, τόσο το μέγεθος, όσο και τη διάρκεια αύξησης των γλυκοκορτικοειδών. Επιπρόσθετα, μηχανισμός παλίνδρομης ρύθμισης λειτουργεί και ανάμεσα στην υπόφυση και τον υποθάλαμο, καθώς αύξηση στην παραγωγή της ACTH, έχει ως αποτέλεσμα αναστολή στην έκκριση της CRH από τον υποθάλαμο. Επομένως, από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν τόσο την έκκριση των CRH, ACTH όσο και τα επίπεδά τους, με ένα βρόγχο αρνητικής ανατροφοδότησης στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων.

Τα γλυκοκορτικοειδή, όπως αναφέρθηκε, παρουσιάζουν έναν κιρκάδιο και παλμικό ρυθμό έκκρισης. Ως κιρκάδιος ρυθμός (circadian rhythm) ορίζεται μια οποιαδήποτε βιολογική διαδικασία που παρουσιάζει ενδογενή περιοδική μεταβολή στη διάρκεια ενός 24ώρου. Έτσι, στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως επίσης και στους περισσότερους ζωικούς οργανισμούς, που είναι δραστήριοι κατά τη διάρκεια της ημέρας, η μέγιστη έκκριση γλυκοκορτικοειδών παρατηρείται τις πρώτες πρωινές ώρες, ενώ ακολουθεί σταδιακή μείωση των επιπέδων τους κατά τη διάρκεια της ημέρας, παρατηρώντας, εν τέλει, τα μικρότερα επίπεδα κατά τις απογευματινές-πρώτες βραδινές ώρες. Αντίθετα, σε νυχτόβια ζώα το μέγιστο της έκκρισης παρατηρείται κατά τη νύχτα. Επίσης, όσον αφορά τον παλμικό ρυθμό έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών, οι παλμοί εκκριτικής δραστηριότητας εμφανίζονται κάθε 60-90

λεπτά κατά τη διάρκεια της ημέρας, προκειμένου να μπορέσει ο οργανισμός να ανταπεξέλθει στις δραστηριότητές του. Μ' αυτόν τον τρόπο, αποκαλύπτεται ένα υπο-ημερήσιο μοτίβο έκκρισης γλυκοκορτικοειδών, το οποίο διαταράσσεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Κλασικό παράδειγμα διαταραχής αυτού του μοτίβου αποτελεί η φλεγμονή που σχετίζεται με χρόνια ενεργοποίηση του HPA άξονα. Παρά τις διαφορές, όμως, που παρουσιάζει στη συχνότητα και το εύρος των παλμών, το κirkάδιο μοτίβο έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών είναι εξελικτικά συντηρημένο στα θηλαστικά, αποδεικνύοντας πως αυτή η παλμικότητα είναι απαραίτητο στοιχείο στη GR σηματοδότηση.

Αυτό διαφαίνεται από το γεγονός πως, κατά τη διάρκεια της αύξησης των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών, παρατηρείται μετατόπιση του υποδοχέα στον πυρήνα, πρόσδεση στα αντίστοιχα γενωμικά στοιχεία κι έναρξη της μεταγραφής. Αντίθετα, όταν τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών μειωθούν, ο υποδοχέας αποδεσμεύεται από τα στοιχεία αυτά και μετατοπίζεται στο πυρηνόπλασμα, όπου αναμένει μία νέα αύξηση στα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών, προκειμένου να ξεκινήσει εκ νέου τη μεταγραφή [(Windle RJ, 1998); (Windle R.,2001)].

1.2.4 Βιολογικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ορμόνες, απαραίτητες για τη ζωή, οι οποίες μεσολαβούν και ρυθμίζουν πληθώρα φυσιολογικών διαδικασιών και ασκούν επιρροές σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια και συστήματα οργάνων, σε μια προσπάθεια να διατηρήσουν την ομοιόσταση στον οργανισμό των θηλαστικών [(Gupta and Lalchhandama, 2002); (Oakley and Cidlowski, 2013)].

Πρωταρχικός ρόλος των γλυκοκορτικοειδών αποτελεί η ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων. Συγκεκριμένα, αυξάνουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα, παρέχοντας, έτσι, στον εγκέφαλο τη δυνατότητα αναπλήρωσης του ενεργειακού του αποθέματος, καθώς η γλυκόζη αποτελεί τη βασική πηγή ενέργειας για αυτόν. Στο ήπαρ η κορτιζόλη αυξάνει τα επίπεδα της γλυκόζης, επάγοντας τόσο την εναπόθεση του γλυκογόνου [(Mersmann and Segal, 1969); (Stalmans and Laloux, 1979)], όσο και τη γλυκονεογένεση, μέσω αύξησης της ποσότητας και της ενεργότητας των ενζύμων που συμμετέχουν σ' αυτήν. Αντίθετα, στους σκελετικούς μύες και στο λιπώδη ιστό, η κορτιζόλη αναστέλλει την πρόσληψη και χρήση της

γλυκόζης, μέσω παρεμβολής στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης, καθώς ανταγωνίζεται τη δράση της. Επιπλέον, η ορμόνη αυτή προκαλεί χάλαση των μυών, αυξάνοντας τον καταβολισμό και επιβραδύνοντας τον αναβολισμό των πρωτεϊνών [You *et al.*, 2009], ενώ μειώνει τη σύνθεση των λιπαρών οξέων και κινητοποιεί τη διάσπαση των τριγλυκεριδίων στο λιπώδη ιστό [Macfarlane *et al.*, 2008], αυξάνοντας, έτσι, τη συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα. Τόσο η αυξημένη απελευθέρωση αμινοξέων που προκύπτει από τον καταβολισμό των πρωτεϊνών των μυών, όσο και η γλυκερόλη που προκύπτει από τη λιπόλυση, χρησιμοποιούνται από το ήπαρ ως υποστρώματα για τη γλυκονογένεση. Συν τις άλλους, η αυξημένη ταχύτητα του μεταβολισμού των πρωτεϊνών οδηγεί σε αυξημένη απέκκριση αζώτου και επαγωγή των ενζύμων του κύκλου της ουρίας [Σμοκοβίτης, 2007].

Εκτός από τις μεταβολικές τους δράσεις, τα γλυκοκορτικοειδή έχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του στρες [Sapolsky *et al.* 1986], μέσω του υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακού (HPA) άξονα. Αυτό συμβαίνει, καθώς ο HPA άξονας ενεργοποιείται σε καταστάσεις στρες και τα γλυκοκορτικοειδή, που είναι τα τελικά προϊόντα αυτού του άξονα, ελέγχουν την απόκριση στο στρες μέσω διάφορων βραχυπρόθεσμων και μακροπρόθεσμων προσαρμοστικών αλλαγών. Ειδικότερα, κατά τη διάρκεια της οξείας απόκρισης στο στρες, τα γλυκοκορτικοειδή προκαλούν βραχυπρόθεσμες προσαρμοστικές αλλαγές, όπως είναι η κινητοποίηση των ενεργειακών αποθεμάτων, ρυθμίζοντας το μεταβολισμό της γλυκόζης και της πίεσης του αίματος [Grünfeld and Eloy, 1987], ενώ ακόμα εμπλέκονται και σε μακροπρόθεσμες προσαρμοστικές αλλαγές, όπως είναι η διαμόρφωση και η ρύθμιση διάφορων φυσιολογικών διαδικασιών, με σημαντικότερη την ενεργοποίηση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος.

Επιπλέον, τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν την ανάπτυξη των οργάνων [Bolt *et al.*, 2001], την οστική αναρρόφηση [Reid, 1998], την καρδιαγγειακή λειτουργία [Walker, 2007], τη λειτουργία των νεφρών [Mangos *et al.*, 2003], την ωρίμανση των ιστών, τη διατήρηση της πίεσης του αίματος [Grünfeld, 1990], τις ανοσοαπαντήσεις [Morand and Leech, 1999], την ανάπτυξη του σκελετού, την αναπαραγωγή, τη γνωστική λειτουργία [(Barnes PJ, 1998); (Sapolsky *et al.*, 2000)] κ.ά..

Ένας, ακόμη, ιδιαίτερα σημαντικός ρόλος που διαδραματίζουν τα γλυκοκορτικοειδή είναι αυτός στη δυναμική διαμόρφωση των φλεγμονωδών και ανοσολογικών αποκρίσεων. Εξαιτίας, λοιπόν, αυτών των δυναμικών αντιφλεγμονωδών και ανοσοκατασταλτικών δράσεων, τα γλυκοκορτικοειδή είναι

σήμερα από τα πιο ευρέως συνταγογραφούμενα φάρμακα στον κόσμο [(Rhen and Cidlowski, 2005); (Busillo and Cidlowski, 2013)]. Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή είναι φάρμακα που μοιάζουν με τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή, αλλά διαφέρουν από αυτά στην ισχύ της δράσης τους και στην ικανότητά τους να μεταβολίζονται από τον οργανισμό, με πιο γνωστά την πρεδνιζόνη/πρεδνιζολόνη, τη δεξαμεθαζόνη και τη βουδεσονίδη. Επιπλέον, τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή, σε αντίθεση με τα φυσικά, αδυνατούν να συνδεθούν με την προσδεδεμένη με κορτικοστεροειδή σφαιρίνη του πλάσματος, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να ρυθμίσουν μόνα τους τα επίπεδα τους στον οργανισμό [Kadmiel and Cidlowski, 2013]. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα της δεξαμεθαζόνης, η οποία δεν επιδέχεται αδρανοποίηση από τον τύπο 2 της 11β-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης, αυξάνοντας, έτσι, την τοπική της διαθεσιμότητα [Weinstein R.S., 2012]. Συνεπώς, τα συνθετικά παράγωγα των γλυκοκορτικοειδών, αποτελούν περισσότερο από τον τελευταίο μισό αιώνα, τους στηλοβάτες στην κλινική πράξη της θεραπείας φλεγμονωδών ασθενειών, αυτοάνοσων διαταραχών και αιματολογικών καρκίνων [Oakley and Cidlowski, 2013].

Πιο αναλυτικά, τα γλυκοκορτικοειδή έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν το ανοσοποιητικό σύστημα, ελαττώνοντας την κυκλοφορία των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων αλλά και περιορίζοντας τη δραστηριότητα των Τ-βοηθητικών και Τ-κυτταροτοξικών κυττάρων. Το γεγονός αυτό βρίσκει εφαρμογή στις μεταμοσχεύσεις οργάνων, για την παρεμπόδιση της απόρριψης του μοσχεύματος [Σμοκοβίτης, 2007]. Ακόμα, τα γλυκοκορτικοειδή έχουν αξιοποιηθεί για τις αντι-πολλαπλασιαστικές και αντι-αγγειογενετικές δράσεις τους στη θεραπεία καρκίνων του λεμφοειδούς συστήματος [(Pirrotte *et al.*, 1997); (Sionov *et al.*, 2008)], όπως λευχαιμίες, λεμφώματα και μυελώματα [(Vilasco *et al.*, 2011); (Oakley and Cidlowski, 2013)], ενώ χρησιμοποιούνται σαν συν-φαρμακευτική αγωγή στη θεραπεία κακοηθών όγκων, λόγω της αποτελεσματικότητάς τους στην αντιμετώπιση των όγκων αυτών ή εξαιτίας της ελάττωσης του οιδήματος, του πόνου, της ανισορροπίας των ηλεκτρολυτών, της ναυτίας, της έμεσης και των κυτταροτοξικών αντιδράσεων που προκαλούνται από άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις [(Rutz, 2002); (Rutz & Herr, 2004)].

Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες που παρουσιάζουν είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη θεραπεία χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων, όπως είναι το άσθμα, οι δερματικές και οφθαλμολογικές μολύνσεις και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD) [Kadmiel and Cidlowski, 2013]. Επίσης, παίζουν σημαντικό

ρόλο και στη θεραπεία πληθώρας άλλων ασθενειών, όπως της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, των αλλεργιών, της ρευματικής καρδίτιδας, της σήψης, της ελκώδους κολίτιδας, της πολλαπλής σκλήρυνσης, καθώς και της ανεπάρκειας των επινεφριδίων [Oakley and Cidlowski, 2013].

1.2.5 Παρενέργειες της για θεραπευτικούς σκοπούς χορήγησης των γλυκοκορτικοειδών

Δυστυχώς, τα θεραπευτικά οφέλη των γλυκοκορτικοειδών περιορίζονται από ποικίλες παρενέργειες, οι οποίες αναπτύσσονται σε ασθενείς που λαμβάνουν χρόνια θεραπεία και σε μεγάλες δόσεις με αυτά τα στεροειδή [(Rhen and Cidlowski, 2005); (Miner *et al.*, 2005); (Schäcke *et al.*, 2007)].

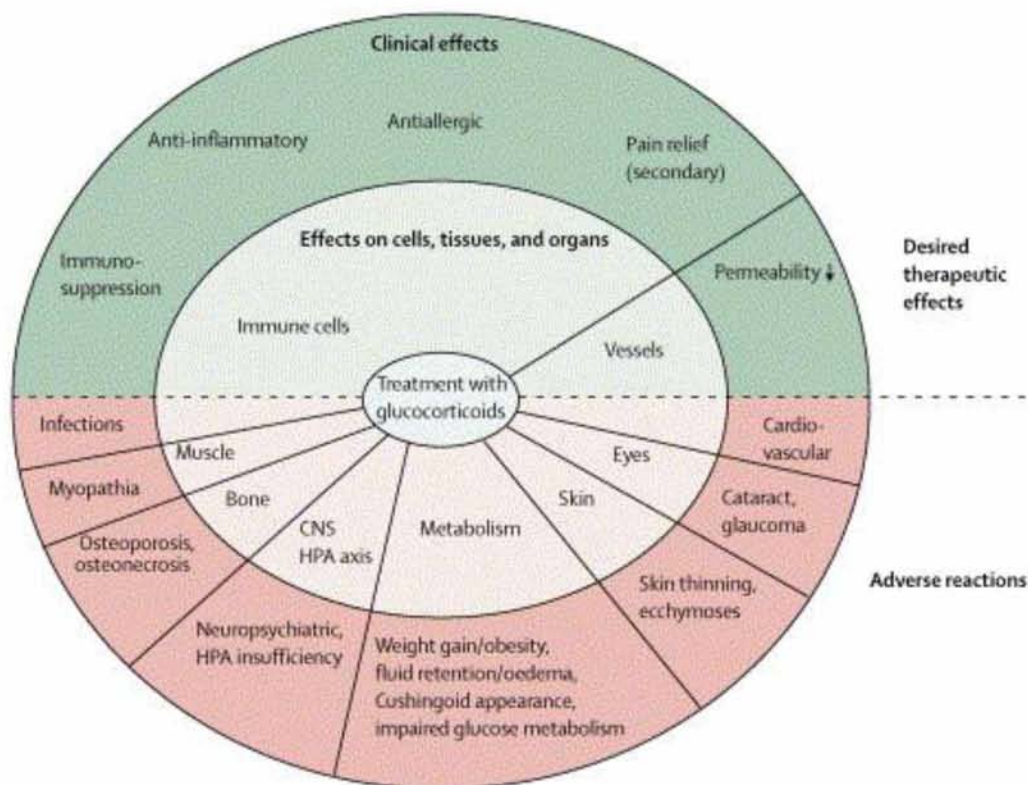
Οι κύριες παρενέργειες των γλυκοκορτικοειδών στον οργανισμό είναι καταβολικής φύσεως, όπως η αναδιαμόρφωση των ιστών, με χαρακτηριστικά παραδείγματα το εύθραυστο δέρμα [Schoepe *et al.*, 2006], την ατροφία [Oakley and Cidlowski, 2013] και τη φλεγμονή του δέρματος [Kleiman and Tuckermann, 2007]. Επιπρόσθετα, οι παρενέργειες των γλυκοκορτικοειδών εντοπίζονται και στα κόκκαλα, οδηγώντας σε οστεοπόρωση [Canalis and Delany, 2002], ενώ, ακόμα, παρατηρείται μυϊκή αδυναμία [Kleiman and Tuckermann, 2007] και καθυστέρηση της ανάπτυξης στα παιδιά [Oakley and Cidlowski, 2013]. Επιπλέον, οι δυσμενείς επιπτώσεις τους περιλαμβάνουν αντίσταση στην ινσουλίνη που οδηγεί σε διαβήτη [Kleiman and Tuckermann, 2007], ανακατανομή του λίπους [Peeke and Chrousos, 1995)], κοιλιακή παχυσαρκία, υπέρταση, γλαύκωμα και ιστοειδική αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή σε ασθενείς που λαμβάνουν μακροχρόνια θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή [Oakley and Cidlowski, 2013], καθώς, επίσης, οδηγεί και σε νευροεκφυλισμό ή καταστολή της νευρογένεσης στον εγκέφαλο [DeKloet *et al.*, 1998].

Ακόμα, από τις σημαντικότερες παρενέργειες των γλυκοκορτικοειδών είναι η μειωμένη αντίσταση του οργανισμού σε λοιμώδεις παράγοντες και η επιβράδυνση στην επούλωση τραυματισμένων ιστών, που προκύπτουν εξαιτίας της ικανότητας που έχουν τα γλυκοκορτικοειδή να καταστέλλουν το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.2.4. Τέλος, οποιαδήποτε αδυναμία ρύθμισης των επιπέδων των GCs από τον οργανισμό, όπως είναι η χρόνια αύξηση των επιπέδων λόγω υπερλειτουργίας της φλοιώδους μοίρας των επινεφριδίων ή η ανεπάρκεια λόγω

υπολειτουργίας της φλοιώδους μοίρας των επινεφριδίων, συνδέεται με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων, όπως το σύνδρομο Cushing και η νόσος του Addison αντίστοιχα [Σμοκοβίτης, 2007].

Από τις παραπάνω παρενέργειες, πολλές είναι σοβαρές και ορισμένες φορές μη αναστρέψιμες [(Schäcke *et al.*, 2002); (Miner *et al.*, 2005)] ενώ η συχνότητα εμφάνισής τους εξαρτάται από τη δραστικότητα του χορηγούμενου γλυκοκορτικοειδούς, την οδό χορήγησης, τις ενδείξεις που συνοδεύουν το χορηγούμενο γλυκοκορτικοειδές και το άτομο που λαμβάνει τη θεραπεία [Schäcke *et al.*, 2007].

Στη συνέχεια, παρατίθεται η εικόνα 1.6, όπου γίνεται ορατός ο ευεργετικός ρόλος των γλυκοκορτικοειδών αλλά και κάποιες από τις δυσμενείς συνέπειες που αυτά προκαλούν στον οργανισμό.



Εικόνα 1.6 Δράσεις και παράπλευρες αντιδράσεις χορήγησης γλυκοκορτικοειδών.

1.2.6 Επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs)

Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως ως αποτελεσματική θεραπεία της οξείας και χρόνιας φλεγμονής, καθώς, επίσης, και για την αντιμετώπιση πολυάριθμων αυτοάνοσων παθήσεων [Schäcke *et al.*, 2007]. Η κλινική χρήση τους χρονολογείται κοντά στα τέλη της δεκαετίας του 1940 και συγκεκριμένα το 1936, όταν έγινε για πρώτη φορά αντιληπτό πως μία ορμόνη των επινεφριδίων, η κορτιζόλη, είναι σε θέση να αντιστρέψει τα συμπτώματα και τις δυσλειτουργίες που προκαλεί η Νόσος του Addison. Αργότερα, κοντά στο 1949, έγιναν ανάλογες παρατηρήσεις από τον Philip Hench για τη δράση της ίδιας ορμόνης στη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας [Buttgereit, F., 2012], για το οποίο βραβεύτηκε αργότερα με Nobel [Baschant *et al.*, 2012]. Από τότε τα γλυκοκορτικοειδή έφεραν επανάσταση στο πεδίο της ιατρικής, καθώς αυτά τα δύο γεγονότα αποτέλεσαν αφετηρία, όχι μόνο για τη χρήση των GCs για θεραπευτικούς σκοπούς, αλλά και για τη σύνθεση νέων και πιο αποτελεσματικών ενώσεων, καθώς η συστηματική χρήση τους έχει συνδυαστεί με την εμφάνιση ανεπιθύμητων και πολλές φορές μη αναστρέψιμων επιδράσεων στον οργανισμό, όπως παρουσιάστηκε και στην ενότητα 1.2.5, με γνωστότερες την οστεοπόρωση, τον διαβήτη και το σύνδρομο Cushing.

Η τοπική χορήγηση γλυκοκορτικοειδών που δρουν τοπικά χρησιμοποιείται με επιτυχία για τη θεραπεία φλεγμονωδών αναπνευστικών και δερματικών ασθενειών, καθώς παρατηρούνται αισθητά λιγότερες κι ασθενέστερες παρενέργειες μετά τη χορήγηση. Παρ' όλα αυτά, η τοπική χρήση δεν αποτελεί λύση, εξαιτίας των τοπικών παρενεργειών που μπορεί να προκαλέσει (Πίνακας 1.1). Επιπλέον, σοβαρές παροξύνσεις της νόσου είναι αδύνατον να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά με ενώσεις που λειτουργούν μόνο σε τοπικό επίπεδο και συνεπώς η συστηματική αγωγή είναι υποχρεωτική, όπως για παράδειγμα σε περιπτώσεις σοβαρού άσθματος και δερματικών παθήσεων που φουσκαλιάζει το δέρμα και η τοπική χορήγηση γλυκοκορτικοειδών μετά από μακροχρόνια χρήση οδηγεί στην ανάπτυξη ατροφίας στο δέρμα [(Mills and Marks, 1993); (Hengge *et al.*, 2006)].

Πίνακας 1.1: Ορισμένες τυπικές παρενέργειες σε ασθενείς, στους οποίους χορηγήθηκαν γλυκοκορτικοειδή σε συγκεκριμένα όργανα/ιστούς [(Ortsäter H, 2012); (Schäcke, 2002)].

Ιστός/Όργανο	Δυσμενείς συνέπειες
Δέρμα	Ατροφία, καθυστέρηση στην επούλωση πληγών
Μύες/ Σκελετός	Οστεοπόρωση, μυϊκή ατροφία/ μυοπάθεια
Οφθαλμός	Γλαύκωμα, Καταρράκτης
Κεντρικό Νευρικό Σύστημα	Διαταραχή στη διάθεση, τη συμπεριφορά, τη μνήμη και τη γνωστική λειτουργία
Ενδοκρινικό Σύστημα/ Μεταβολισμός	Δυσλιπιδαιμία, ανοχή στην ινσουλίνη ή/ και δυσανεξία στη γλυκόζη, δυσλειτουργία των β-κυττάρων (ευπαθή άτομα)
Κυκλοφορικό Σύστημα	Υπέρταση
Ανοσοποιητικό Σύστημα	Αύξηση του κινδύνου λοιμώξεων, επαν-ενεργοποίηση ιών
Γαστρεντερικό Σύστημα	Πεπτικό έλκος, παγκρεατίτιδα

Έτσι, έγιναν εκτενείς προσπάθειες χημικής βελτιστοποίησης των ήδη υπαρχόντων ενώσεων, καθώς αρκετά από τα αποτελέσματα από θεραπείες, όπου χορηγούνται γλυκοκορτικοειδή, είναι πράγματι ανησυχητικά [(Belvisi *et al.*, 2001); (Miner, 2002); (Schäcke *et al.*, 2002)]. Οι προσπάθειες αυτές επικεντρώθηκαν σε δύο διαφορετικούς στόχους, στην βελτίωση της δραστηριότητας ή της βιοδιαθεσιμότητας της ένωσης. Ειδικά, το δεύτερο έγινε μέσω προσπάθειας εντοπισμού προ-φαρμάκων με βελτιωμένες φυσικοχημικές ιδιότητες από αυτές της τελικής δραστικής ένωσης. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) που μπορούσαν να αντικαταστήσουν τα γλυκοκορτικοειδή, ενώ σε άλλες περιπτώσεις η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή συνδυάστηκε με την οξεία θεραπεία των παρενεργειών που αυτά προκαλούν [Canalis and Delany, 2002]. Όμως, παρά τις προσπάθειες που κατεβλήθησαν, το πρόβλημα με την εμφάνιση σοβαρών παρενεργειών εξακολουθούσε να υπάρχει. Έτσι, σύντομα προέκυψε η ανάγκη εύρεσης ή σύνθεσης ενώσεων με ανάλογη αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική δράση, με αυτή των εμπορικά διαθέσιμων GCs, αλλά με σαφώς μειωμένο τον κίνδυνο εμφάνισης ανεπιθύμητων επιδράσεων στον οργανισμό [Schäcke H., 2007].

Ως εκ τούτου, τρεις κύριες προσεγγίσεις χρησιμοποιήθηκαν, είτε για τη δημιουργία νέων γλυκοκορτικοειδών είτε για την αντικατάσταση κάποιων υποομάδων στα ήδη υπάρχοντα GCs. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση σκευασμάτων που χρησιμοποιούνταν στη συστηματική κυκλοφορία, με απώτερο σκοπό μία στοχευμένη απελευθέρωση του φαρμάκου. Κλασικό παράδειγμα αυτής της περίπτωσης, αποτέλεσε ο σχηματισμός κάψουλας στεροειδών με τη βοήθεια λιποσωμάτων για τη θεραπεία της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Στην δεύτερη προσέγγιση, έγινε συνδυασμός μονοξειδίου του αζώτου (NO) με γνωστό στεροειδές-προσδέτη του GR, προκειμένου να ενισχυθούν οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της ουσίας, χωρίς, όμως, να αυξηθεί η χορηγούμενη δόση ή η ισχύς του στεροειδούς. Τέλος, μία από τις πλέον υποσχόμενες προσεγγίσεις των τελευταίων ετών αφορά τη βελτιστοποίηση των προσδετών του GR, με απώτερο σκοπό τη ρύθμιση της GR σηματοδότησης με πολύ ειδικό τρόπο. Αυτό θα οδηγήσει στην εμφάνιση επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (selective glucocorticoid receptor agonists, SEGRAs) [Schäcke H., 2007].

Τα SEGRAs βρίσκονται στο στάδιο της ανάπτυξης και πρόκειται για ουσίες που προκαλούν μια τέτοια διαμόρφωση του υποδοχέα, η οποία προτιμά την αλληλεπίδραση του συμπλόκου GR/SEGRA με πρωτεΐνες αντί με το DNA. Κατά συνέπεια, το πλεονέκτημα αυτών των καινοτόμων στεροειδών μορίων είναι ότι είναι ικανά να επάγουν τις διαδικασίες μετακαταστολής ή trans-καταστολής, οι οποίες θεωρείται ότι μεσολαβούν σε πολυάριθμα επιθυμητά αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτικά αποτελέσματα [Schäcke *et al.*, 2004], μέσω αρνητικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης προφλεγμονωδών γονιδίων [Schäcke *et al.*, 2007], ενώ η επαγωγή της μετενεργοποίησης ή trans-ενεργοποίησης, η οποία πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες από τις ανεπιθύμητες ενέργειες, μέσω της επαγωγής φλεγμονωδών γονιδίων, είναι αμελητέα [Schäcke *et al.*, 2002].

Συμπερασματικά, τα SEGRAs είναι πολύ πιθανό να βρεθούν σύντομα στη φάση των κλινικών δοκιμών ενώ η καλύτερη κατανόηση της ετερογένειας στις αποκρίσεις της GR σηματοδότησης σε υγιείς αλλά και ασθενείς ιστούς, θα βοηθήσει στην ανάπτυξη ασφαλέστερων και αποτελεσματικότερων θεραπειών με γλυκοκορτικοειδή με βελτιωμένες αναλογίες οφέλους/κινδύνου στον άνθρωπο [Oakley and Cidlowski, 2013]. Έτσι, η χρήση στο μέλλον εξειδικευμένων γλυκοκορτικοειδών για τη θεραπεία ασθενειών χωρίς ταυτόχρονες παρενέργειες, θα

φέρει επανάσταση στην ιατρική πράξη και για τον σκοπό αυτό απαιτούνται συνεχείς και ενδεδειγμένες μελέτες.

1.3 Πυρηνικοί Υποδοχείς

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

Στις πλείστες των περιπτώσεων, οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες ενεργοποιούνται από προσδέτες και μεταξύ άλλων, έχουν ενεργό ρόλο και στην αναδιάταξη της χρωματίνης. Μπορούν να λειτουργούν είτε μόνοι τους είτε σε συνεργασία με μόρια συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης γονιδίων, αντίστοιχα. Επιπλέον, υπάρχουν και πυρηνικοί υποδοχείς, των οποίων η μεταγραφική ενεργότητα δεν είναι προσδετο-εξαρτώμενη, αλλά ρυθμίζεται μετα-μεταφραστικά μέσω φωσφορυλίωσης ή ακετυλίωσης ή μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς [(Mangelsdorf and Evans, 1995); (Hermanson *et al.*, 2002)].

Η μελέτη τους είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση διάφορων βιολογικών λειτουργιών όπως η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, η αναπαραγωγή, ο μεταβολισμός και η ομοιόσταση [(Beato *et al.*, 1995); (Kastner *et al.*, 1995); (Chambon, 1996); (Aranda and Pascual, 2001); (Giguere, 1999)].

Στους NRs συγκαταλέγονται οι υποδοχείς των ορμονών του θυρεοειδούς, των στεροειδών ορμονών, των ρετινοειδών και της βιταμίνης D, καθώς επίσης και διάφοροι "ορφανοί" υποδοχείς [Aranda and Pascual, 2001]. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών είναι ένας καλά μελετημένος πυρηνικός υποδοχέας και ανήκει στην υποοικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων στεροειδών ορμονών.

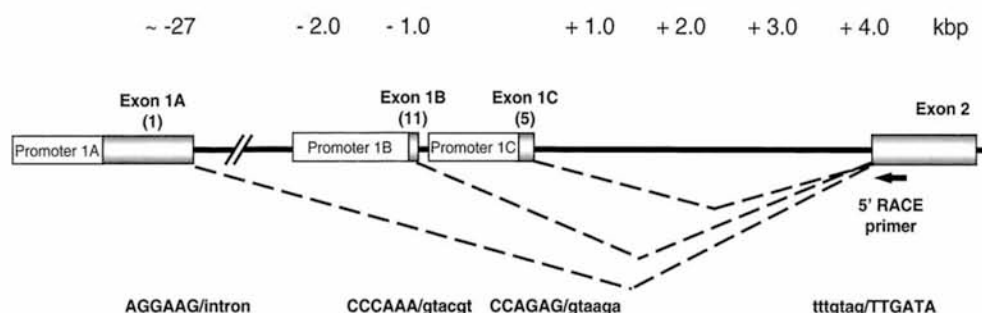
1.4 Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών

Τα γλυκοκορτικοειδή, είτε φυσικά είτε συνθετικά, ασκούν τις δράσεις τους μετά από πρόσδεση στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, τον GR. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων

και έχει διττό ρόλο. Ο πρώτος είναι αυτός του μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος ενεργοποιείται κατόπιν πρόσδεσης των γλυκοκορτικοειδών, προσδένεται στα λεγόμενα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs), τόσο στο πυρηνικό όσο και στο μεταγραφικό DNA, και ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση. Ο δεύτερος ρόλος που του έχει αποδοθεί είναι αυτός του ρυθμιστή άλλων παραγόντων μεταγραφής [(Ortsäter H, 2012); (Mangelsdorf, 1995);(Psarra AM, 2011)].

1.4.1 Γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Ο ανθρώπινος υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (hGR) αποτελεί προϊόν ενός μοναδικού γονιδίου, του NR3C1, το οποίο εδράζεται στο 5^ο χρωμόσωμα και συγκεκριμένα στην περιοχή 5q31-32 [(Kadmiel and Cidlowski, 2013); (Lu and Cidlowski, 2004)]. Το cDNA του κλωνοποιήθηκε το 1985 [(Gehring *et al.*, 1985); (Hollenberg *et al.*, 1985)] και μέχρι σήμερα έχει βρεθεί μόνο ένα γονίδιο για τον GR (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 Αναπαράσταση της δομής και της οργάνωσης του γονιδίου του GR [Από Breslin *et al.*, 2001].

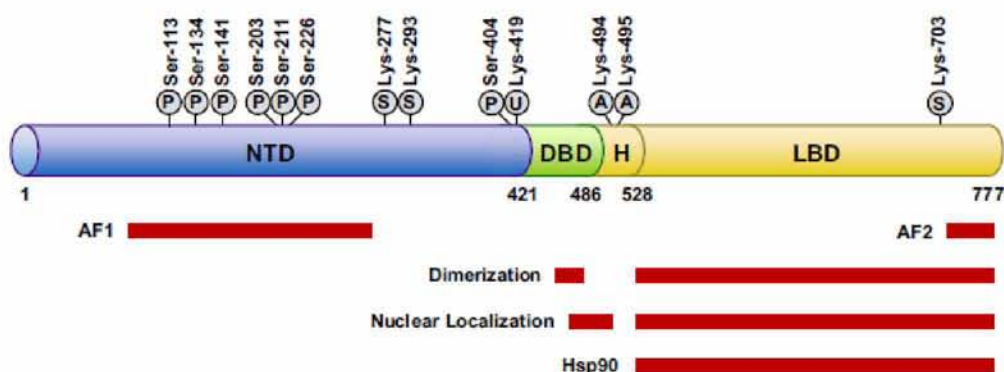
Η ανάλυση της γενωμικής δομής του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών αποκάλυψε την παρουσία 9 εξονίων, καλύπτοντας μια περιοχή 110 kb. Τα 184 nts του εξονίου 1 αντιπροσωπεύουν αποκλειστικά την 5'-αμετάφραστη περιοχή (5'UTR) ενώ η περιοχή του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη αντιστοιχεί στα εξόνια 2-9 [Kadmiel and Cidlowski, 2013]. Πιο συγκεκριμένα, το εξόνιο 2 (1197 bps) κωδικοποιεί το μεγαλύτερο μέρος του NH₂-τελικού άκρου (NTD) του υποδοχέα, συμπεριλαμβανομένης της ιδιόσυστατης AF-1 περιοχής που χρησιμεύει για trans-ενεργοποίηση.

Τα δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου που εμπλέκονται στην πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA κωδικοποιούνται χωριστά από το εξόνιο 3 (167 bps) και το εξόνιο 4 (117 bps). Πέντε εξόνια (εξόνια 5, 6, 7, 8, 9α ή 9β) μαζί κωδικοποιούν την περιοχή άρθρωσης (HR), την περιοχή δέσμευσης του προσδέματος (LBD) και την προσδετο-εξαρτώμενη περιοχή AF-2, καθώς επίσης και την 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'UTR) [Oakley and Cidlowski, 2013].

Η ανάλυση των υποκινητών του γονιδίου του GR αποκάλυψε μία σαφή έλλειψη ενός πλαισίου TATA και την παρουσία ενός μοτίβου CCAAT στην 5'-πλευρική περιοχή. Παράλληλα, έχουν προσδιοριστεί πολλαπλά GC πλαίσια, AP-1, AP-2, Sp1, στοιχεία αποκρινόμενα στο c-AMP (CRE), YinYang1 (YY1), NF-κB και διάφορες ιστοειδικές περιοχές σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Επομένως, επιβεβαιώνεται η άποψη ότι ο GR εκφράζεται μεν σταθερά σε κάθε κυτταρικό τύπο, αλλά με ένα ιστοειδικό πρότυπο.

1.4.2 Δομή της πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Ο GR είναι μία αρθρωτή πρωτεΐνη, η οποία όπως και κάθε μέλος της υπερκογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές (Εικόνα 1.8): μία N-τελική δομική περιοχή trans-ενεργοποίησης (N-terminal transactivation domain, NTD), μία κεντρική δομική περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain, DBD) και μία C-τελική δομική περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (ligand-binding domain, LBD) [Kumar and Thompson, 2005]. Μία εύκαμπτη περιοχή του μορίου, αποκαλούμενη ως περιοχή «άρθρωσης» (hinge region, HR), διαχωρίζει τις πρωτεϊνικές επικράτειες DBD και LBD.



Εικόνα 1.8 Η δομή της πρωτεΐνης του ανθρώπινου GR (hGR). Ο hGR είναι μία πρωτεΐνη αποτελούμενη από τις εξής διακριτές περιοχές: ένα αμινοτελικό άκρο (NTD), μία περιοχή πρόσδεσης

στο DNA (DBD), την περιοχή άρθρωσης (HR) και μία πρωτεϊνική επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (LBD). Επισημαίνονται, επίσης, οι περιοχές που σχετίζονται με τη μεταγραφική ενεργότητα (AF1 και AF2), καθώς και οι περιοχές που σχετίζονται με το διμερισμό, τον πυρηνικό εντοπισμό και τη δέσμευση της πρωτεΐνης συνοδού HSP90. Ακόμα, απεικονίζονται τα κατάλοιπα των αμινοξέων που υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι αριθμοί των θέσεων αναφέρονται στην πρωτεϊνική αλληλουχία του ανθρώπινου GR. [Από Oakley and Cidlowski, 2013].

Στο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα, στην NTD περιοχή, εμπεριέχεται η ανεξάρτητη από ορμόνη μεταγραφική λειτουργία ενεργοποίησης-1 (AF-1), η οποία σε πολλές περιπτώσεις δρα συνεργικά με την εξαρτώμενη από τον υποκαταστάτη AF-2 που βρίσκεται στην LBD. Η περιοχή αυτή αλληλεπιδρά με συν-ρυθμιστές και το βασικό μηχανισμό μεταγραφής ενώ περιέχει αρκετές θέσεις φωσφορυλίωσης και είναι ο στόχος ποικίλων κινασών σηματοδότησης, όπως είναι οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες (Cdk).

Η περιοχή DBD, που εντοπίζεται κεντρικά του υποδοχέα, είναι η πιο συντηρημένη περιοχή της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και διαθέτει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου, τα οποία αναγνωρίζουν και δένουν σε DNA αλληλουχίες-στόχους, τα λεγόμενα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid-responsive elements, GREs), αλληλεπιδρώντας με τη μεγάλη αύλακα της διπλής έλικας του DNA. Επιπλέον, στην κεντρική περιοχή βρίσκεται η περιοχή διμερισμού, η οποία σχηματίζει μία έλικα που αντιδρά με την αντίστοιχη περιοχή σε έναν ταυτόσημο υποδοχέα προκειμένου να επέλθει διμερισμός ενώστο μεταίχιμο της σύνδεσης των περιοχών DBD/hinge region βρίσκεται το πρώτο σήμα πυρηνικής τοποθέτησης (nuclear localization signal 1, NL1).

Η LBD στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα ξεκινά με την περιοχή αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat-shock proteins, HSP) και τελειώνει με μία δεύτερη λειτουργία ενεργοποίησης AF-2, η οποία αλληλεπιδρά με συν-ρυθμιστές κατά ένα προσδετο-εξαρτώμενο τρόπο, καθώς αλλάζει στην ενεργή του διαμόρφωση μετά τη δέσμευση του προσδέματος [Kleiman and Tuckermann, 2007]. Επιπλέον, η LBD αποτελείται από 12 α-έλικες και τέσσερα β-πτυχωτά φύλλα, δημιουργώντας ένα υδροφοβικό θυλάκιο για τη δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών. Η περιοχή αυτή περιέχει, επίσης, αλληλουχίες διμερισμού και το δεύτερο σήμα πυρηνικής μετατόπισης του υποδοχέα (NL2) [(Bledsoe *et al.*, 2002); (Oakley and Cidlowski, 2013)].

1.4.3 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

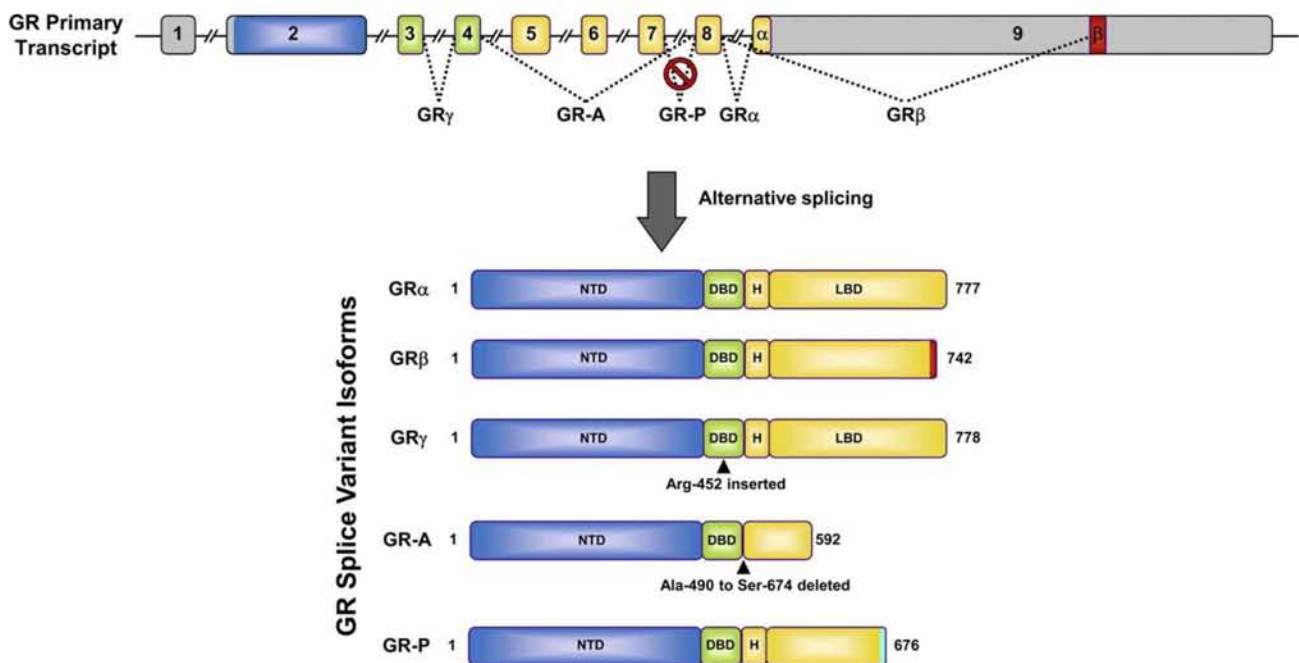
Οι περισσότερες λειτουργίες των γλυκοκορτικοειδών ορμονών πραγματοποιούνται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Η μεταγραφή του hGR βρίσκεται υπό τον έλεγχο τριών υποκινητών, πάνω στους οποίους εντοπίζονται θέσεις πρόσδεσης ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων. Το γονίδιο του GR κωδικοποιεί πρωταρχικά μία πρωτεΐνη μήκους 777 aa, ωστόσο είναι δυνατό να προκύπτουν λειτουργικά διακριτοί υπότυποι του GR, λόγω εναλλακτικού ματίσματος του αρχικού μεταγράφου ή εξαιτίας εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης του ώριμου mRNA. Επιπλέον, οι διάφορες ισομορφές του υποδοχέα μπορούν να επιδέχονται με τη σειρά τους ποικίλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες ρυθμίζουν περαιτέρω την ενεργότητα των υποδοχέων. Μέχρι σήμερα έχουν κλωνοποιηθεί δύο κύριοι υποδοχείς που δεσμεύουν κορτικοστεροειδή με υψηλή συγγένεια: ο MR ή ο τύπου I υποδοχέας κορτικοστεροειδών και ο GR ή ο τύπου II υποδοχέας κορτικοστεροειδών [(Reul and deKloet, 1985); (Edwards *et al.*, 1988); (Seckl and Walker, 2001)]. Στον τύπου II έχουν εντοπιστεί δύο κύριες ισομορφές, οι α και β, εκ των οποίων μονάχα ο GRα έχει γενωμική δράση, ενώ ο GRβ πιθανολογείται να ασκεί ανταγωνιστική δράση στον GRα μέσω της δημιουργίας ετεροδιμερών με τον GRα.

Το πρότυπο έκφρασης του GR δείχνει ότι ο υποδοχέας διανέμεται ευρέως σε όλα τα όργανα, αλλά είναι πιο επικρατής στο ήπαρ, στο νευρικό σύστημα και στους μυϊκούς ιστούς. Βέβαια, ανεξάρτητα από την ευρεία έκφραση του GR, η κυτταρική απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή είναι πολυσύνθετη και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες [Bamberger *et al.*, 1996].

Η ικανότητα του κυττάρου να δημιουργεί τόσες πολλές ισομορφές του GR, με την καθεμία να ελέγχει κατά εξειδικευμένο τρόπο διαφορετικές ομάδες γονιδίων ή/και να ρυθμίζει διαφορετικά κοινές ομάδες γονιδίων, προσδίδει τεράστιο δυναμικό για ποικίλη σηματοδότηση. Επιπλέον, η δυνατότητα των ισομορφών αυτών να ετεροδιμερίζονται μεταξύ τους και να επικοινωνούν με άλλα σηματοδοτικά μόρια συνεισφέρει περαιτέρω στις ιστο- και κυτταρο-ειδικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών.

1.4.3.1 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 1.4.1, το ανθρώπινο γονίδιο του GR εντοπίζεται στο 5^ο χρωμόσωμα και συγκεκριμένα στην περιοχή 5q31–32 και αποτελείται από 9 εξόνια. Εναλλακτικό μάτισμα στο 9^ο και τελευταίο εξόνιο, κοντά στο τέλος του πρωτογενούς μεταγράφου του hGR, οδηγεί στο σχηματισμό των δύο κύριων ισομορφών του υποδοχέα, των α (hGRα) και β (hGRβ) [(Bamberger *et al.*, 1995); (Oakley *et al.*, 1996)] (Εικόνα 1.9). Αυτές είναι πανομοιότυπες μέχρι το 727^ο αμινοξύ, όμως στη συνέχεια διαφοροποιούνται στο καρβοξυτελικό τους άκρο, με την α ισομορφή να αποκτά 50 επιπλέον αμινοξέα (MBhGRα=97kDa) και την β ισομορφή να αποκτά 15 πρόσθετα, μη ομόλογα αμινοξέα (MBhGRβ=94kDa) [Oakley and Cidlowski, 2013].



Εικόνα 1.9 Ισομορφές του GR που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα.

Το κύριο μετάγραφο του ανθρώπινου GR αποτελείται από συνολικά 9 εξόνια, με το εξόνιο 2 να κωδικοποιεί τις αμινοτελικές περιοχές (NTD), τα εξόνια 3 και 4 να κωδικοποιούν την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) και τα εξόνια 5-9 να κωδικοποιούν την περιοχή άρθρωσης (H) και την περιοχή σύνδεσης προσδέτη (LBD).

Η κλασική πρωτεΐνη GRα προκύπτει από το μάτισμα του εξονίου 8 στην αρχή του εξονίου 9.

Ο GRβ προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα, όπου το τελικό τμήμα του εξονίου 8 συρράπτεται με καθοδικές αλληλουχίες του εξονίου 9 και έτσι προκύπτει ένα εναλλακτικό μετάγραφο που διαθέτει μια μοναδική περιοχή 15 αμινοξέων στο C-τελικό του άκρο (θέσεις 728-742).

Οι ειδικές αλληλουχίες για τον GRα (αμινοξέα 726-777) κωδικοποιούν για τις έλικες 11 και 12 του LBD, μία κρίσιμη περιοχή όχι μόνο για τη δέσμευση γλυκοκορτικοειδών, αλλά και για τη στρατολόγηση συν-ρυθμιστών στην περιοχή AF2.

Ο GR γ προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα στην αλληλουχία του εσωνίου που διαχωρίζει τα εξόνια 3 και 4, έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας πρωτεΐνης που χαρακτηρίζεται από μια ένθεση αμινοξέος αργινίνης (Arg452) ανάμεσα στους δύο δάκτυλους ψευδαργύρου της περιοχής DBD.

Ο GR-A παράγεται από ένα εναλλακτικό μάτισμα που συρράπτει το εξόνιο 4 με το εξόνιο 8, διαγράφοντας περίπου 185 αμινοξέα της περιοχής LBD (Ala490-Ser674) που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 5-7.

ΟGR- ρ προκύπτει μετά από ένα μη επιτυχημένο μάτισμα του εξονίου 7 στο εξόνιο 8. Οι ιντρονικές αλληλουχίες που παραμένουν εισαγάγουν ένα κωδικόνιο τερματισμού, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός μεταλλαγμένου υποδοχέα που του υπολείπεται το ακραίο μισό της περιοχής LBD.

[Από Oakley and Cidlowski, 2011].

1.4.3.1.1 Η κύρια ισομορφή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών: GR α

Η GR α είναι η επικρατούσα μορφή του GR, αφού είναι η ισομορφή εκείνη που συνδέεται με τα γλυκοκορτικοειδή στο διαλυτό κυτταρόπλασμα, μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου στρατολογεί διάφορους συμπαράγοντες, και τελικά ασκεί τη δράση της. Προέρχεται από την ένωση του τελικού άκρου του εξονίου 8 με την αρχή του εξονίου 9. Ο GR α είναι πανομοιότυπος με τον GR β στα πρώτα 727 αμινοξέα, ενώ στο καρβοξυτελικό του άκρο περιλαμβάνει 50 επιπλέον αμινοξέα, γεγονός που τον διαφοροποιεί από τον GR β [Oakley and Cidlowski, 2013].

Βιοχημικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του '80 έδειξαν ότι ο GR α , όπως και οι περισσότεροι NRs, είναι οργανωμένος σε δομικές μονάδες και αποτελείται από τρεις κύριες δομικές περιοχές [(Giguere *et al.*, 1986); (Carlstedt-Duke *et al.*, 1987); (Rusconi and Yamamoto, 1987)]. Κάθε μία από αυτές τις περιοχές εκτελεί μια ξεχωριστή λειτουργία σχετικά με τη ρύθμιση της μεταγωγής σημάτων και σε ό,τι αφορά τις μεταγραφικές δραστηριότητες του GR α .

Η NH₂-τελική περιοχή του GR α , όπως και όλων των GRs, διαθέτει τη λειτουργία ενεργοποίησης-1 (AF-1) (κατά προσέγγιση τα αμινοξέα 1-417), δραστηριότητα που διέπει ένα συστατικό μεταγραφικό ρόλο και αποτελεί στόχο διάφορων πρωτεϊνών αλληλεπίδρασης και κινασών [Hittelman *et al.*, 1999].

Τα αμινοξέα 418-487 αποτελούν την DNAπροσδένουσα περιοχή (DBD) του GR α . Η κρυσταλλογραφική ανάλυση αυτής της περιοχής έδειξε ότι αναδιπλώνεται σε μια διαμόρφωση τύπου δακτύλων ψευδαργύρου που χρησιμεύει στην άμεση ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το DNA [Luisi *et al.*, 1991]. Επιπλέον, διαμορφώνεται μια καλά καθορισμένη μεσόφαση διμερούς, δεδομένου ότι δύο υπομονάδες DBD δεσμεύουν την έλικα του DNA στις παρακείμενες μείζονες αύλακες.

Μετά από μια σύντομη έκταση της ακολουθίας (κατά προσέγγιση τα αμινοξέα 488-520) γνωστή ως περιοχή “άρθρωσης”, το C-τελικό άκρο του GR α (αμινοξέα 521-777) περιέχει μία αναδιπλωμένη μονάδα που ενέχει την ικανότητα να δεσμεύει τα προσδεδεμένα μόρια. Αυτή η περιοχή αναφέρεται ως περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (LBD).

Εκτός από τα προκείμενα τρία σημαντικά δομικά μοτίβα, προσδιορίζονται επίσης τα πυρηνικά σήματα εντοπισμού NLS, τα οποία εγκλείονται στις δύο περιοχές DBD και LBD.

Glucocorticoid Receptor Alpha



Εικόνα 1.10 Δομή της ισομορφής α του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR α) [Από Gruver-Yates and Cidlowski, 2013].

1.4.3.1.2 Ο GR β ως προϊόν εναλλακτικού ματίσματος

Ο GR β προκύπτει ως προϊόν εναλλακτικού ματίσματος, με το τελικό άκρο του εξονίου 8 να ενώνεται με αλληλουχίες καθοδικά του εξονίου 9. Η πρωτεΐνη του GR β είναι πανομοιότυπη με την πρωτεΐνη του GR α στα πρώτα 727 αμινοξέα, ενώ διαφοροποιείται στο καρβοξυτελικό της άκρο κατά μία πρόσθετη, μη ομόλογη αλληλουχία 15 αμινοξέων [Oakley and Cidlowski, 2013].

Η καρβοξυτελική αυτή αλληλουχία καθιστά μοναδικό τον GR β , προσδίδοντας, έτσι, στην ισομορφή αυτή διάφορες διακριτές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, ο GR β δεν έχει ικανότητα δέσμευσης γλυκοκορτικοειδών, είναι σταθερά τοποθετημένος στο εσωτερικό του πυρήνα των κυττάρων και είναι μεταγραφικά μη ενεργός, καθώς δεν δύναται να ρυθμίζει άμεσα τα γονίδια αναφοράς που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή [(Kino *et al.*, 2009); (Lewis-Tuffin and Cidlowski, 2006)]. Σε τυχόν συνέκφρασή του με τον GR α , το εναλλακτικό μετάγραφο του GR β λειτουργεί ως φυσικός αναστολέας του GR α , καθώς παρατηρείται αρνητική επίδραση στην μεταγραφική ενεργότητα του GR α , τόσο στα γονίδια που ρυθμίζονται θετικά όσο και σε αυτά που ρυθμίζονται αρνητικά από τα γλυκοκορτικοειδή. Πολλαπλοί μηχανισμοί, συμπεριλαμβανομένου του συναγωνισμού για πρόσδεση στα

GREs, του συναγωνισμού για μεταγραφικούς συν-ρυθμιστές και του σχηματισμού ανενεργών GR α /GR β ετεροδιμερών, έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την ανταγωνιστική δράση που παρατηρείται.

Επιπλέον, η ικανότητα του GR β να αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του GR α υποδεικνύει ότι τυχόν μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων θα μπορούσαν να ρυθμίσουν την κυτταρική ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή. Ο GR β εκφράζεται ευρέως σε πολλά κύτταρα και ιστούς, όπως και ο GR α , αλλά σε γενικές γραμμές βρίσκεται σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από ότι ο GR α . Ωστόσο, σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, όπως τα ουδετερόφιλα και μερικά επιθηλιακά κύτταρα, ο GR β βρίσκεται σε περίσσεια.

Τυχόν έκθεση, επομένως, των κυττάρων σε προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και άλλους ανοσολογικούς ενεργοποιητές μπορεί να αυξήσει με επιλεγμένο τρόπο την έκφραση του GR β , οδηγώντας σε αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή [(Hauk *et al.*, 2000); (Tliba *et al.*, 2006); (Webster *et al.*, 2001)]. Μερικοί ασθενείς με ανθεκτικές στα γλυκοκορτικοειδή φλεγμονώδεις ασθένειες, όπως διάφορες μορφές άσθματος, ρευματοειδή αρθρίτιδα, ελκώδη κολίτιδα, ρινικό πολύποδα, συστημικό ερυθηματώδη λύκο, σήψη, οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και χρόνια λεμφοκυστική λευχαιμία, παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα GR β [Lewis-Tuffin and Cidlowski, 2006].

Επιπρόσθετα, ένας συχνά απαντώμενος πολυμορφισμός στην 3'-αμετάφραση περιοχή του mRNA του GR β , ο A3669G, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη έκφραση του GR β [(Derijk *et al.*, 2001); (Schaaf and Cidlowski, 2002)]. Ο πολυμορφισμός αυτός διακόπτει ένα μοτίβο αποσταθεροποίησης (AUUUA) στο mRNA, συντελώντας σε παράταση του χρόνου ημιζωής του mRNA του GR β . Οι φορείς του A3669G πολυμορφισμού παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διάφορων παθολογιών με γνωστό φλεγμονώδες υπόβαθρο, όπως αυτοάνοσες παθήσεις, έμφραγμα του μυοκαρδίου, στεφανιαία νόσο και καρδιακή ανεπάρκεια [(Geelhoed *et al.*, 2011); (Otte *et al.*, 2010); (van den Akker EL *et al.*, 2008)]. Επομένως, τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν ότι η αύξηση των επιπέδων έκφρασης του GR β σε άτομα που φέρουν το συγκεκριμένο πολυμορφισμό, μπορεί να μετριάσει σημαντικά τις ανοσοκατασταλτικές και αντι-φλεγμονώδεις δράσεις του GR α . Αντίθετα, παράγοντες που αυξάνουν την έκφραση του GR α έναντι του GR β , ευαισθητοποιούν τα κύτταρα στη δράση των γλυκοκορτικοειδών [Goetze *et al.*, 2007].

Ένας ευρύτερος ρόλος για τον GR β στην κυτταρική σηματοδότηση και φυσιολογία προέκυψε τα τελευταία χρόνια. Αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης ευρείας

κλίμακας έδειξαν ότι ο GRβ μπορεί να επάγει και να καταστείλει άμεσα την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, ανεξάρτητα από τη δράση του μέσω αναστολής του GRα, αποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο την ανεξάρτητη δράση της δεύτερης ισομορφής σε σχέση με την πρώτη [(Kino *et al.*, 2009); (Lewis-Tuffin *et al.*, 2007)]. Η ικανότητα του GRβ να επάγει σταθερά την αποακετυλίωση των ιστονών μπορεί να εξηγήσει εν μέρει την ανασταλτική του δράση έναντι συγκεκριμένων γονιδίων [(Kelly *et al.*, 2008); (Kim *et al.*, 2009)]. Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί πως παρόλο που δεν έχει παρατηρηθεί ικανότητα δέσμευσης γλυκοκορτικοειδών στον GRβ, πιθανολογείται πως ο συνθετικός ανταγωνιστής των γλυκοκορτικοειδών RU-486 (μιφεπριστόνη) δεσμεύεται στον GRβ και ρυθμίζει την μεταγραφική του ενεργότητα, και πιο συγκεκριμένα αποσιωπά την ενεργότητά του σε αρκετά από τα υπό ρύθμιση γονίδια [Lewis-Tuffin *et al.*, 2007], γεγονός που παρατηρείται ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη του GRα. Αθροιστικά, όλα τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν πως ο GRβ έχει μια ουσιαστική ρυθμιστική λειτουργικότητα ως μεταγραφικός παράγοντας και πιθανόν συμβάλλει σε μεταβολές στη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών, οι οποίες είναι ανεξάρτητες του ανταγωνισμού του με τον GRα.

Glucocorticoid Receptor Beta



Εικόνα 1.11 Δομή της ισομορφής β του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GRβ) [Από Gruver-Yates and Cidlowski, 2013].

1.4.3.1.3 Ο GRγ ως προϊόν εναλλακτικού ματίσματος

Επιπλέον ισομορφές του GR μπορούν να προκύψουν από εναλλακτικό μάτισμα και να επηρεάσουν τη σηματοδότηση από τα γλυκοκορτικοειδή. Μία από αυτές τις ισομορφές είναι ο GRγ, ο οποίος προέρχεται από τη χρήση μιας θέσης εναλλακτικού ματίσματος στο ιντρόνιο που διαχωρίζει τα εξόνια 3 και 4 και διαθέτει μία προσθήκη ενός μοναδικού αμινοξέος Arg μεταξύ των δύο δάκτυλων ψευδαργύρου (zf) της δομικής περιοχής DBD [Ray *et al.*, 1996]. Αυτή η ευρέως εκφρασμένη ισομορφή προσδένεται στα γλυκοκορτικοειδή και το DNA με παρόμοιο

τρόπο με τον GR α , αλλά δεν διαθέτει ικανότητα ρύθμισης γονιδίων που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή και επομένως παρουσιάζει ένα μεταγραφικό προφίλ που διαφέρει από τον GR α [(Ray *et al.*, 1996); (Meijsing *et al.*, 2009)]. Η έκφραση του GR γ σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα γλυκοκορτικοειδή σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και κορτικοτροφικά αδενώματα και παιδιά με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία [(Ray *et al.*, 1996); (Beger *et al.*, 2003); (Rivers *et al.*, 1999)].

1.4.3.1.4 Οι GR-A και GR-P ως προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος

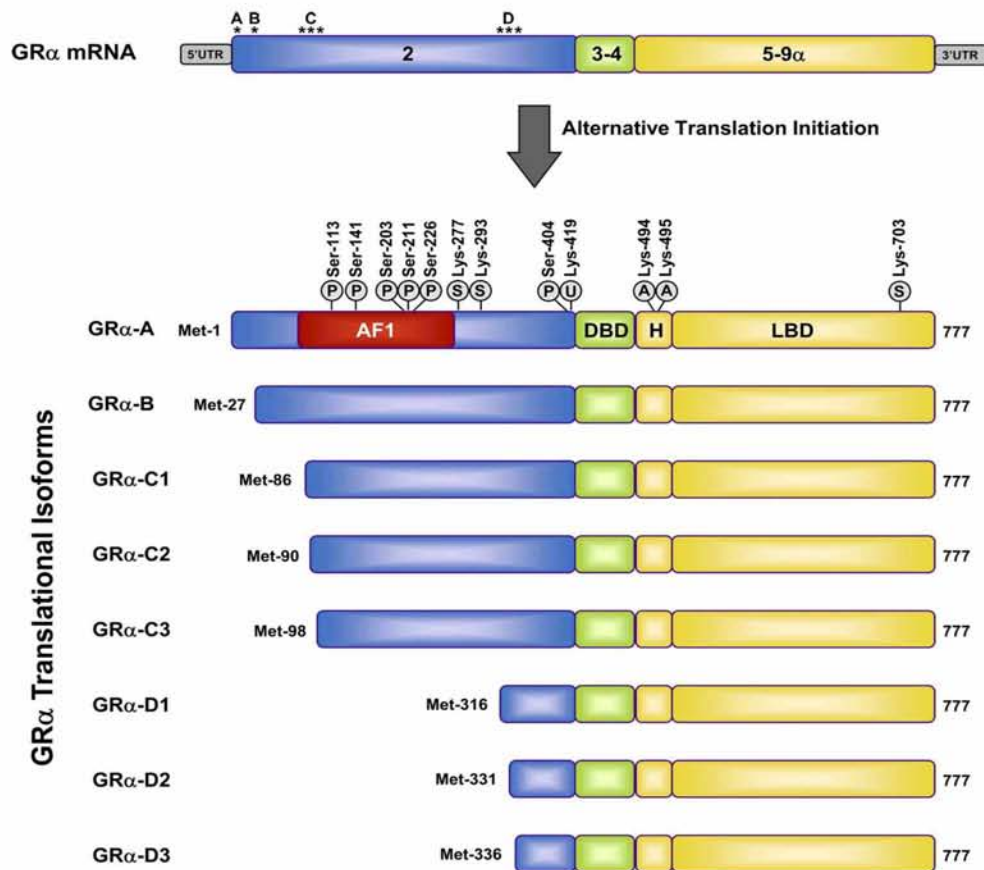
Σε κύτταρα πολλαπλών μυελωμάτων ανθεκτικά στα γλυκοκορτικοειδή ανακαλύφθηκαν δύο πρωτεΐνες, οι GR-A και GR-P, που ήταν το αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος του αρχικού μεταγράφου του GR. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες αυτές δεν προσδένουν ορμόνες καθώς τους υπολείπονται μεγάλες περιοχές των LBDs [Moalli *et al.*, 1993]. Η GR-A ισομορφή προέρχεται από εναλλακτικό μάτισμα που συνδέει το τέλος του εξονίου 4 με την αρχή του εξονίου 8 και έτσι υπολείπεται της μισής αμινοτελικής περιοχής της LBD, που κωδικοποιείται από τα εξόνια 5-7. Η ισομορφή GR-P υπολείπεται των εξονίων 8 και 9, τα οποία κωδικοποιούν τη μισή καρβοξυτελική περιοχή της LBD. Αν και λίγα είναι γνωστά για τον GR-A, ο GR-P έχει εντοπιστεί σε αρκετούς ιστούς και φαίνεται να είναι η επικρατέστερη εναλλακτική μορφή υποδοχέα σε αρκετά καρκινικά κύτταρα που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα γλυκοκορτικοειδή [(deLange *et al.*, 2001); (Gaitan *et al.*, 1995); (Krett *et al.*, 1995)]. Ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, ο GR-P φάνηκε είτε να αναστέλλει είτε να διεγείρει τη μεταγραφική ενεργότητα του GR α σε γονίδια που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή [deLange *et al.*, 2001].

1.4.3.2 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από εναλλακτική θέση έναρξης της μετάφρασης

Πέρα από την ύπαρξη διακριτών ισομορφών GR που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα, είναι επίσης δυνατόν να παραχθούν διαφορετικές μορφές της πρωτεΐνης του υποδοχέα από εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης του mRNA

ενός συγκεκριμένου υποτύπου GR [(Lu and Cidlowski, 2005); (Yudt and Cidlowski, 2001); (Smith and Cidlowski, 2010)].

Η στοίχιση των πρωτεϊνικών ακολουθιών των GRs από άνθρωπο, μαϊμού, αρουραίο και ποντικό ανέδειξε 8 συντηρημένα εσωτερικά κωδικόνια έναρξης AUG, τα οποία προέρχονται από το εξόνιο 2 του γονιδίου GR και έγινε φανερό πως από αυτά μπορούν να προκύψουν 8 GRα υποτύποι με προοδευτικά βραχύτερα αμινοτελικά άκρα, δηλαδή οι NTDs τους να έχουν υποστεί κοπή (GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2, and GRα-D3) [(Lu and Cidlowski, 2005); (Yudt *et al.*, 2003)] (Εικόνα 1.12). Κάθε ένα από τα υπόλοιπα προϊόντα ματίσματος του GR (GRβ, GRγ, GR-A, and GR-P) αναμένεται, επίσης, να δίνει γένεση σε μεταφραστικές ισομορφές που έχουν συμπληρωματική δράση.



Εικόνα 1.12 Απεικόνιση των ισομορφών του ανθρώπινου GRα που δημιουργούνται από εναλλακτικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης καθώς και των εν δυνάμει θέσεων μετα-μεταφραστικής τροποποίησης. Η έναρξη της μετάφρασης από 8 διαφορετικά κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης (AUG) στο μοναδικό mRNA του GRα δημιουργεί ισομορφές του υποδοχέα με προοδευτικά βραχύτερα αμινοτελικά άκρα (NTDs).

Οι κατά προσέγγιση τοποθεσίες των κωδικονίων έναρξης AUG στις αλληλουχίες του εξονίου 2 του mRNA του GRα σημειώνονται με αστερίσκους.

Σημειώνονται, επίσης, οι εναρκτήριες μεθειονίνες (Met), η περιοχή AF1 (αμινοξέα 77-262) και οι θέσεις μετα-μεταφραστικής τροποποίησης (P=φωσφορυλίωση, S=SUMO-λίωση, U=ουβικτινιλίωση και A=Ακετυλίωση). UTR=αμετάφραστη περιοχή [Από Oakley and Cidlowski, 2011].

Ο GR α -A είναι ο κλασσικός ανθρώπινος υποδοχέας μήκους 777 aa που προκύπτει από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης. Όλες οι GR α ισομορφές διέπονται από παρόμοια ικανότητα δέσμευσης για GCs και αλληλεπίδρασης με GREs.

Η σημαντικότερη, ωστόσο, διαφορά των ισομορφών του GR έγκειται στα προφίλ των γονιδίων που ρυθμίζουν. Κάθε μεταφραστική ισομορφή του GR α διαθέτει ένα μοναδικό γενετικό αποτύπωμα, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα προσδιορισμού της κυτταρικής απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή, βάσει των υποτύπων του υποδοχέα που εκφράζονται και των δράσεων αυτών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι οι GR α -C ισομορφές είναι οι πλέον βιολογικά ενεργές, σε αντίθεση με τις GR α -D ισομορφές, οι οποίες είναι οι λιγότερο λειτουργικές [Wu *et al.*, 2013]. Αυτό συμβαίνει επειδή, οι GR α -D ισομορφές βρίσκονται ιδιόσυστατα στον πυρήνα και δεσμεύονται σε ορισμένα μόνο GREs, που εντοπίζονται σε συγκεκριμένα γονίδια στόχους ενώ οι GR α -C ισομορφές εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων απουσία ορμονών και μετατοπίζονται στον πυρήνα μετά την πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών. Αυτές οι λειτουργικές διαφορές διαφαίνονται και στην επαγόμενη από τα γλυκοκορτικοειδή απόπτωση [(Lu *et al.*, 2007); (Wu *et al.*, 2013); (Gross *et al.*, 2011)]. Ειδικότερα, κύτταρα που εκφράζουν τις GR α -C ισομορφές ήταν τα πιο ευαίσθητα όσον αφορά τις επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στην κυτταρική απόπτωση, σε αντίθεση με τα κύτταρα που εκφράζουν τις GR α -D ισομορφές και ήταν αυτά που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη αντίσταση.

Επιπρόσθετα, οι ισομορφές του υποδοχέα παρουσιάζουν μια εκτεταμένη κατανομή στους ιστούς, αλλά τα σχετικά επίπεδά τους διαφέρουν τόσο στο εσωτερικό όσο και αναμεταξύ των ιστών [Lu and Cidlowski, 2005], όπως επίσης και στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, παρά το γεγονός ότι οι GR α -A και GR α -B ισομορφές αποτελούν την πλειονότητα σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Μάλιστα, πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν χρονο-εξαρτώμενες και σηματο-εξαρτώμενες αλλαγές στις κυτταρικές συμπληρωματικές δράσεις των μεταφραστικών ισομορφών του GR α αλλά και στη διαθεσιμότητά τους σε διάφορους ιστούς και κυτταρικούς τύπους [Wang *et al.*, 2009].

1.4.3.3 Ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Κάθε ξεχωριστή ισομορφή του GR υπόκειται σε διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν περαιτέρω την ενεργότητα του υποδοχέα και επεκτείνουν το λειτουργικό απόθεμα των υποδοχέων που είναι ικανοί για σηματοδότηση μέσω γλυκοκορτικοειδών.

Η φωσφορυλίωση ήταν η πρώτη ομοιοπολική τροποποίηση του GR που ανακαλύφθηκε και αποτέλεσε το επίκεντρο αρκετών μελετών [(Beck *et al.*, 2009); (Galliher-Beckley and Cidlowski, 2009); (Kumar and Calhoun, 2008)]. Τουλάχιστον 7 αμινοξέα σερίνης (Ser-113, Ser-134, Ser-141, Ser-203, Ser-211, Ser-226 και Ser-404) είναι δυνατό να φωσφορυλιωθούν στον ανθρώπινο GR α , με τις θέσεις φωσφορυλίωσης να εντοπίζονται στην NTD του υποδοχέα και να είναι συντηρημένες τόσο στους ποντικούς όσο και στους επίμυες [(Wang *et al.*, 2002); (Avenant *et al.*, 2010)]. Οι κύριες κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον GR α είναι οι MAPKs, οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες, η κινάση της καζεΐνης 2 και η κινάση-3 της συνθάσης του γλυκογόνου (glycogen synthase kinase-3, GSK-3). Ορισμένες θέσεις παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης και υπερ-φωσφορυλιώνονται μετά την πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών στους υποδοχείς [Wang *et al.*, 2002]. Η φωσφορυλίωση του GR α μπορεί να έχει ποικίλες επιδράσεις, με σημαντικότερες την αλλαγή της μεταγραφικής ενεργότητας και της κυτταρικής κατανομής του υποδοχέα. Για παράδειγμα, φωσφορυλίωση του GR α στα κατάλοιπα Ser-203, Ser-226 ή Ser-404, οδηγεί στην παραμονή του υποδοχέα για λιγότερο χρόνο στον πυρήνα του κυττάρου, λόγω εντονότερης κυτταροπλασματικής κατακράτησης, ενισχυμένης πυρηνοκυτταροπλασματικής μεταφοράς ή εξαιτίας και των δύο. Επομένως, η φωσφορυλίωση του GR α σε κάποιες από τις παραπάνω θέσεις έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα στα γονίδια-στόχους που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή [(Wang *et al.*, 2002); (Blind and Garabedian, 2008); (Galliher-Beckley *et al.*, 2008); (Itoh *et al.*, 2002)].

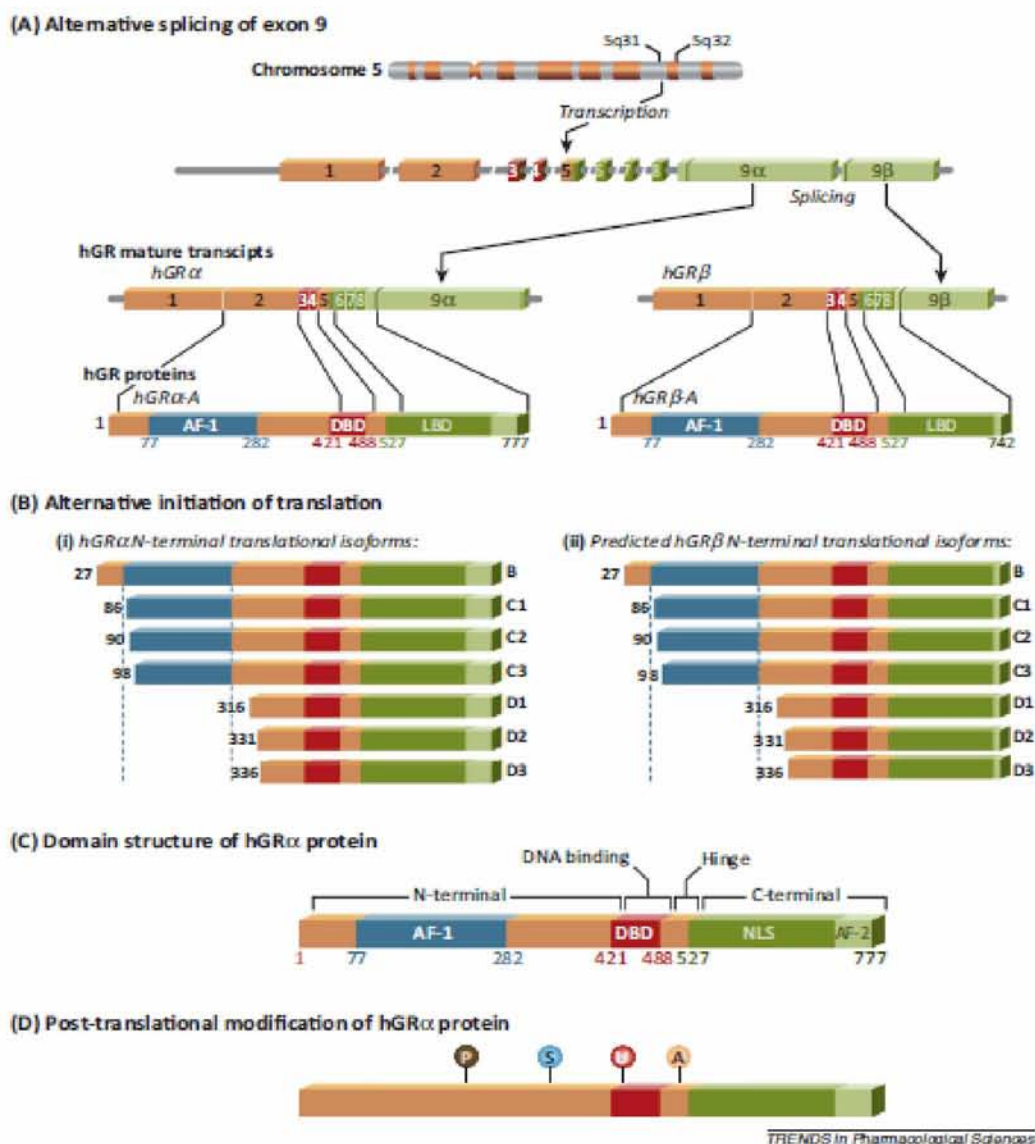
Επιπλέον, ο GR α εξυπηρετεί ως υπόστρωμα για μια ποικιλία άλλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Ο υποδοχέας ουβικιτινιώνεται [Wang and DeFranco, 2005] σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο λυσίνης (Lys-419) που εδράζεται στο μοτίβο αποικοδόμησης PEST (αλληλουχίες πλούσιες στα αμινοξέα P, E, S, T) στο τέλος της περιοχής NTD και αυτή η τροποποίηση στοχεύει τον υποδοχέα για αποικοδόμηση

από το πρωτεάσωμα [(Deroo *et al.*, 2002); (Wallace and Cidlowski, 2001)]. Μεταλλάξεις στο συγκεκριμένο αμινοξύ λυσίνης εμποδίζει την προσδετο-εξαρτώμενη μειορρυθμισμό του GRα και ενισχύει τη μεταγραφική του ενεργότητα σε γονίδια αναφοράς [Wallace and Cidlowski, 2001].

Ο GRα προσφέρεται, επίσης, ως υπόστρωμα για σουμοϋλίωση, όπου τα πεπτιδία SUMO (small ubiquitin-related modifier) προσαρτώνται ομοιοπολικά στον υποδοχέα σε συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσίνης (Lys-277, Lys-293 και Lys-703). Η προσθήκη των πεπτιδίων SUMO στον υποδοχέα πραγματοποιείται απουσία προσδέματος και αυξάνεται με την πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών ενώ ανάλογα με τη θέση σουμοϋλίωσης, η μεταγραφική ενεργότητα του GRα ενισχύεται ή καταστέλλεται, μέσω μεταβολών στην πρόσληψη συγκεκριμένων συν-ρυθμιστών. [(Iñiguez-Lluhí and Pearce, 2000); (Druker *et al.*, 2013); (Davies *et al.*, 2008); (Holmstrom *et al.*, 2003); (Holmstrom *et al.*, 2008); (LeDrean *et al.*, 2002); (Tian *et al.*, 2002); (Lin *et al.*, 2006)]. Επιπλέον, τελευταίες αναφορές έχουν αναδείξει ότι ο GRα ακετυλιώνεται στα αμινοξέα Lys-494 και Lys-495, τα οποία εντοπίζονται μέσα στην περιοχή «άρθρωσης», σε απόκριση στην πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών και αυτή του η τροποποίηση εξασθενίζει τον ανταγωνισμό του έναντι του NF-κB [Ito *et al.*, 2006].

Συμπερασματικά, είναι ξεκάθαρο πως η λειτουργικότητα του GRα μπορεί να ρυθμιστεί από διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, εφοδιάζοντας τα κύτταρα με επιπρόσθετη ετερογένεια υποδοχέων για τον έλεγχο των αποκρίσεων στα γλυκοκορτικοειδή και τη σύνδεση των δράσεων του GRα με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Το ερώτημα, ωστόσο, σε ποιο βαθμό οι διάφορες ισομορφές (προερχόμενες είτε από εναλλακτικό μάτισμα είτε από εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης) του GR υπόκεινται σε τέτοιες τροποποιήσεις και ρυθμίζονται περαιτέρω από αυτές, απομένει να διερευνηθεί.

Παρακάτω, δίνεται η Εικόνα 1.13, όπου συνοψίζονται όλα όσα έχουν περιγραφεί παραπάνω.



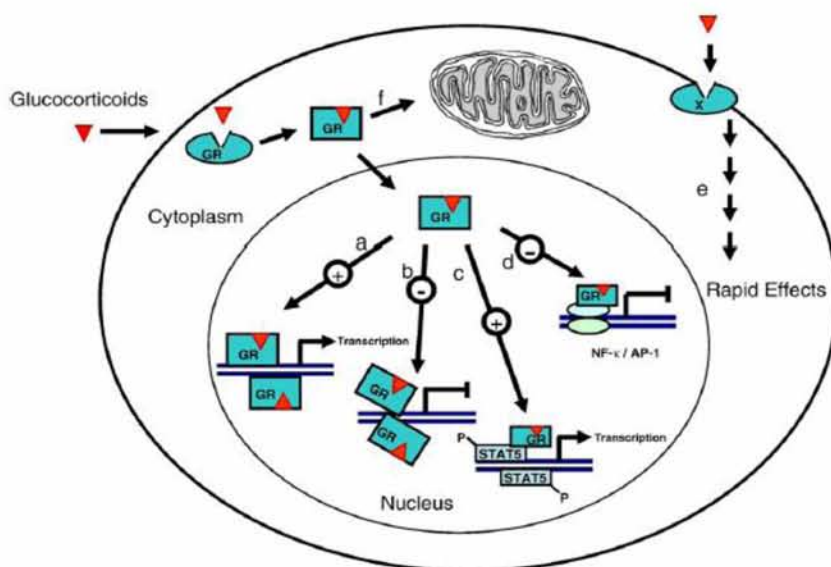
Εικόνα 1.13 Θέση στο γονιδίωμα κι οργάνωση του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (hGR). Το γονίδιο του hGR εδράζεται στο χρωμόσωμα 5, στην περιοχή 5q31-32. (A) Ο GR υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα αποδίδοντας, έτσι, πλήθος διακριτών λειτουργικών υποτύπων. Ο GR περιέχει 9 εξόνια, με τα εξόνια 2-9 να κωδικοποιούν την πρωτεΐνη. Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί την 5' αμετάφραστη περιοχή (5' UTR). Εναλλακτικό μάτισμα του hGR δημιουργεί τις hGRα και hGRβ ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν στα C-τελικά άκρα τους. (B) Η ισομορφή hGRα μέσω εναλλακτικής θέσης έναρξης της μετάφρασης στο εξόνιο 2 οδηγεί στη δημιουργία 8 επιπλέον ισομορφών του GR με περικομμένα N-τελικά άκρα (GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2, και GRα-D3). Από τον hGRβ προκύπτουν, επίσης, 8 επιπλέον ισομορφές, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τον hGRα. (C) Ο GR είναι μία αρθρωτή πρωτεΐνη αποτελούμενη από διακριτές υπομονάδες. Περιέχει ένα N-τελικό άκρο διενεργοποίησης (NTD), μία κεντρική περιοχή σύνδεσης του DNA (DBD), μία C-τελική περιοχή σύνδεσης με προσδέτη (LBD) και μία εύκαμπτη περιοχή (hinge region-HR) που χωρίζει την DBD από την LBD. Η NTD έχει μια ισχυρή μεταγραφική λειτουργία ενεργοποίησης (AF1) που επιτρέπει την πρόσληψη συμπαραγόντων και της μεταγραφικής μηχανής. Τα γλυκοκορτικοειδή δεσμεύονται στον υδρόφοβο θύλακα της LBD, προκαλώντας την ενεργοποίηση της δεύτερης μεταγραφικής λειτουργίας ενεργοποίησης (AF2), που βρίσκεται στην ίδια την LBD, και τελικά την αλληλεπίδρασή της με

διάφορους συμπαράγοντες. Η DBD/HR και η LBD περιέχουν η κάθε μια ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού που επιτρέπει τη μετατόπιση στον πυρήνα. (D) Ο GR υπόκειται σε πολλαπλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης (P), της σουμυλίωσης με μικρές πρωτεΐνες -τροποποιητές που σχετίζονται με ουβικιτίνη (S), της ουβικιτινίωσης (U), και της ακετυλίωσης (A) [Από Kadmiel and Cidlowski, 2013].

1.5 Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Απουσία γλυκοκορτικοειδών, ο GR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, αποτελώντας μέρος ενός μεγάλου πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου, που περιλαμβάνει πρωτεΐνες μοριακές συνοδούς, όπως η Hsp90, η Hsp70, η Hsp40 και η συν-συνοδός p23, αλλά και ανοσοφιλίνες της οικογένειας FK506, όπως η FKBP51, η FKBP52 και το Cyp40 [(Kleiman and Tuckermann, 2007); (Pratt *et al.*, 1996); (Grad and Picard, 2007); (Pratt and Toft, 1997)]. Οι πρωτεΐνες αυτές διατηρούν τον υποδοχέα σε μία μεταγραφικά ανενεργή διαμόρφωση, η οποία, όμως, ευνοεί την υψηλής συγγένειας δέσμευση του προσδέτη.

Η δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών προκαλεί μία αλλαγή διαμόρφωσης στον GR, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευσή του από το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο και την έκθεση των δύο σημάτων πυρηνικής τοποθέτησης (NL1 και NL2) και κατόπιν την είσοδό του εντός του πυρήνα διαμέσου των πυρηνικών πόρων, των ιμπορτινών, όπου και ασκεί την πλειονότητα των δράσεων του. Αυτός ο τύπος δράσης ονομάζεται γενωμικός, με σημαντικότερους μηχανισμούς την ενεργοποίηση (περιπτώσεις i, iii, iv) και καταστολή (περιπτώσεις ii, iii, iv) συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων [Oakley and Cidlowski, 2013].



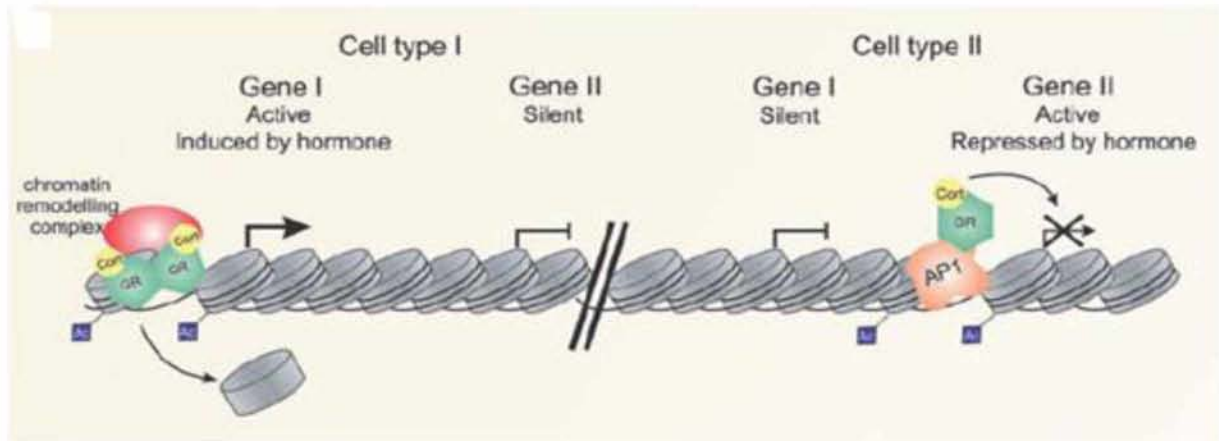
Εικόνα 1.14 Παρουσίαση των μηχανισμών δράσης των στεροειδών ορμονών μέσα από το παράδειγμα των γλυκοκορτικοειδών. Οι στεροειδείς ορμόνες, μέσω της πρόσδεσής τους σε συγγενείς υποδοχείς και της αλληλεπίδρασής τους με τα στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη (Hormone Responsive Elements, HREs), μπορούν (a) να ενεργοποιήσουν ή (b) να καταστείλουν τη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου. Μέσω της πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης του συμπλόκου ορμόνης-υποδοχέα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, η ορμόνη μπορεί (c) να ενεργοποιηθεί ή (d) να εμποδίσει τη μεταγραφή του γονιδίου-στόχου, στο οποίο προσδένεται ο αντίστοιχος μεταγραφικός παράγοντας. Η ορμόνη μπορεί, επίσης, να οδηγήσει σε ταχείες, μη γενωμικές επιδράσεις (e) με τις κλασικές μορφές του υποδοχέα, με υποδοχείς σε συνδυασμό με τη δράση G-πρωτεϊνών ή ακόμη μέσω άγνωστων μορίων και μηχανισμών μεταγωγής σήματος. Στα μιτοχόνδρια (f), το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα μέσω της αλληλεπίδρασης με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μπορεί να ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. GR: υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών, NF-κB: πυρηνικός παράγοντας κB, AP-1: πρωτεΐνη ενεργοποιητής-1, STAT5: μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής 5 [Από Psarra AM, 2008a].

1.5.1 Γενωμική δράση

Εντός του πυρήνα, ο συνδεδεμένος με το πρόσδεμα GR διμερίζεται (περιπτώσεις i και iv) και συνδέεται άμεσα (περιπτώσεις i, ii και iv) ή έμμεσα (περίπτωση iii) σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid responsive elements, GREs), και λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας επάγοντας ή καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων, γεγονός που εξαρτάται από το γονίδιο και το περιβάλλον του κυττάρου [Schlossmacher *et al.*, 2011].

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται τέσσερις κατηγορίες GREs: τα απλά (simple GREs) (Εικόνα 1.16), τα αρνητικά (negative GREs, nGREs) (Εικόνα 1.17), τα προσδεδεμένα (tethering GREs) (Εικόνα 1.18) και τα σύνθετα (composite GREs) (Εικόνα 1.20), γεγονός που υποδηλώνει διαφορές στους μηχανισμούς ενεργοποίησης της κάθε ομάδας. Τα GREs εντοπίζονται στην περιοχή του υποκινητή ή του ενισχυτή των γονιδίων-στόχων των GCs και αποτελούν ατελείς παλίνδρομες ακολουθίες DNA που περιλαμβάνουν δύο μισά εξαμερή τμήματα, τα οποία χωρίζονται από έναν ορισμένο αριθμό νουκλεοτιδίων που ποικίλει ανάλογα με τον τύπο του GRE [Kadmiel and Cidlowski, 2013].

i) Απλά GREs (simple GREs) (Εικόνα 1.14a): Μέσω της τεχνολογίας FRAP και πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, έγινε φανερό ότι η αλληλεπίδραση του GR με το DNA είναι μία ιδιαίτερα δυναμική διαδικασία, κατά την οποία ο GR μαζί με σύμπλοκα συν-ρυθμιστών κάνουν κύκλους γύρω από το DNA που διαρκούν λίγα δευτερόλεπτα [McNally *et al.*, 2000] ή λεπτά [Metivier *et al.*, 2003] και στη συνέχεια ο GR προσδένεται άμεσα στα GREs ως διμερές.



Εικόνα 1.15 Ειδικές δράσεις του GR σε επίπεδο κυττάρου και γονιδίου. Η προσβασιμότητα της χρωματίνης είναι ένας καθοριστικός παράγοντας στη σύνδεση του υποδοχέα με τη χρωματίνη. Τα ενεργά γονίδια φαίνεται πως έχουν προσβάσιμο DNA και ακετυλιωμένες (Ac) ιστόνες. Τα γονίδια που ενεργοποιούνται από τον GR απαιτούν ομοδιμερή που προσδένονται απευθείας στο DNA στα GREs. Η ορμονό-εξαρτώμενη καταστολή του γονιδίου μπορεί να διαμεσολαβείται από την πρωτεϊνική αλληλεπίδραση ομομερών GR με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο AP1. [Τροποποιημένη εικόνα από Biddie SC, 2012].

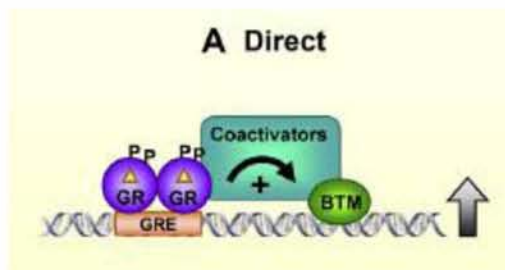
Η δομή ενός απλού GRE είναι GGAACAnnnTGTTCT και μόλις το 1/3 της ακολουθίας είναι συντηρημένο, ενώ τα υπόλοιπα 2/3 διαφέρουν, χαρίζοντας με αυτόν τον τρόπο την πολυπλοκότητα μεταβλητότητα στην αλληλουχία του DNA εσωτερικά του GRE που οδηγεί στη διαφορετική μεταγραφική δραστηριότητα του GR [Meijsing, S.H. *et al.*, 2009]. Ακόμα, τα τρία νουκλεοτίδια που διαχωρίζουν τα δύο εξαμερή τμήματα είναι απολύτως απαραίτητα, ώστε ο GR να μπορέσει να διμεριστεί πάνω στο GRE, καθώς κάθε μία υπομονάδα του διμερούς υποδοχέα προσδένεται σε ένα εξαμερές τμήμα του GRE.

Ο διμερισμός πραγματοποιείται μέσω διακριτών υδροφοβικών μοτίβων που βρίσκονται στην LBD κάθε υποδοχέα [Bledsoe *et al.*, 2004] και σταθεροποιείται περαιτέρω από την αλληλεπίδραση των DBD των υποδοχέων. Πιο συγκεκριμένα, το N-τελικό δάχτυλο ψευδαργύρου από τα δύο της DBD κάθε υποδοχέα συνδέεται στο ένα μισό του GRE ενώ το δεύτερο δάχτυλο ψευδαργύρου του πρώτου μονομερούς

συνδέεται με το δεύτερο μονομερές μέσω ενός αμινοξέος που "τεντώνεται" και ονομάζεται κουτί διμερισμού [Luisi *et al.*, 1991].

Σ' αυτό το σημείο, αξίζει να αναφερθεί πως, εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης στην περιοχή διμερισμού του υποδοχέα, απέδειξε *in vitro* πως απαραίτητη προϋπόθεση για την επαγωγή της μεταγραφικής δραστηριότητας πολλών, εξαρτώμενων από GCs, γονιδίων είναι ο διμερισμός του GR [Schäcke H, 2007]. Πειραματόζωα, ειδικότερα ποντίκια, που έφεραν την μετάλλαξη αυτή, παρουσίαζαν αισθητά μειωμένα επίπεδα, ενεργοποιημένων από GR, ηπατικών γονιδίων [Reichardt HM, 1998]. Παρόλα αυτά, έχει αποδειχθεί πως ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων εξακολουθεί να επάγεται ακόμα και παρουσία ενός μεταλλαγμένου, στην περιοχή διμερισμού, υποδοχέα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη εναλλακτικών μηχανισμών ενεργοποίησης, ενδεχομένως μέσω των AF-1 και AF-2 περιοχών του υποδοχέα [Hudson WH, 2013].

Μετά τη δέσμευση στο GRE, ο υποδοχέας υφίσταται επιπλέον αλλαγές στη διαμόρφωσή του που οδηγούν σε μια συντονισμένη στρατολόγηση συν-ρυθμιστικών μορίων, όπως συν-ενεργοποιητών ή συν-καταστολέων, και συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που επηρεάζουν την πρόσβαση της μεταγραφικής συσκευής, συμπεριλαμβανομένου της



Εικόνα 1.16 Αναπαράσταση της άμεσης πρόσδεσης του GR σε ένα απλό GRE (simple GRE) που έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης. BTM: βασική μεταγραφική συσκευή (basal transcription machinery) [Από Oakley and Cidlowski, 2013].

RNA πολυμεράσης II (RNA pol II), και κατ' επέκταση το ρυθμό της μεταγραφής γονιδίων [(Jenkins *et al.*, 2001); (Lonard and O'Malley, 2005); (Rosenfeld and Glass

2001)]. Το δεσμευμένο GR ομοδιμερές αλληλεπιδρά με τον βασικό μεταγραφικό μηχανισμό που απεικονίζεται κι είναι συνδεδεμένος με το πλαίσιο TATA. Το βασικό μεταγραφικό σύμπλοκο

περιλαμβάνει την TATA-δεσμευτική πρωτεΐνη, τους μεταγραφικούς παράγοντες TAFs και TFIIs και την RNA πολυμεράση II.

Ειδικότερα, στην περίπτωση των απλών GREs, η άμεση πρόσδεση του GR σ' αυτά και η αλληλεπίδρασή του με τη βασική μεταγραφική συσκευή, έχει ως αποτέλεσμα την πρόσληψη συν-ενεργοποιητών και συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, συντελώντας στην επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων [(Oakley and Cidlowski, 2011); (Lonard and O'Malley, 2007); (Leung DY, 2003)].

Η πρόσληψη αυτή των συμπαραγόντων γίνεται μέσω αλληλεπίδρασής τους με τις μεταγραφικές λειτουργίες ενεργοποίησης (AF domains) του GR [Schäcke *et al.*, 2007]. Από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα πρόσληψης συν-ενεργοποιητών, αποτελούν η πολυμερής ATPase αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης Brg1 [(Cairns *et al.*, 1996); (Yoshinaga *et al.*, 1992)] και η ακετυλοτρανσφεράση των ιστονών (HAT) CBP/p300, μέσω της AF-1 περιοχής, και μέλη της οικογένειας των p160 πρωτεϊνών, όπως οι SRC1 και pCIP [Xu and O'Malley, 2002], μέσω της AF-2 περιοχής. Ειδικότερα, η δράση του συμπαραγόντα Brg-1 πιστεύεται πως μεταβάλλει τη σύνθεση και την τοποθέτηση των νουκλεοσωμάτων, ενώ οι ακετυλοτρανσφεράσες (HATs) προκαλούν ακετυλίωση των ιστονών H3 και H4, όπως και ορισμένες p160 πρωτεΐνες έχουν, επίσης, δράση ακετυλοτρανσφερασών. Και οι δύο αυτοί μηχανισμοί μεταβάλλουν τη δομή της χρωματίνης, καθιστώντας το DNA πιο εύκολα διαθέσιμο για ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων [Biddie SC, 2012].

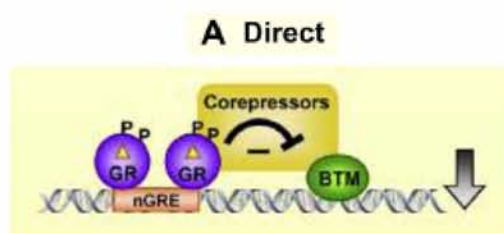
Το ποιοι συμπαραγόντες και σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης θα στρατολογηθούν, τελικά, εξαρτάται από παράγοντες, όπως η φύση του συνδεδεμένου γλυκοκορτικοειδούς, οι αλληλουχίες GREs, στις οποίες προσδέεται ο υποδοχέας [(Meijsing *et al.*, 2009); (Ronacher *et al.*, 2009)], αλλά και η διαθεσιμότητα των συν-ενεργοποιητών σε ένα συγκεκριμένο κυτταρικό πλαίσιο ή η αφθονία άλλων μεταγραφικών παραγόντων που συναγωνίζονται για τους ίδιους συν-ενεργοποιητές. Ακόμα, σημαντικό ρόλο παίζουν το επίπεδο πακεταρίσματος της χρωματίνης και η κατάσταση φωσφορυλίωσης της AF-1 περιοχής [Kleiman and Tuckermann, 2007].

Ακόμα, πρέπει να τονιστεί πως σε αντίθεση με το κλασικό μοντέλο σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων πάνω στο DNA, όπου παρατηρείται ο σχηματισμός σταθερών συμπλόκων, στην περίπτωση του GR έχει διαπιστωθεί πως ο υποδοχέας δεσμεύεται παροδικά πάνω σταγονίδια-στόχους, καθώς αποσυνδέεται και ενανασυνδέεται γρήγορα στις αλληλουχίες GREs. Η αλληλεπίδραση αυτή, δηλαδή, συμβαίνει για σύντομα χρονικά διαστήματα που διαρκούν από δευτερόλεπτα έως λεπτά. Κατ' αυτόν τον τρόπο, ο GR δρα εξαιρετικά γρήγορα και απαγκιστρώνει το εκμαγείο που έχει σχηματιστεί γύρω από τη χρωματίνη, επιτρέποντας, έτσι, την αλληλεπίδρασή του με ένα μεγάλο αριθμό πιθανών θέσεων δέσμευσης και αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών [(Biddie SC, 2012); (Lefstin JA, 1998); (Schlossmacher G, 2011); (McNally *et al.*, 2000); (Stavreva *et al.*, 2004); (Nagaich AK, 2004); (Fletcher TM, 2002)].

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι υπόλοιπες τρεις κατηγορίες GREs, οι οποίες μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα απλά GREs. Έτσι, παρακάτω επισημαίνονται τα στοιχεία εκείνα που τα διαφοροποιούν σε σχέση με όσα αναφέρθηκαν για τα απλά GREs.

ii) Αρνητικά GREs (negative GREs) (Εικόνα 1.14b): Τα στοιχεία αυτά διαφέρουν από τα κλασικά GREs που συναντώνται στους μηχανισμούς ενεργοποίησης, τόσο δομικά όσο και λειτουργικά. Αποτελούν ανάστροφες παλίνδρομες αλληλουχίες, με δομή CTCC(n)₀₋₂GGAGA ενώ ο αριθμός των νουκλεοτιδίων που χωρίζει τα δύο τμήματα του GRE κυμαίνεται από 0 έως 2 νουκλεοτιδία. Βρίσκονται διάσπαρτα στις περιοχές κοντά στον υποκινητή των γονιδίων-στόχων και καταλαμβάνονται από δύο μονομερή του GR, τα οποία, όμως, δεν διμερίζονται, όπως στα απλά GREs [Hudson *et al.*, 2013].

Μετά την πρόσδεση του υποδοχέα άμεσα πάνω στα nGREs, ακολουθεί η στρατολόγηση συν-καταστολέων, όπως είναι οι NCoR και SMRT, οι οποίοι με τη σειρά τους στρατολογούν τις αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Με αυτόν τον τρόπο, η χρωματίνη αποκτά μία κλειστή δομή που δεν ευνοεί την μεταγραφή γονιδίων [Perissi *et al.*, 2010]. Έτσι, η άμεση πρόσδεση του GR στα nGREs, έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής [Kadmiel and Cidlowski, 2013].

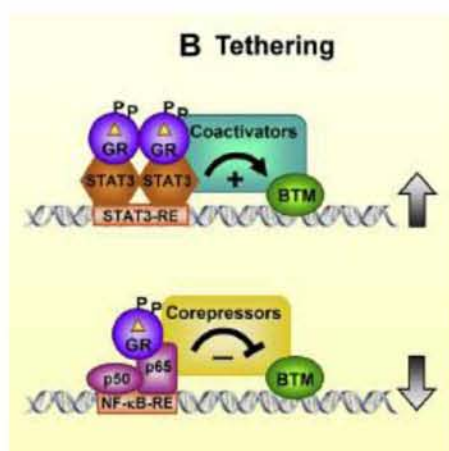


Εικόνα 1.17 Αναπαράσταση της άμεσης πρόσδεσης του GR σε ένα αρνητικό GRE (negative GRE) που έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. BTM: βασική μεταγραφική συσκευή (basal transcription machinery) [Από Oakley and Cidlowski, 2013].

iii) Προσδεδεμένα GREs (tethering GREs) (Εικόνα 1.14c και 1.14d): Στην περίπτωση αυτού του τύπου GREs παρατηρείται ένας εναλλακτικός μηχανισμός ενεργοποίησης. Σε αντίθεση με τις δύο προηγούμενες περιπτώσεις, στις οποίες ο GR προσδέεται άμεσα στα GREs, είτε επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων μέσω των

απλών GREs, είτε καταστέλλοντας τη μεταγραφή γονιδίων μέσω των nGREs, στην οδό αυτή ο GR ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση αλληλεπιδρώντας, όχι άμεσα με το DNA, αλλά με τη βοήθεια άλλων μεταγραφικών παραγόντων.

Αναλυτικότερα, τα προσδεδεμένα GREs δε διαθέτουν περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα στο DNA, αλλά περιοχές δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων. Έτσι, ο GR προσδέεται έμμεσα στα GREs, αλληλεπιδρώντας με μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι συνδέονται άμεσα στο DNA, οδηγώντας τελικά, ανάλογα με τον παράγοντα, στην επαγωγή ή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης [Oakley and Cidlowski, 2011]. Αυτή η αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης χαρακτηρίστηκε ως ‘‘μηχανισμός πρόσδεσης’’, γι’ αυτό και τα GREs ονομάστηκαν ‘‘προσδεδεμένα’’ [(Beato *et al.*, 1995); (DeBosscher *et al.*, 2003)]. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί πως ο μηχανισμός αυτός είναι πλήρως λειτουργικός ακόμα και παρουσία GR που φέρει μετάλλαξη στην περιοχή διμερισμού, γεγονός που υποδηλώνει πως στη συγκεκριμένη οδό ενεργοποίησης δεν είναι απαραίτητος ο διμερισμός του υποδοχέα προκειμένου να επέλθει ενεργοποίηση αλλά μπορεί να λάβει χώρα και μέσω GR μονομερών [(Schäcke H, 2007); (Schlossmacher G, 2011)].



Εικόνα 1.18 Αναπαράσταση της έμμεσης πρόσδεσης του GR σε ένα προσδεδεμένο GRE (tethering GRE). Ο GR αλληλεπιδρά έμμεσα με το GRE, με τη βοήθεια μεταγραφικών παραγόντων, έχοντας ως αποτέλεσμα την επαγωγή ή την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης.

BTM: βασική μεταγραφική συσκευή (basal transcription machinery) [Από Oakley and Cidlowski, 2013].

Οι πιο χαρακτηριστικοί μεταγραφικοί παράγοντες, στους οποίους προσδένεται ο GR, έχει βρεθεί πως είναι προφλεγμονώδεις παράγοντες [Kassel and Herrlich, 2007], όπως η πρωτεΐνη ενεργοποιητής-1 (activator protein 1, AP-1) [(Jonat *et al.*, 1990); (Schüle *et al.*, 1990); (Yang Yen *et al.*, 1990)], ο πυρηνικός παράγοντας-κΒ (nuclear factor-κΒ, NF-κΒ) [(De Bosscher *et al.*, 1997); (Heck *et al.*, 1997); (Ray and Prefontaine, 1994); (Scheinman *et al.*, 1995)], ο ρυθμιστικός παράγοντας ιντερφερόνης 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) [(Ogawa *et al.*, 2005); (Reily *et al.*, 2006)] και οι πρωτεΐνες μετατροπείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής (STAT proteins), με σημαντικότερες τις STAT3 και STAT5 [(Stöcklin *et al.*, 1996); (Zhang *et al.*, 1997)].

Μάλιστα, ενώ η αλληλεπίδραση του GR με μέλη της οικογένειας των STAT πρωτεϊνών, όπως με τον STAT5, είτε ανεξάρτητα είτε συνδεδεμένα με GREs, φαίνεται να μπορεί να προαγάγει τη μεταγραφική ενεργότητα συγκεκριμένων γονιδίων [Rogatsky and Ivashkin, 2006] τόσο σε κύτταρα [Stoecklin *et al.*, 1997], όσο και σε ποντικούς [(Tronche *et al.*, 2004); (Engblom *et al.*, 2007)], έχει αποδειχθεί πως η αλληλεπίδρασή του με τους παράγοντες AP-1, NF-κΒ και IRF-3 καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα των περισσότερων γονιδίων-στόχων [(Göttlicher *et al.*, 1998); (Ogawa *et al.*, 2005); (Reichardt *et al.*, 2001); (Tuckermann *et al.*, 1999)].

Όσον αφορά την καταστολή του NF-κΒ, αυτή γίνεται μέσω παρεμπόδισης από τον υποδοχέα της φωσφορυλίωσης της σερίνης 2 σε μία από τις δύο περιοχές του καρβοξυτελικού άκρου της RNA πολυμεράσης II, παρεμποδίζοντας, έτσι, την έναρξη της μεταγραφής [Schäcke H, 2007] ή μέσω της απευθείας αλληλεπίδρασης του GR με την p65 υπομονάδα του NF-κΒ. Αντίστοιχα, η καταστολή της AP-1 γίνεται μέσω απευθείας σύνδεσης της Jun υπομονάδας της πρωτεΐνης με τον υποδοχέα [(Nissen and Yamamoto, 2000); (Yang-Yen *et al.*, 1990)].

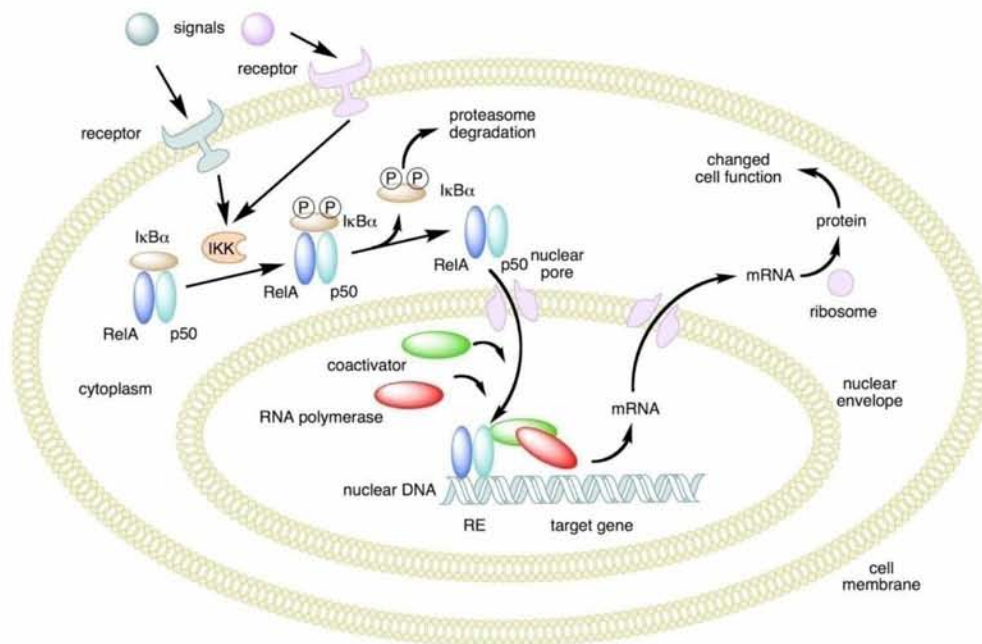
Αφού, λοιπόν, οι μεταγραφικοί παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω, ρυθμίζουν την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων, η αλληλεπίδρασή τους με τον GR αναστέλλει την ενεργότητά τους, ερμηνεύοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τις κύριες αντι-φλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών [(Necela and Cidlowski, 2004); (Newton and Holden, 2007)].

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του GR στη μεταγραφική καταστολή γονιδίων-στόχων του NF-κB

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο κύριος μηχανισμός καταστολής της γονιδιακής μεταγραφής βασίζεται στην ικανότητα του υποδοχέα να καταστέλλει τη δράση συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, όντας προσδεδεμένος πάνω σε αυτούς. Στη συγκεκριμένη παράγραφο θα παρουσιαστεί το μονοπάτι αλληλεπίδρασης του GR με τον πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, που συντελεί στην καταστολή της μεταγραφής γονιδίων-στόχων του NF-κB.

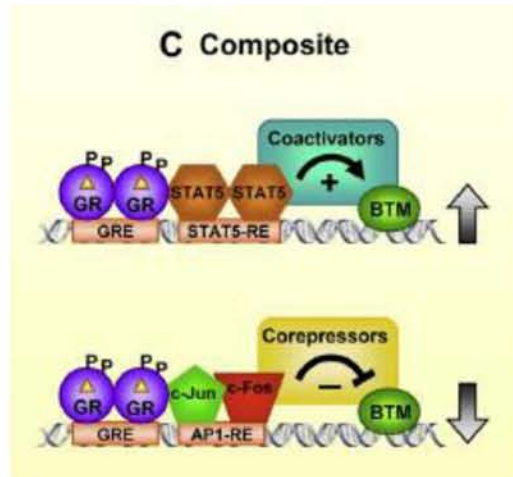
Μετά το χαρακτηρισμό της δομής του NF-κB, του αποδόθηκε η συγκεκριμένη ονομασία από την ικανότητα του να ρυθμίζει την ανοσοσφαιρινική αλυσίδα στα Βκύτταρα. Πρόκειται για ένα ετεροδιμερές μιας υπομονάδας 50kDa, της NFκB1 (p50) και μίας δεύτερης υπομονάδας 65kDa, της RelA (p65). Όπως φαίνεται και στην εικόνα, σε ανενεργή κατάσταση, ο NF-κB έχει τη μορφή ετεροδιμερούς, αποτελούμενος από τις υπομονάδες p65 και p50, και είναι αγκυροβολημένος στο κυτταρόπλασμα από τον παράγοντα IκBα. Σήματα ενεργοποίησης μέσω υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης, οδηγούν στην ενεργοποίηση της IκB κινάσης, η οποία φωσφορυλιώνει τον παράγοντα IκBα. Μετά τη φωσφορυλίωση ο IκBα υφίσταται πρωτεολυτική αποδόμηση και το ετεροδιμερές NF-κB p65/p50 περνά στο εσωτερικό του πυρήνα, όπου συνδέεται στις B περιοχές του υποκινητή φλεγμονωδών γονιδίων, ενισχύοντας τη μεταγραφή τους.

Ο GR μπορεί να εμποδίσει τη δράση του NF-κB μέσω δύο μηχανισμών. Ειδικότερα, αναστολή μπορεί να προκύψει μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ενεργοποιημένου από ορμόνη GR και του NF-κB. Ένας δεύτερος, λιγότερο πιθανός μηχανισμός της GR-μεσολαβούμενης καταστολής του NF-κB είναι η ενεργοποίηση του γονιδίου IKBA από τον GR. Η ενισχυμένη σύνθεση του IκBα αντικαθιστά τα επίπεδα του αποικοδομημένου IκBα εξουδετερώνοντας, έτσι, τον ελεύθερο NF-κB και εμποδίζοντας, εν τέλει, τη μεταγραφή φλεγμονωδών γονιδίων [Leung DY, 2003].



Εικόνα 1.19 Ο μηχανισμός δράσης του NF-κB. Σε αυτό το σχήμα φαίνεται το παράδειγμα του ετεροδιμερούς NF-κB, με τις Rel και p50 πρωτεϊνικές υπομονάδες. Σε ανενεργή κατάσταση, ο NF-κB είναι τοποθετημένος στο κυτταρόπλασμα, σε σύμπλοκο με την ανασταλτική πρωτεΐνη IκBα. Μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων, πληθώρα εξωκυτταρικών σημάτων μπορούν να ενεργοποιήσουν το ένζυμο IκB κινάση (IKK). Με τη σειρά της, η IKK φωσφορυλιώνει την IκBα πρωτεΐνη, που έχει σαν αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση, διαχωρισμό της IκBα από τον NF-κB και τελικά την αποικοδόμηση της IκBα από το πρωτεόσωμα. Ο ενεργοποιημένος NF-κB μετατοπίζεται, στη συνέχεια, στον πυρήνα, όπου προσδένεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης (Response Elements, RE). Το σύμπλοκο DNA/NF-κB στρατολογεί και άλλες πρωτεΐνες, όπως συνενεργοποιητές και την RNA-πολυμεράση, μεταγράφει το DNA που βρίσκεται καθοδικά των στοιχείων απόκρισης σε mRNA, το οποίο με τη σειρά του μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, που συντελεί σε αλλαγή της κυτταρικής λειτουργίας [(GilmoreTD, 2006); (Brasier AR, 2006); (Perkins ND, 2007)].

iv) Σύνθετα GREs (composite GREs): Τα σύνθετα GREs αποτελούνται από θέσεις, στις οποίες προσδένεται άμεσα ο υποδοχέας και από θέσεις, στις οποίες δεσμεύονται διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο NF-κB και η AP-1. Επιπλέον, όπως και τα απλά GREs, απαιτούν διμερισμό του υποδοχέα και άμεση πρόσδεσή του πάνω στο DNA [Lefstin JA, 1998]. Έτσι, σ' αυτή την περίπτωση ο GR δρα με έναν συνεργιστικό τρόπο, καθώς ρυθμίζει την επαγωγή ή καταστολή των γονιδίων-στόχων, τόσο συνδεδεμένος άμεσα στα GREs, όσο και αλληλεπιδρώντας με τους μεταγραφικούς παράγοντες που βρίσκονται σε μία γειτονική θέση στο DNA [(Kadmiel and Cidlowski, 2013); (Oakley and Cidlowski, 2013)].



Εικόνα 1.20 Αναπαράσταση της πρόσδεσης του GR σε ένα σύνθετο GRE (composite GRE). Ο GR αλληλεπιδρά τόσο άμεσα με το GRE, όσο και με τους γειτονικούς μεταγραφικούς παράγοντες, έχοντας ως αποτέλεσμα την επαγωγή ή την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης.

BTM: βασική μεταγραφική συσκευή (basal transcription machinery) [Από Oakley and Cidlowski, 2013].

1.5.2 Μη γενωμική δράση

Είναι αποδεδειγμένο πως η GR σηματοδότηση μπορεί να ακολουθήσει μία εναλλακτική οδό, ταχύτερη αλλά λιγότερο αποτελεσματική, τη μη-γενωμική (Εικόνα 1.14ε). Οι μη γενωμικές δραστηριότητες των GCs δεν χαρακτηρίζονται για την ομοιομορφία τους και γενικότερα έχουν περιγραφεί διάφοροι σχετικοί μοριακοί μηχανισμοί δράσης τους [(Buttgereit, 2004); (Tasker *et al.*, 2006)]. Σ' αυτή την περίπτωση, δεν χρειάζεται η επαγόμενη από τον πυρήνα μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του GR, μία διαδικασία που συνήθως διαρκεί μερικές ώρες.

Αντίθετα, επιτυγχάνεται γρηγορότερα μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών μεταγωγής σήματος, όπως αυτά που συνδέονται με G πρωτεΐνες, ή μέσω του κυτταροπλασματικού GR ή μέσω του δεσμευμένου στην κυτταρική μεμβράνη GR (mGR), διαδικασίες που διαρκούν λίγα λεπτά. Τέτοιου είδους ταχείες αποκρίσεις παρουσιάζουν διάφορα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού, συμπεριλαμβανομένου του ανοσοποιητικού και του καρδιαγγειακού συστήματος [(Psarra AM, 2008a); (Collingwood TN, 1999); (Kino T, 2005); (Ayroldi *et al.*, 2012); (Busillo and Cidlowski, 2013); (Lee SR, 2012); (Jiang CL, 2014); (Schäcke H, 2007); (Morimoto RI, 2002)].

Αναλυτικότερα, έχει περιγραφεί ότι οι υποδοχείς που είναι συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες (G protein coupled receptors, GPCRs) μπορούν να μεσολαβήσουν τις μη γενωμικές επιρροές των GCs [(Maier *et al.*, 2005); (Tasker *et al.*, 2006)]. Μάλιστα, θεωρείται πως για τη μεμβρανική τοποθέτηση και την ταχεία σηματοδότηση των στεροειδών είναι απαραίτητη μια αλληλουχία παλμιτουλίωσης που εντοπίζεται τόσο στον GR όσο και σε αρκετούς άλλους στεροειδείς υποδοχείς [(Marino and Ascenzi, 2006); (Pedram *et al.*, 2007)].

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

1.5.3 Μιτοχονδριακή δράση

Πρόσφατα πειραματικά δεδομένα από διάφορες ερευνητικές ομάδες αποδεικνύουν την παρουσία υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια διαφόρων τύπων ζωικών κυττάρων [Psarra *et al.*, 2006] (Εικόνα 1.14f). Η ύπαρξη των υποδοχέων στα μιτοχόνδρια σχετίζεται με τον έλεγχο μιτοχονδριακών λειτουργιών, όπως i) η ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, δρώντας ως μεταγραφικοί παράγοντες, με μηχανισμό όμοιο με αυτόν του πυρήνα ii) η επαγωγή των μιτοχονδριακών γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) και iii) η απόπτωση, η οποία θα αναλυθεί στην ενότητα 1.6.2.1 [(Psarra *et al.*, 2005); (Psarra *et al.*, 2009); (Psarra *et al.*, 2011); (Sionov *et al.*, 2006)].

1.6 Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών και μιτοχόνδρια

1.6.1 Ρόλος μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά οργανίδια ζωτικής σημασίας, τα οποία συμμετέχουν σε πληθώρα σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών [Bonawitz *et al.*, 2006]. Ενέχονται σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή ουρίας, στη βιοσύνθεση αμινοξέων και αίμης και στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, αποτελούν βασικά συστατικά της απόκρισης στο στρες [Manoli *et al.*, 2007], διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) [Duckles *et al.*, 2006], συμμετέχουν στην ανοσορρύθμιση [(Pinkoski *et al.*, 2006); (Psarra *et al.*, 2006a)], στην κυτταρική διαφοροποίηση [Seyer *et al.*, 2006], στη διαδικασία της γήρανσης [Short *et al.*, 2005] και την απόπτωση.

Η σημαντικότερη ίσως λειτουργία των μιτοχονδρίων αναγνωρίζεται στη συνεισφορά τους σε ό,τι αφορά τον ενεργειακό μεταβολισμό, καθώς αποτελούν τους βασικούς προμηθευτές ενέργειας των κυττάρων. Μέσω του μηχανισμού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) της αναπνευστικής αλυσίδας, είναι δυνατό να καλύψουν περισσότερο από το 90% των ενεργειακών αναγκών των κυττάρων σε ATP. Καθημερινά τα μιτοχόνδρια του σώματός μας παράγουν 65 Kgr ATP και συγκεκριμένα 30-32 ATP ανά μόριο γλυκόζης που διασπάται. Το μιτοχόνδριο χρησιμεύει σαν αισθητήρας των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου [Enriquez *et al.*, 1999] και ανάλογα με αυτές επιτυγχάνει διάφορα επίπεδα ρύθμισης [(Garesse and Vallejo, 2001); (Enriquez *et al.*, 1999)], προσαρμόζοντας μεταξύ άλλων τη λειτουργία των ενζύμων της OXPHOS. Όταν οι ενεργειακές ανάγκες δεν επαρκούν, αυξάνει την απόδοση σε ATP, μέσω αλλοστερικής ενεργοποίησης της OXPHOS της αναπνευστικής αλυσίδας [(Psarra and Sekeris, 2006a); (Psarra and Sekeris, 2006b)].

Τα ένζυμα της OXPHOS είναι απαραίτητα για την παραγωγή ενέργειας, καθώς για το σχηματισμό των ολοένζυμων συστατικών στοιχείων της, που θα δώσουν ενεργά αναπνευστικά σύμπλοκα, απαιτούνται γονίδια που προέρχονται τόσο από το πυρηνικό όσο και από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα [Attardi and Schatz, 1988]. Ως εκ τούτου, ο κεντρικός ρόλος των μιτοχονδρίων στο μεταβολισμό των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω συντονισμού των λειτουργιών τους με εκείνες άλλων κυτταρικών οργανιδίων, και κυρίως του πυρήνα [(Scheller *et al.*, 2003); (Scheller *et al.*, 2000);

(Psarra *et al.*, 2006a); (Scarpulla, 2006); (Garesse and Vallejo, 2001); (Scarpulla, 2002); (Goffart and Wiesner, 2003); (Dawson and Dawson, 2004); (Psarra *et al.*, 2006b); (Goldenthal and Marin-Garcia, 2004)], και ρυθμίζεται από ποικίλα εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά σήματα [Psarra and Sekeris, 2007].

1.6.2 Ρόλος του GR στα μιτοχόνδρια

Οι φυσιολογικές δράσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών δεν περιορίζονται στη δράση του ως πυρηνικού υποδοχέα, αλλά επιπλέον έχουν εντοπιστεί και λειτουργικοί υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια των κυττάρων [(Solakidi *et al.*, 2007); (Psarra and Sekeris, 2008a); (Psarra and Sekeris, 2008b); (Psarra and Sekeris, 2009)]. Πιο συγκεκριμένα, η κάθαρση των πυρηνικών υποδοχέων και η διαθεσιμότητα των αντίστοιχων αντισωμάτων, επέτρεψε την εφαρμογή διαφόρων ανοσολογικών τεχνικών, όπως είναι η Western blot, ο ανοσοφθορισμός, η συνεστιακή και η φθορίζουσα ηλεκτρονική μικροσκοπία, για την αναγνώριση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, των οιστρογόνων, των ανδρογόνων και των θυροειδών ορμονών στα μιτοχόνδρια [(Wrutniak *et al.*, 1995); (Psarra *et al.*, 2005); (Solakidi *et al.*, 2005); (Solakidi *et al.*, 2005); (Demonacos *et al.*, 1993); (Scheller *et al.*, 2000); (Moutsatsou *et al.*, 2001); (Psarra *et al.*, 2003); (Koufali *et al.*, 2003); (Sionov *et al.*, 2006); (Jönsson *et al.*, 2007); (Moats and Ramirez, 2000); (Monje and Boland, 2001); (Yang *et al.*, 2004); (Cammarata *et al.*, 2004); (Milner *et al.*, 2005); (Pedram *et al.*, 2006); (Sterling *et al.*, 1984); (Ardail *et al.*, 1993); (Casas *et al.*, 2003); (Noteboom and Gorski, 1965); (Grossman *et al.*, 1989); (Schwend and Gustafsson, 2006); (Yang *et al.*, 2006)].

Μάλιστα, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ήταν ο πρώτος υποδοχέας που ανιχνεύθηκε στα μιτοχόνδρια με αυτή τη μεθοδολογία. Χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα αντισώματα έναντι του GR α και του GR β , έγινε φανερό ότι η α ισομορφή του υποδοχέα ανιχνεύθηκε στα μιτοχόνδρια, παράλληλα με την παρουσία του στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα, ενώ η ισομορφή β περιοριζόταν αποκλειστικά στον πυρήνα και συσσωρεύονταν κατά προτίμηση στους πυρηνίσκους [Psarra *et al.*, 2005].

Έρευνες από πολλά εργαστήρια υπογραμμίζουν ως πρωταρχικό ρόλο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια, τη λειτουργία του ως μεταγραφικό παράγοντα στη μεταγραφή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, με

παρόμοιο τρόπο με τη δράση του υποδοχέα στο πυρηνικό γονιδίωμα. Επιπλέον, αρκετές δημοσιεύσεις αναφέρονται στις επαγωγικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών στη μεταγραφή πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων της OXPPOS, οι οποίες επιτελούνται τόσο με έμμεση, όσο και με απ' ευθείας δράση των γλυκοκορτικοειδών στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, σε διάφορα όργανα όπως η καρδιά, οι σκελετικοί μύες, ο νεφρός και ο εγκέφαλος [Psarra and Sekeris, 2008b]. Έτσι, η παρουσία των υποδοχέων τόσο στον πυρήνα όσο και στα μιτοχόνδρια, μαρτυρεί μια άμεση αλληλεπίδραση των δύο οργανιδίων για το συντονισμό της μεταγραφής γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα της OXPPOS.

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι τα μιτοχόνδρια προσλαμβάνουν ποικίλα ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια προ- και αντι-αποπτωτικά σήματα, διαδραματίζοντας, έτσι, καθοριστικό ρόλο στη μοίρα του κυττάρου, στη διαίρεση, την αύξηση, τη διαφοροποίηση, την επιβίωση και την απόπτωση [(Li *et al.*, 2000); (Goldenthal and Marin-Garcia, 2004); (Gulbins, 2003); (Herr *et al.*, 2007)]. Η τελευταία παρουσιάζεται αναλυτικά στην επόμενη ενότητα.

1.6.2.1 Ρόλος του GR στην απόπτωση

Η απόπτωση είναι άλλη μία ζωτικής σημασίας κυτταρική διαδικασία, στην οποία τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο. Τα μιτοχόνδρια προσλαμβάνουν και ενσωματώνουν μία σειρά ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων αποπτωτικών σημάτων και σημάτων επιβίωσης, όπως είναι οι στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες εκδηλώνουν την αποπτωτική ή αντιαποπτωτική δράση τους, μέσω των αντίστοιχων μιτοχονδριακών υποδοχέων τους. Παρά την ύπαρξη μεγάλου αριθμού ερεθισμάτων και συνθηκών, τόσο φυσιολογικών όσο και παθολογικών, που μπορούν να οδηγήσουν ένα κύτταρο σε απόπτωση, δεν πρόκειται όλα τα κύτταρα να ακολουθήσουν αυτή την οδό, κάτω υπό την επίδραση του ίδιου ερεθίσματος. Με βάση το είδος του κυττάρου-στόχου, η ίδια ορμόνη μπορεί να δράσει σαν αποπτωτικός παράγοντας ή σαν παράγοντας επιβίωσης, εν μέρει εξαιτίας της ιστοειδικότητας του μιτοχονδρίου. Τα γλυκοκορτικοειδή, για παράδειγμα, προστατεύουν κύτταρα επιθηλιακών οργάνων, όπως κύτταρα του μαστικού αδένου, θυλακοειδή κύτταρα και ηπατοκύτταρα, έναντι αποπτωτικών ερεθισμάτων [Evans-Storms and Cidlowski, 1995], ενώ αποτελούν αποπτωτικούς παράγοντες για κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα

μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα θυμοκύτταρα και τα λευχαιμικά κύτταρα [(Herr *et al.*, 2007); (Tuckermann *et al.*, 2005)].

Ως απόπτωση ορίζεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, ο οποίος περιλαμβάνει την γενετικά καθορισμένη εξάλειψη των κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της γήρανσης ενός πολυκύτταρου ευκαρυωτικού οργανισμού κι αποτελεί μηχανισμό ομοιόστασης απέναντι σε οποιαδήποτε πιθανότητα αλλαγής του πληθυσμού των κυττάρων στους ιστούς. Επιπλέον, αποτελεί μηχανισμό άμυνας του οργανισμού σε περιπτώσεις ανοσολογικών αντιδράσεων ή καταστροφής των κυττάρων από επιβλαβείς ή παθογόνους παράγοντες, ενώ αποτελεί και σημαντική άμυνα ενάντια στον καρκίνο, καθώς μέσω της απόπτωσης απομακρύνονται τα καρκινικά κύτταρα [(Elmore S., 2007); (Debnath J, 2005); (Herr and Debatin, 2001)].

Η απόπτωση, επομένως, είναι σημαντική, όχι μόνο στην ανάπτυξη των ιστών, αλλά και στην ανοσοποιητική άμυνα, καθώς και στην εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων, ενώ η λανθασμένη ενεργοποίησή της ενέχεται σε νευρομυϊκές εκφυλιστικές ασθένειες [(Wallace, 1999); (Lin and Beal, 2006)], όπως το Alzheimer, το Parkinson και η αμυοτροφική πλευρική σκλήρωση, και με τον καρκίνο [(Kroemer, 2006); (Chen *et al.*, in press); (Chen *et al.*, 2007)].

Η απόπτωση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση δύο μονοπατιών που οδηγούν στην αυτοκτονία του κυττάρου με μια χαρακτηριστική διαδικασία: το κύτταρο γίνεται πιο συμπαγές, δημιουργούνται αποπτωτικά κυστίδια, η χρωματίνη συμπυκνώνεται και το DNA κατακερματίζεται. Τα νεκρά κύτταρα διασπώνται σε οριοθετημένα από μεμβράνη θραύσματα και μπορεί να εγκολληθούν από γειτονικά κύτταρα με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης [(Robertson and Orrenius, 2000); (Μαρκουλάτος Π.)].

Επιπρόσθετα, η απόπτωση αποτελεί μια πολύ καλά συντονισμένη διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα με την ενεργοποίηση μιας ομάδας πρωτεασών κυστεΐνης, ασπαρτικού οξέος, γνωστές ως κασπάσες. Στα περισσότερα κύτταρα, οι κασπάσες απαντώνται ως ανενεργά προένζυμα, γνωστά ως προκασπάσες, οι οποίες περιλαμβάνουν ένα πεπτιδίο στο αμινοτελικό τους άκρο. Η αντίδραση ενεργοποίησης περιλαμβάνει πρωτεόλυση του πεπτιδίου στο αμινοτελικό τους άκρο, γεγονός που συντελείται είτε από άλλες κασπάσες είτε από τις ίδιες, και επακόλουθη διάσπαση της υπόλοιπης πρωτεΐνης σε μία μικρή και μία μεγάλη υπομονάδα. Με τη σειρά τους, οι ενεργές πλέον κασπάσες μπορούν να ενεργοποιήσουν άλλες ανενεργές προκασπάσες,

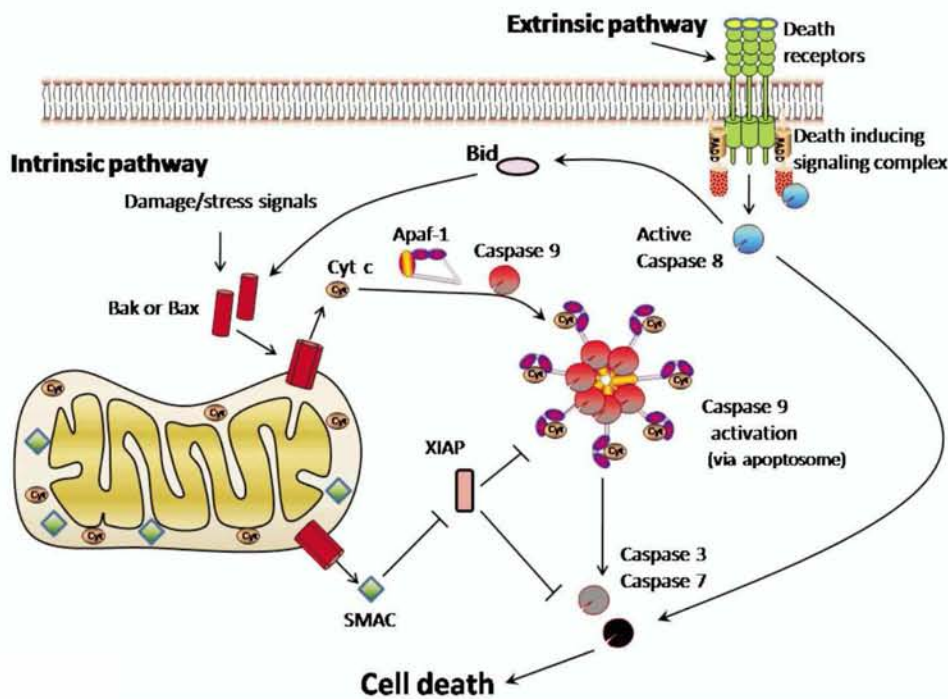
ενισχύοντας έτσι το αρχικό αποπτωτικό σήμα και οδηγώντας το κύτταρο σε ταχύ και μη αναστρέψιμο, πλέον, κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, η αυτοκαταλυτική αποκοπή που οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας προκασπάσης, συντελείται κατόπιν διμερισμού, δεδομένου του ότι οι περισσότερες προκασπάσεις απαντώνται ως διμερή. Έτσι, οι κασπάσες που διαθέτουν πρωτεολυτική δράση, μπορούν να διασπούν πρωτεΐνες σε υπολείμματα ασπαρτικού οξέος. Διαφορετικές κασπάσες δρουν σε συγγενείς αλλά όχι πανομοιότυπους στόχους, καθώς διαφέρουν στην ειδικότητα αναγνώρισης των γειτονικών αμινοξέων. Στα θηλαστικά υπάρχουν περίπου 14 μέλη της οικογένειας των κασπασών ενώ στην απόπτωση συμμετέχουν οι κασπάσες 3 και 6 έως 10 [(Cohen GM, 1997); (Rai NK, 2005)].

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω υπάρχουν δύο μονοπάτια που μπορούν να προκαλέσουν απόπτωση σε ένα κύτταρο, τα οποία αποδεδειγμένα, πλέον, συνδέονται σε βαθμό που η δράση του ενός επηρεάζει το άλλο. Το πρώτο είναι το εξωγενές μονοπάτι ή μονοπάτι του υποδοχέα θανάτου και το δεύτερο είναι το ενδογενές μονοπάτι ή μιτοχondριακό μονοπάτι [(Igney FH, 2002); (Thornberry and Lazebnik, 1998)].

Εξωγενές μονοπάτι ή μονοπάτι του υποδοχέα θανάτου: Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των διαμεμβρανικών υποδοχέων θανάτου, γεγονός που προκαλεί τον καταρράκτη κασπασών, ο οποίος καταλήγει στην απόπτωση [Elmore, 2007]. Οι υποδοχείς θανάτου ανήκουν στην υπεροικογένεια των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF), στους οποίους προσδένονται μέλη αυτής της οικογένειας κυτοκινών, όπως ο TNF, ο Fas και ο TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). Το συγκεκριμένο μονοπάτι μελετήθηκε με τη βοήθεια των μοντέλων FasL/FasR και TNF- α /TNF-R1. Ο υποδοχέας Fas (Fas Receptor, FasR) είναι ένας υποδοχέας της κυτταρικής επιφάνειας, συγγενικός με τον υποδοχέα του TNF και ο προσδέτης FasL (Fas Ligand, FasL) είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που είναι συγγενική με τον TNF. Οι αποκρίσεις φαίνεται ότι ενεργοποιούνται από μια ενδοκυτταρική επικράτεια των υποδοχέων, μήκους ~80 αμινοξέων, που εντοπίζεται κοντά στο C-τελικό άκρο. Η επικράτεια αυτή είναι μέτρια συντηρημένη (~28%) μεταξύ του υποδοχέα Fas και του TNF-R1 και ονομάζεται επικράτεια θανάτου (death domain) [Μαρκουλάτος Π.].

Ο FasR σχηματίζει ένα ομοτριμερές, το οποίο συναρμολογείται πριν από την αλληλεπίδραση με τον προσδέτη. Η σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα οδηγεί τα τριμερή του υποδοχέα να συγκροτήσουν μεγάλα συσσωματώματα, καθώς

στρατολογούνται κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες προσαρμογείς, οι οποίες κάνουν ορατές τις αντίστοιχες περιοχές «θανάτου» των υποδοχέων. Συγκεκριμένα, η πρόσδεση του FasL στον FasR οδηγεί στην πρόσδεση της πρωτεΐνης προσαρμογέα FADD, ενώ η πρόσδεση του TNF-α στον TNF-R1 οδηγεί στην πρόσδεση της πρωτεΐνης προσαρμογέα TRADD και στην στρατολόγηση των FADD και RIP. Στο σημείο αυτό σχηματίζεται στο σύμπλοκο επαγωγής θανάτου DISC (Death Inducing Signaling Complex, DISC), στο οποίο ο FADD αλληλεπιδρά με την προκασπάση 8, μέσω διμερισμού της περιοχής «θανάτου» του τελεστή, οδηγώντας στην αυτοκαταλυτική ενεργοποίησή της. Αμέσως μόλις ενεργοποιηθεί η κασπάση 8, ενεργοποιεί με τη σειρά της την κασπάση 3 και την κασπάση 7, μέσω ενός μιτοχονδριακά εξαρτώμενου ή μη μηχανισμού, και ξεκινά η απόπτωση (Εικόνα 1.21). Στο μιτοχονδριακά εξαρτώμενο μηχανισμό, το μονοπάτι μετατοπίζεται από την κυτταρική μεμβράνη στο μιτοχόνδριο, όταν η κασπάση 8 τέμνει μία πρωτεΐνη-μέλος της Bcl-2 οικογένειας, την Bid. Η τομή αυτή απελευθερώνει την καρβοξυτελική επικράτεια της Bid, η οποία στη συνέχεια μετατοπίζεται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, όπου ευθύνεται για την έκλυση του κυτοχρώματος c και τελικά την επαγωγή της απόπτωσης, με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω [(Hsu H, 1995); (Herr *et al.*, 2007); (Hyer *et al.*, 2008); (Konopleva *et al.*, 2004); (Μαρκουλάτος Π.); (Madesh *et al.*, 2002)].



Εικόνα 1.21 Εξωγενώς και ενδογενώς επαγόμενοι αποπτωτικοί μηχανισμοί [Από Chin J, 2011].

Ενδογενές μονοπάτι ή μιτοχονδριακό μονοπάτι: Το ενδογενές μονοπάτι πυροδοτεί την απόπτωση μέσω των μιτοχονδρίων και λαμβάνει χώρα σε απόκριση ενός μεγάλου αριθμού ερεθισμάτων, τα οποία μπορούν και δρουν απευθείας στα κύτταρα-στόχους, χωρίς να είναι αναγκαία η πρόσδεσή τους σε κάποιον υποδοχέα. Τα ερεθίσματα αυτά πηγάζουν από το μιτοχόνδριο και είναι ικανά να έχουν είτε θετικές είτε αρνητικές επιπτώσεις. Η ύπαρξη ενός αρνητικού σήματος προϋποθέτει την απουσία συγκεκριμένων αυξητικών παραγόντων, ορμονών και κυτοκινών, ώστε το κύτταρο να είναι ανίκανο να καταστείλει την επικείμενη απόπτωση. Μεταξύ των σημάτων με θετική επίδραση συναντώνται η ακτινοβολία, οι τοξίνες, η υποξία, η υπερθερμία, οι ιογενείς λοιμώξεις και οι ελεύθερες ρίζες [Elmore S, 2007].

Όλα αυτά τα ερεθίσματα προκαλούν αλλαγές στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη που οδηγούν τελικά στο σχηματισμό πόρων στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αυτή η αλλαγή στην διαπερατότητα της μεμβράνης, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού δυναμικού και την απελευθέρωση δύο κύριων ομάδων προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών από το διαμεμβρανικό χώρο στο κυτοσόλιο [Saelens X, 2004].

Η πρώτη ομάδα πρωτεϊνών απαρτίζεται από το κυτόχρωμα c, τη Smac/DIABLO και την πρωτεάση της σερίνης HtrA2/Omi. Οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούν το εξαρτώμενο από τις κασπάσες μιτοχονδριακό μονοπάτι της απόπτωσης. Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες Smac/DIABLO και HtrA2/Omi προωθούν την απόπτωση μέσω καταστολής της δράσης των αναστολέων της απόπτωσης (inhibitor of apoptosis, IAP). Φυσιολογικά, οι IAP μπορούν να προσδεθούν σε προκασπάσες και ενεργοποιημένες κασπάσες και να αναστείλουν την ενεργότητά τους, άρα και την απόπτωση. Ωστόσο, οι παραπάνω πρωτεΐνες, όπως η Smac, η οποία απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια παράλληλα με το κυτόχρωμα c, δρουν προσδένοντας τις IAP και επάγοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, την απόπτωση [Μαρκουλάτος Π.].

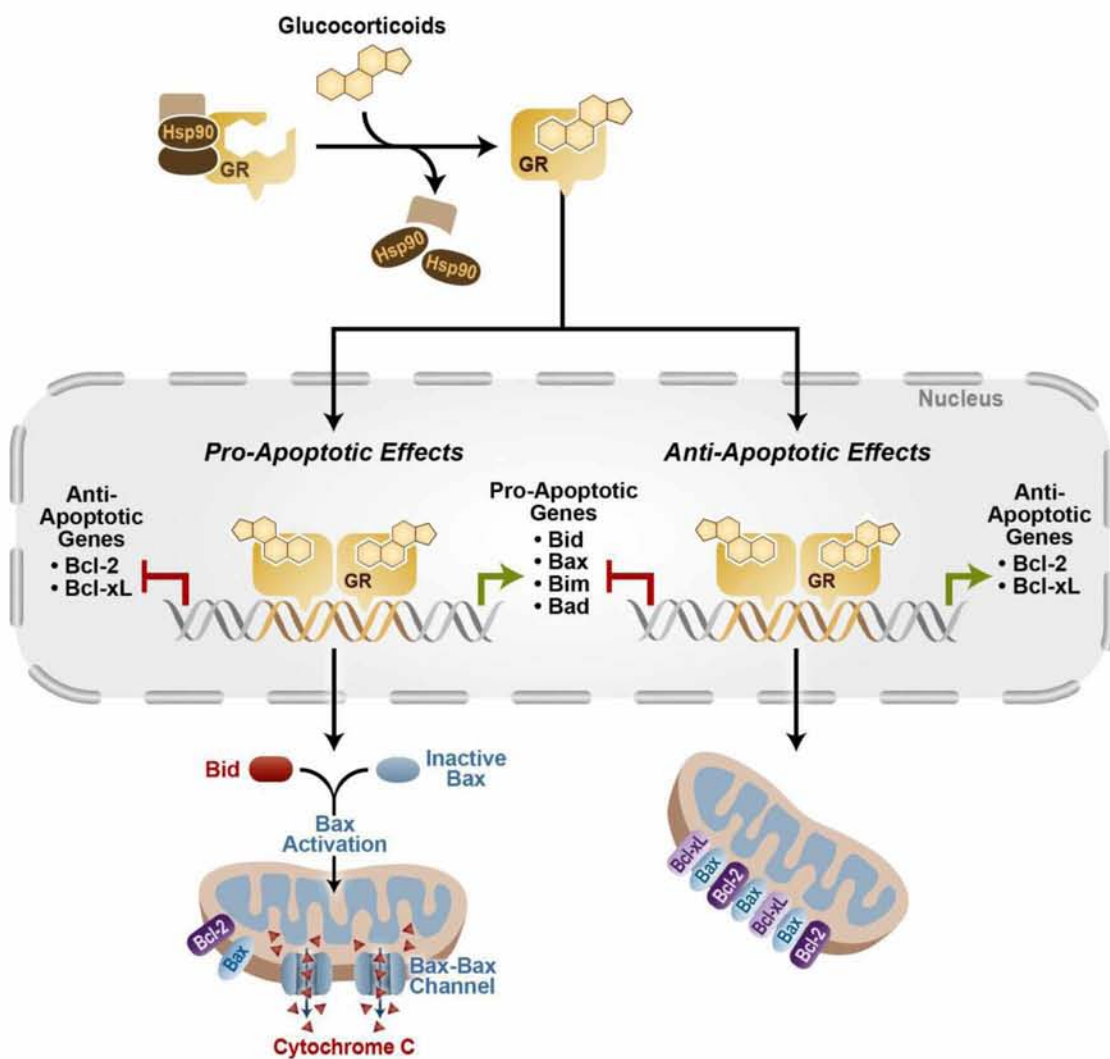
Βλάβες στο DNA οδηγούν σε ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53, που αποτελεί προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53. Η πρωτεΐνη αυτή ενεργοποιεί τον παράγοντα BAX, ο οποίος απελευθερώνει τον αποπτωτικό παράγοντα Bcl-2 από την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Araf-1, η οποία απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα. Ο παράγοντας BAX εισέρχεται στα μιτοχόνδρια δημιουργώντας πόρους, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος από τα μιτοχόνδρια, γεγονός που αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο ελέγχου στο μονοπάτι της απόπτωσης.

Έτσι, στο κυτταρόπλασμα έρχονται σε επαφή η πρωτεΐνη Araf-1 με το κυτόχρωμα c, το οποίο τη διευκολύνει να προσδέσει ATP. Το γεγονός αυτό προκαλεί τον ολιγομερισμό της Araf-1, η οποία αλλάζει τη στερεοδιαμόρφωσή της και εκθέτει την επικράτεια πρόσδεσης κασπάσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεση της προκασπάσης 9 στην Araf-1 και τη δημιουργία ενός συμπλόκου που ονομάζεται αποπτώσωμα, όπου και πυροδοτείται η αυτοκαταλυτική ενεργοποίηση της προκασπάσης 9. Η ενεργή κασπάση 9 με τη σειρά της τέμνει την προκασπάση 3 για να δημιουργήσει την κασπάση 3 και άρα να συντελέσει στην έναρξη της απόπτωσης, καθώς η κασπάση 3, μέσω άγνωστων μηχανισμών, εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου, διασπά την πρωτεΐνη PARP (polyADP ribose polymerase) και οδηγεί σε κατάτμηση του DNA. Η κασπάση 9 ενεργοποιεί, επίσης, τις κασπάσες 6 και 7 [(Garrido C, 2006); (Du C, 2000); (Μαρκουλάτος Π.)].

Η δεύτερη ομάδα προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών αποτελείται από τις AIF, ενδονουκλεάση G και CAD, οι οποίες απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, αφού δηλαδή έχει προγραμματιστεί ο θάνατος του κυττάρου. Ειδικότερα, η πρωτεΐνη AIF μεταναστεύει στον πυρήνα, όπου και προκαλεί τον κατακερματισμό του DNA και τη συμπύκνωση της περιφερικής πυρηνικής χρωματίνης. Η ενδονουκλεάση G φυσιολογικά βρίσκεται μέσα στο μιτοχόνδριο και εμπλέκεται στην αντιγραφή του DNA. Σε κύτταρα που διενεργούν απόπτωση, το ένζυμο αυτό απελευθερώνεται από το μιτοχόνδριο και μεταναστεύει στον πυρήνα, όπου διασπά την πυρηνική χρωματίνη βοηθώντας, έτσι, τον σχηματισμό θραυσμάτων ολιγονουκλεοσωματικού DNA. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες δρουν ανεξάρτητα από την παρουσία κασπασών. Τέλος, παρατηρείται απελευθέρωση της πρωτεΐνης CAD από τα μιτοχόνδρια και μετατόπισή της στον πυρήνα, όπου μετά από διάσπαση της από την κασπάση 3, προκαλεί κατακερματισμό των DNA ολιγονουκλεοσωμάτων και περεταίρω συμπύκνωση της χρωματίνης [(Susin SA, 2000); (Enari M, 1998)].

Η οδός αυτή ελέγχεται από μέλη της Bcl-2 πρωτεϊνικής οικογένειας [(Breckenridge *et al.*, 2003); (Daniel *et al.*, 2003)], καθώς οι πρωτεΐνες αυτές ελέγχουν τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας είναι τόσο προ-αποπτωτικά, παραδείγματος χάρη οι παράγοντες Bim, Bid, Bak, Bad και Bax, όσο και αντι-αποπτωτικά, όπως οι παράγοντες Bcl-2, Mcl-1 και Bcl-xL, γεγονός που επεξηγεί την ικανότητα των πρωτεϊνών αυτών να καθορίζουν αν το κύτταρο βρίσκεται σε διαδικασία απόπτωσης ή όχι, καθώς κάποια μέλη είναι απαραίτητα για την απόπτωση ενώ άλλα για την επιβίωση του κυττάρου.

Για παράδειγμα, κατά τη σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών σε καταστάσεις stress, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των προαποπρωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών, όπως του Bim, το οποίο ενεργοποιεί τις προαποπρωτικές πρωτεΐνες Bax/Bak και αυτές με τη σειρά τους διαταράσσουν το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, έχοντας ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλων αποπρωτικών πρωτεϊνών, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την έναρξη του αποπρωτικού μονοπατιού, όπως παρουσιάστηκε προηγουμένως [(Saleh *et al.*, 1999); (Ploner C, 2008); (Adams JM, 1998); (Schuler M, 2001)].



Εικόνα 1.22 Η σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών μέσω του GR που αλλάζει τόσο τα προ- όσο και τα αντι-αποπρωτικά γονίδια και μπορεί να οδηγήσει είτε στην απόπρωση είτε στην επιβίωση του κυττάρου, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου ή τον ιστό [Από Gruver-Yates and Cidlowski, 2013].

Βάση μελετών, στην πλειοψηφία των υπό εξέταση κυτταρικών τύπων τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν απόπτωση μέσω του ενδογενούς μονοπατιού. Αυτό γίνεται μέσω επαγωγής των προ-αποπτωτικών μελών της Bcl-2 πρωτεϊνικής οικογένειας [(Lu *et al.*, 2007); (Han *et al.*, 2001)] ή/και μέσω καταστολής των αντι-αποπτωτικών της μελών [(Lu *et al.*, 2007); (Violette *et al.*, 2002)]. Έτσι, η επιδεκτικότητα ενός κυττάρου στην απόπτωση εξαρτάται από την αναλογία των προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών μετά την επίδραση των γλυκοκορτικοειδών, η οποία συχνά είναι ιστο- ή/και κυτταρο-ειδική [(Ashwell JD, 2000); (Gruver-Yates and Cidlowski, 2013)]. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί πως η μιτοχονδριακή μετατόπιση του GR, παρατηρήθηκε μόνο σε κύτταρα που αποκρίνονται στην επαγόμενη από τα γλυκοκορτικοειδή απόπτωση και όχι στους ανθεκτικούς στα γλυκοκορτικοειδή κυτταρικούς τύπους. Το γεγονός αυτό εξαιρεί μία ποιοτική διαφορά στη συμπεριφορά του GR, η οποία μπορεί να εξηγήσει τη διαφορετική απόκριση ορισμένων καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή [Schlossmacher *et al.*, 2011].

Ολοκληρώνοντας την ενότητα της απόπτωσης, πρέπει να γίνει διάκριση μεταξύ δύο εννοιών που συχνά συγχέονται, της απόπτωσης και της νέκρωσης. Πρόκειται για δύο διαφορετικές διαδικασίες, ικανές να συμβούν σε ένα κύτταρο ανεξάρτητα, διαδοχικά αλλά και ταυτόχρονα. Συνήθως, το είδος αλλά και η ισχύς του ερεθίσματος καθορίζουν αν τα κύτταρα θα ακολουθήσουν την οδό της απόπτωσης ή της νέκρωσης. Σε χαμηλές δόσεις ένας μεγάλος αριθμός ζημιογόνων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της θερμότητας και της ακτινοβολίας, μπορούν να οδηγήσουν ένα κύτταρο σε απόπτωση, αλλά τα ίδια ερεθίσματα σε υψηλότερες δόσεις μπορούν να το οδηγήσουν σε νέκρωση. Με άλλα λόγια, η νέκρωση χαρακτηρίζεται από εκτενή κυτταρική λύση σε περιπτώσεις οξέων και μη φυσιολογικών τραυματισμών [(Debnath J, 2005); (Formigli L, 2000)].

1.7 Υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών και γλυκονεογένεση

1.7.1 Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών στη ρύθμιση της γλυκονεογένεσης

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών συμμετέχει και ρυθμίζει μία ποικιλία φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών και βιολογικών μονοπατιών, ασκώντας τη

δράση του είτε ως πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας, είτε δρώντας άμεσα ή έμμεσα στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα.

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες, στις οποίες εμπλέκεται ο GR, είναι ο έλεγχος του ενεργειακού μεταβολισμού, μέσω της επαγωγής ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Σημαντική, ωστόσο, είναι και η εμπλοκή του στη μεταγραφική ρύθμιση ενζύμων της γλυκονεογένεσης.

Η επαγόμενη από τα γλυκοκορτικοειδή σύνθεση ενζύμων της γλυκονεογένεσης, μεταξύ αυτών και της PEPCK, είναι μία σημαντική διαδικασία για τη μακροχρόνια συντήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης κατά τη στρεσογόνο περίοδο στα σπονδυλωτά [Hanson and Reshef, 1997]. Έτσι, τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ενεργειακής ισορροπίας [La Fleur, 2006].

Η γλυκόζη χρησιμεύει ως μία από τις κύριες πηγές ενέργειας στο ανθρώπινο σώμα και ειδικά στον εγκέφαλο. Σε ένα ζωντανό οργανισμό, το ήπαρ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος, ελέγχοντας την ισορροπία μεταξύ της πρόσληψης γλυκόζης από το ήπαρ και της παραγωγής γλυκόζης από το ίδιο όργανο. Η ρύθμιση αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διατροφική κατάσταση του οργανισμού.

Εάν τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι μεγαλύτερα απ' ό,τι χρειάζεται για τον κυτταρικό μεταβολισμό, η περίσσεια της γλυκόζης αποθηκεύεται υπό τη μορφή γλυκογόνου ή συντίθεται λίπος. Η ινσουλίνη και η γλυκόζη δρουν συνεργιστικά στην προώθηση της έκφρασης γονιδίων που χρησιμεύουν στη δέσμευση γλυκόζης και στη σύνθεση λιπαρών οξέων.

Αντίθετα, σε περιπτώσεις μειωμένης πρόσληψης υδατανθράκων, τα αποθέματα γλυκογόνου καταβολίζονται για να δώσουν γλυκόζη, ενώ παράλληλα όταν η πρόσληψη υδατανθράκων είναι μειωμένη για μεγάλο διάστημα, απαιτείται η παραγωγή γλυκόζης, ώστε η συγκέντρωσή της να διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα στο πλάσμα του αίματος. Αυτό δύναται να γίνει με προώθηση της διαδικασίας της γλυκονεογένεσης.

Η γλυκονεογένεση αναφέρεται στο μεταβολικό μονοπάτι, όπου μόρια γλυκόζης συντίθενται από μη υδατανθρακικά πρόδρομα μόρια, όπως το γαλακτικό, τα αμινοξέα και η γλυκερόλη. Ρυθμίζεται από την ενεργότητα τριών ενζύμων: της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), της

φωσφοφρουκτοκινάσης και της φωσφατάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6Pase). Δεν έχουν όλοι οι κυτταρικοί τύποι τη δυνατότητα της γλυκονεογένεσης, ενώ όλη η διαδικασία έχει μελετηθεί εκτενέστερα κυρίως σε ό, τι αφορά τους φυσιολογικούς ρόλους της PEPCK.

1.7.2 Η καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK)

Η PEPCK καταλύει ένα περιοριστικό βήμα του ρυθμού της γλυκονεογένεσης, συνεπώς η ενεργότητα του ενζύμου καθορίζει το ποσό της γλυκόζης που δύναται να παραχθεί. Γι' αυτό, τόσο το γονίδιο όσο και η πρωτεΐνη της PEPCK φαίνεται να υπόκεινται σε ρύθμιση από έναν αριθμό διάφορων φυσιολογικών καταστάσεων. Ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα, το ποσό της πρωτεΐνης της PEPCK αυξάνεται ή μειώνεται δραματικά, με την κυτταροπλασματική ισομορφή του ενζύμου να είναι αυτή που ποικίλλει περισσότερο σε έκφραση.

Η κυριότερη ρύθμιση, στην οποία υπόκειται η PEPCK, πραγματοποιείται σε μεταγραφικό επίπεδο. Η μεταγραφή του γονιδίου της PEPCK αυξορρυθμίζεται από διάφορα φυσιολογικά σήματα, συμπεριλαμβανομένων ορμονών, την τιμή του ενδοκυτταρικού pH, τη μερική πίεση του οξυγόνου και πιθανότατα ακόμα και από τη γλυκόζη ή κάποιον από τους μεταβολίτες της. Ένα δίκτυο από ρυθμιστικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των HNF4α, GR, FoxO1 και PGC1-α, δείχτηκε πως συνεργάζονται στη ρύθμιση της έκφρασης της PEPCK σε κατάσταση δίαιτας.

Η μεταγραφή της PEPCK έχει μελετηθεί εκτενώς σε ιστούς, όπως το ήπαρ, οι νεφροί και ο λιπώδης ιστός. Πιο πρόσφατα έχει παρατηρηθεί ενδιαφέρον και για την έκφρασή της στους πνεύμονες και στο έντερο. Παρ' όλα αυτά, ελάχιστα είναι γνωστά για τη μεταγραφική της ρύθμιση στον εγκέφαλο.

Οι ορμόνες που ελέγχουν τη μεταγραφή της PEPCK είναι η γλυκαγόνη, τα γλυκοκορτικοειδή (τόσο τα φυσικά στεροειδή, όπως η κορτιζόλη, όσο και τα συνθετικά στεροειδή, όπως η δεξαμεθαζόνη), οι ορμόνες του θυρεοειδούς αδένος και το ρετινοϊκό οξύ, παρουσιάζοντας μια ισχυρή γλυκονεογενετική δράση. Η γλυκαγόνη αυξάνει τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού cAMP, το οποίο αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου της PEPCK, δρώντας μέσω ενός στοιχείου που αποκρίνεται στο cAMP (cAMP Response Element, CRE). Το “αποκρινόμενο στοιχείο” αναφέρεται σε ένα τμήμα του DNA ανοδικά της κωδικής περιοχής της πρωτεΐνης PEPCK, που αυξάνει

τη μεταγραφή, όταν κατάλληλος συνδυασμός μορίων cAMP και συνδεδετικών πρωτεϊνών παρίστανται στον πυρήνα. Παρομοίως, οι στεροειδείς ορμόνες δρουν μέσω ενός στοιχείου που αποκρίνεται στα γλυκοκορτικοειδή (GRE), το οποίο εντοπίζεται στη ρυθμιστική περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της PEPCK.

1.8 Τα τριτερπένια

1.8.1 Γενικές πληροφορίες

Τα τερπένια ή τερπενοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών. Στους δευτερογενείς μεταβολίτες ανήκουν, ακόμη, τα αλκαλοειδή και οι φαινολικές ενώσεις. Οι περισσότερες από τις διαφορετικές ενώσεις της ομάδας αυτής είναι αδιάλυτες στο νερό, γι' αυτό και υπάρχουν στην επίγεια αλλά και στη θαλάσσια χλωρίδα και πανίδα. Η ονομασία τερπένιο προέρχεται από τη γερμανική λέξη *terpentin* (νέφτι), διότι από το προϊόν αυτό απομονώθηκαν τα πρώτα μέλη της ομάδας [Taiz and Zeiger, 2012].

Με βάση την αφθονία και την ποικιλία τους, τα τερπένια μπορούν να αξιοποιηθούν σε μια σειρά από βιομηχανικές και ιατρικές εφαρμογές ενώ η διατήρησή τους, κυρίως στο φυτικό βασίλειο, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, τόσο εξελικτικά όσο και λειτουργικά [Bhatti HN, 2014]. Πιο αναλυτικά, στη φαρμακοβιομηχανία έχουν αξιοποιηθεί για τις δυνατότητες και την αποτελεσματικότητά τους ως φάρμακα, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη μενθόλη, στη βιομηχανία τροφίμων έχουν χρησιμοποιηθεί ως ενισχυτικά γεύσης, ενώ το πιο ευρέως γνωστό και συχνά χρησιμοποιούμενο τερπένιο είναι το φυσικό καουτσούκ.

Τα τερπένια σχηματίζονται από τη σύντηξη μονάδων ισοπρενοειδών με πέντε άτομα άνθρακα. Οι βασικές δομικές μονάδες των τερπενίων μερικές φορές ονομάζονται και μονάδες ισοπρενίου, επειδή τα τερπένια μπορεί να αποσυντεθούν σε υψηλές θερμοκρασίες και να σχηματίσουν ισοπρένιο. Κατά συνέπεια, τα τερπένια είναι ολιγομερείς μεταβολίτες του πυροφωσφορικού ισοπεντανίου, αποτελούμενοι από έξι μονάδες ισοπρενίου (C_6H_8), γι' αυτό και μερικές φορές αναφέρονται ως ισοπρενοειδή [Taiz and Zeiger, 2012].

Η ταξινόμηση των τερπενίων γίνεται σύμφωνα με τον αριθμό των μονάδων C_5 (ισοπρενοειδών) που περιέχουν, αν και μερικές φορές μπορεί να καταστεί δύσκολη η αναγνώριση των καταλοίπων με τα πέντε άτομα άνθρακα, λόγω των εκτεταμένων

μεταβολικών τροποποιήσεων που υφίστανται τα αρχικά μόρια. Έτσι, τερπένια με 10 άτομα άνθρακα, που αποτελούνται από δύο μονάδες C₅, ονομάζονται μονοτερπένια. Τερπένια με 15 άτομα άνθρακα (τρεις μονάδες C₅) ονομάζονται σεσκιτερπένια και τερπένια με 20 άτομα άνθρακα (τέσσερις μονάδες C₅) ονομάζονται διτερπένια. Μεγαλύτερα τερπένια περιλαμβάνουν τριτερπένια (30 άτομα άνθρακα), τετρατερπένια (40 άτομα άνθρακα) και πολυτερπενοειδή ([C₅]_n άτομα άνθρακα, όπου n>8) [Taiz and Zeiger, 2012].

Τα τερπένια συντίθενται μέσω της οδού του μεβαλονικού οξέος (mevalonic acid pathway). Σ' αυτήν την οδό, τρία μόρια ακέτυλο-CoA ενώνονται διαδοχικά για να σχηματίσουν το μεβαλονικό οξύ. Αυτή η ένωση των έξι ατόμων άνθρακα στη συνέχεια πυροφωσφορυλιώνεται, αποκαρβοξυλιώνεται και αφυδατώνεται για να σχηματιστεί το διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (isopentenyl diphosphate, IPP). Το IPP είναι η ενεργοποιημένη δομική μονάδα των τερπενίων που αποτελείται από πέντε άτομα άνθρακα [Taiz and Zeiger, 2012]. Οι σκελετοί του άνθρακα κυκλοποιούνται από την οικογένεια των κυκλασών του οξειδοσκουαλενίου, η οποία είναι εξαιρετικά διαδεδομένη στα φυτά. Οι κυκλάσες αυτές μετατρέπουν το οξειδοσκουαλένιο σε μία ή περισσότερες κυκλικές αλκοόλες τριτερπενίου με έως και έξι καρβοκυκλικούς δακτυλίους. Το απλούστερο τριτερπένιο βάση του οποίου σχηματίζονται τα απλούστερα τριτερπενοειδή είναι το σκουαλένιο (C₃₀). Βάση του σκουαλενίου, προκύπτει μία εξαιρετικά ποικιλόμορφη ομάδα φυσικών προϊόντων, αποτελούμενη από περισσότερα από 20.000 γνωστά μέλη. Μερικοί πολύ γνωστοί εκπρόσωποι αυτής της ομάδας είναι οι ομάδες αμυντικών μεταβολιτών του φυτού, δηλαδή οι σαπωνίνες, τα καρδιακά γλυκοζίδια ή καρδενολίδια, τα στεροειδή και τα λεμονοειδή [(Petronelli A, 2009); (Γαλάτης Β., 2009); (Phillips DR, 2006); (Liu J, 1995); (Yan XJ, 2014)].

Μία σημαντική υποομάδα της οικογένειας των τερπενίων αποτελούν τα τριτερπένια. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των φυτών, τα τριτερπένια αποτελούν απαραίτητες πρόδρομες ουσίες των κυτταρικών μεμβρανών και των στεροειδών ορμονών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα απλά τριτερπένια α- και β-αμυρίνη, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι είναι τα δομικά συστατικά των μεμβρανών κατά την κανονική αύξηση και ανάπτυξη των οσπρίων. Επιπλέον, τα τριτερπένια παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών από παθογόνες καταστάσεις, όπως η προστασία τους από φυτοφάγους οργανισμούς [Phillips *et al.*, 2006]. Τέλος, οι φαρμακευτικές τους ιδιότητες, όπως η αντικαρκινική, η αντιφλεγμονώδη, η αντιοξειδωτική, καθώς και οι εφαρμογές τους στη βιομηχανία τροφίμων, καθιστούν

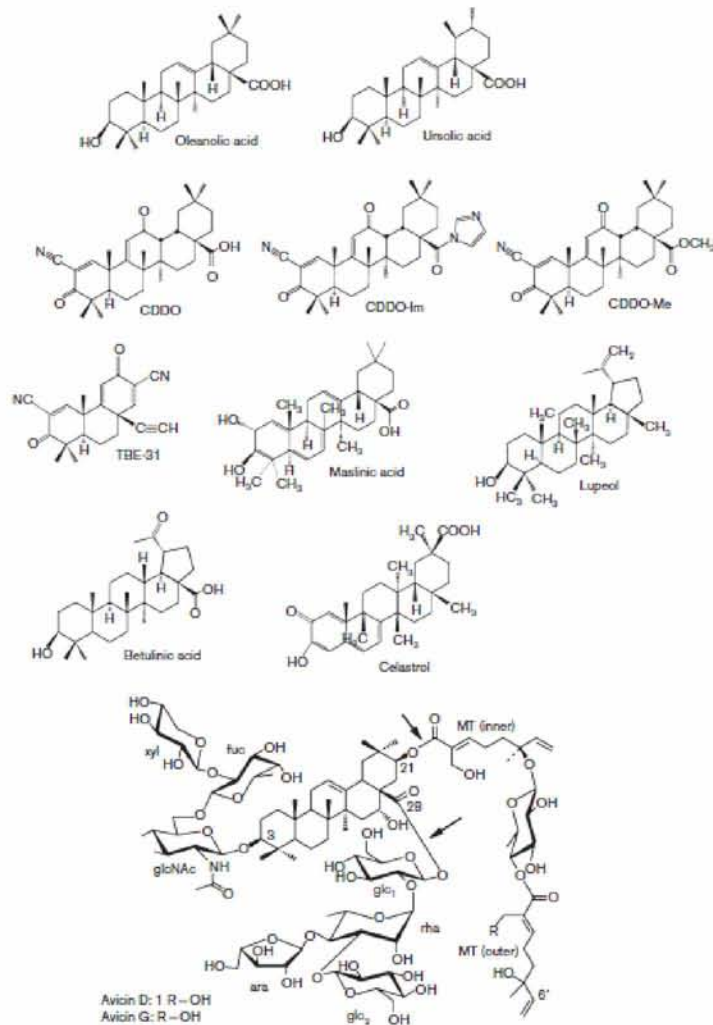
τα τριτερπενοειδή ως μια πολύ σημαντική ομάδα φυτικών προϊόντων [Osbourne *et al.*, 2011].

1.8.2 Τα τριτερπενοειδή ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί παράγοντες

Τα τριτερπενοειδή έχουν προσελκύσει έντονο ενδιαφέρον ως εν δυνάμει αντικαρκινικοί παράγοντες. Έχουν σαφή αποτελεσματική δράση στην πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου σε διάφορα ζωικά μοντέλα και είναι υπό αξιολόγηση ως αντικαρκινικά φάρμακα αλλά και για άλλες θεραπευτικές τους ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, η ικανότητά τους να καταστέλλουν την ογκογένεση, βασίζεται στην παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ, στην επαγωγή της απόπτωσης, στην αναστολή των μηχανισμών μεταγωγής σήματος, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης, στην πρόκληση μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών και, τέλος, στη διαμόρφωση της έκφρασης των γονιδίων που βρίσκονται στους περισσότερους όγκους και σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στην χορήγηση πολλαπλών σκευασμάτων (reversing multidrug resistance, MDR).

Για την επαγωγή της απόπτωσης από τα τριτερπενοειδή, έχουν αναφερθεί διάφοροι μηχανισμοί, με κυριότερο την καταστολή της έκφρασης του Bcl-2 γονιδίου και την επαγωγή της κασπάσης 3. Εναλλακτικά, τα τριτερπενοειδή μπορούν να επάγουν την απόπτωση μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού ή μέσω ενίσχυσης του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF), ενώ βρίσκεται υπό εξέταση ένα νέο μονοπάτι επαγωγής απόπτωσης, που βασίζεται στην καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της τελομεράσης hTERT και κατ' επέκταση στην αναστολή της δράσης της αντίστοιχης μεταφοράς των τελομερών.

Εκτός από τις αντικαρκινικές δράσεις, στα τριτερπένια έχουν αποδοθεί αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αναλγητικές, αντικές, αντιμυκητιακές, ανοσορυθμιστικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες. Ωστόσο, η αιμολυτική και κυτταροστατική δράση πολλών τερπενίων έχει περιορίσει δραματικά τη φαρμακευτική τους χρήση κι έχει στρέψει το ενδιαφέρον στην τροποποίησή τους με τη βοήθεια χημικών και βιοτεχνολογικών τεχνικών. Έτσι, αποτελούν ικρίωμα για τη σύνθεση πολλών νέων χημικών σκευασμάτων, γεγονός που αποδίδεται στον ομοιογενή ανθρακικό σκελετό τους [(Yan XJ, 2014); (Shah SA, 2014); (Malinowska M, 2013); (Salminen A, 2008); (Molnár J, 2006)].



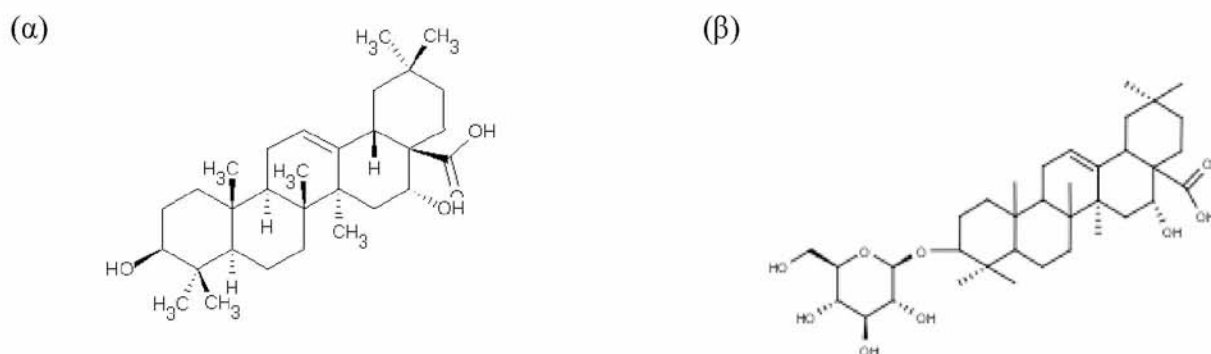
Εικόνα 1.23 Χημική δομή των κυριότερων τριτερπενοειδών που μελετήθηκαν για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες [Από Petronelli *et al.*, 2009].

1.8.3 Το echinocystic acid και το 3-O γλυκοσίδιο αυτού

Το echinocystic acid αποτελεί ένα φυσικό γλυκοκορτικοειδές, που βρίσκεται σε αφθονία σε πολλά βότανα και έχειδειχθεί ότι έχει ογκοκατασταλτική δράση, γι' αυτό και χρησιμοποιείται για ιατρικούς σκοπούς σε πολλές ασιατικές χώρες [(Gene *et al.*, 1996); (Navarro *et al.*, 2001)]. Παρ' όλα αυτά, ο μοριακός μηχανισμός αυτής της δράσης δεν είναι ακόμα κατανοητός. Σε πειράματα που έγιναν στην HepG2 ανθρώπινη καρκινική σειρά, η οποία είναι μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές για *in vitro* μελέτες σε ηπατοκυτταρικά καρκινώματα, βρέθηκε ότι το echinocystic acid επάγει την απόπτωση, μέσω των JNK- και p38-μεσολαβούμενων μιτοχονδριακών μονοπατιών.

Αυτό συμβαίνει γιατί η JNK κινάση (c-Jun NH₂-terminal kinase), από τη μία απενεργοποιεί την αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-2 [(Park *et al.*, 1997); (Lei *et al.*, 2002)], αλλά επίσης περικόπτει και ενεργοποιεί την αποπτωτική πρωτεΐνη Bid. Η περικομμένη πρωτεΐνη Bid προκαλεί την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από το μιτοχόνδριο, την ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και τελικά την επαγωγή της απόπτωσης [(Deng *et al.*, 2003); (Xu and Thornalley, 2001); (Clarke and Tyler, 2003)]. Η p38 κινάση, από την άλλη, επάγει την απόπτωση, είτε φωσφορυλιώνοντας άμεσα και ενεργοποιώντας τον p53 (βλέπε παράγραφο 1.6.2.1) [Kwon *et al.*, 2002], είτε ενεργοποιώντας τον NF-κB [Shimada *et al.*, 2003]. Παρ' όλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός, με τον οποίο η p38 κινάση, ο p53 και ο NF-κB παίζουν ρόλο στην επαγόμενη από το echinocystic acid, μένει ακόμα να αποσαφηνιστεί. Επιπρόσθετα, στα πειράματα που έγιναν με το echinocystic acid στα HepG2 κύτταρα, βρέθηκε ότι η ουσία αυτή, αρχικά, ενεργοποιεί την κασπάση 8, η οποία έχει ως αποτέλεσμα είτε την περικοπή της Bid, είτε τη μείωση του Bcl-2 και τελικά την επαγωγή της απόπτωσης.

Επιπλέον, άλλες πειραματικές διαδικασίες έχουν αναδείξει την κυτταροτοξική δράση του echinocystic acid και στην ανάπτυξη κάποιων άλλων καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπως η A375, η L929 και η HeLa [(Gene *et al.*, 1996); (Navarro *et al.*, 2001); (Dong *et al.*, 2003)]. Έτσι, όλα αυτά τα πειραματικά δεδομένα ενισχύουν την κατανόηση της αντικαρκινικής δράσης του echinocystic acid στη φυτοθεραπεία και προτείνουν ότι ίσως να αντιπροσωπεύει μία πολλά υποσχόμενη κατηγορία ενώσεων, η οποία έχει μεγάλο ενδιαφέρον στην χημειοπροστασία του καρκίνου [Xuhui *et al.*, 2004]. Οι χημικοί τύποι του echinocystic acid και του 3-O γλυκοσιδίου αυτού παρουσιάζονται στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 1.24 Αναπαράσταση της δομής (α) του echinocystic acid και (β) του 3-O γλυκοσιδίου του echinocystic acid [Από www.rdchemicals.com].

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η σημασία των σηματοδοτικών μονοπατιών των γλυκοκορτικοειδών διαφαίνεται από την πληθώρα των θετικών βιολογικών επιδράσεων που ασκούν στον οργανισμό, με κυριότερες τη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης αλλά και τις σημαντικές αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές δράσεις τους. Παρ' όλα αυτά, εμφανίζουν και διάφορες επιβλαβείς για τον οργανισμό δράσεις, όπως ο διαβήτης, η οστεοπόρωση αλλά και δερματικές ή οφθαλμολογικές διαταραχές..

Με βάση, λοιπόν, τις παρενέργειες που έχουν παρουσιαστεί σε ασθενείς μετά τη χορήγηση γλυκοκορτικοειδών και σε συνδυασμό με τις δομικές ομοιότητες που έχουν ανακαλυφθεί μεταξύ των τριτερπενίων και των γλυκοκορτικοειδών, έχει προκύψει η ανάγκη εύρεσης εκλεκτικών αγωνιστών για τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs), το ίδιο αποτελεσματικών με τα γλυκοκορτικοειδή, αλλά με σαφώς μειωμένες τις ανεπιθυμητές επιδράσεις τους. Παράλληλα, η φυτική προέλευση των ενώσεων αυτών μπορεί να παρουσιάζει και χαμηλότερο οικονομικό κόστος, γεγονός που αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για την ενδελεχή μελέτη τους.

Όλα τα παραπάνω σε συνδυασμό με προηγούμενες παρατηρήσεις στο εργαστήριο μας, που έδειξαν ότι δύο τριτερπένια, το echinocystic acid και το 3-O-glycoside of echinocystic acid, προκαλούν ενεργοποίηση της πυρηνικής μετακίνησης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, αποτέλεσαν το έναυσμα για την εκτέλεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, που σκοπό έχει τη διερεύνηση της πιθανής επιτέλεσης των δράσεων των προαναφερθέντων μορίων, ιδιαίτερα της αντιφλεγμονώδους και αντικαρκινικής δράσης τους, μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες λουσιφεράσης για τον έλεγχο της επίδρασης των ουσιών αυτών στην μεταγραφική δραστηριότητα τόσο του GR, όσο και του NF-κB, απουσία και παρουσία υπερεκφρασμένου GR, καθώς και αναλύσεις Western Blot για τον έλεγχο της επίδρασης των ουσιών στα επίπεδα έκφρασης διαφόρων γονιδίων-στόχων του GR που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της γλυκόζης καθώς και σε αποπτωτικούς μηχανισμούς. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην ανθρώπινη καρκινική σειρά HeLa.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

Ακολουθεί μια λίστα με τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας και αναφέρονται οι εταιρείες από τις οποίες προέρχονταν. Όσα αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν σε διαδικασίες κυτταροκαλλιέργειας σημειώνονται με αστερίσκο (*).

3.1.1 Αντιδραστήρια

3.1.1.1 Χημικά

Ammonium Persulfate (APS) (Sigma)

Bradford protein assay (Bio-rad)

Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma)

Charcoal, dextran coated (Sigma)

Dexamethasone (DEX) (Riedel-de Haën) *

Dimethyl sulfonyl Chloride (DMSO) (Sigma) *

Dithiothreitol (DTT) (SERVA)

EDTA (Panreac)

Fetal Bovine Serum (FBS) Gibco® (Life Technologies - Invitrogen) *

HCl (Merck)

KCl (Merck)

KH₂PO₄ (Merck)

L-Glutamine (Life Technologies - Invitrogen) *

Lipofectamine® 2000 (Life Technologies - Invitrogen) *

Na₂HPO₄ (Merck)

NaCl (Panreac)

NaHCO₃ (Merck)

NaOH (Merck)

o-nitrophenyl β-D-galactoside (ONPG) (Sigma)

Opti-MEM ® (Life Technologies - Invitrogen) *

Phenyl methyl Sulfonyl Floride (PMSF) (SERVA)

Polyvinyl alcohol (PVA) (Sigma)

Sodium dodecyl Sulfate (SDS) (SIGMA)

Skimmed milk powder (Regilait)

TEMED (Research Organics)
Tris base (Merck)
Trypsin-EDTA 5% 10× (Gibco) *
Tween 20 (Euroclone)
Αιθανόλη (Panreac και Merck)
β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)
Γλυκερόλη (Panreac)
Γλυκίνη (AppliChem)
Ισοπροπανόλη (Scharlau)
Κυανούν της βρωμοφαινόλης (Research Organics)
Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (ThermoScientific Fermentas)
Μεθανόλη (Merck)
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Whatman (Protran)
Πενικιλίνη-Στρεπταμυκίνη (Invitrogen)
Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων ×5 ή Lysis Buffer ×5 (Promega) *

3.1.1.2 Θρεπτικά υλικά

Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® (Life Technologies - Invitrogen)*
LB Broth (Scharlau)
LB Agar (Scharlau)

3.1.1.3 Αντισώματα

Πρωτογενή αντισώματα:

Μονοκλωνικό αντίσωμα β-ακτίνης από ποντικό (Sigma)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κασπάσης 9 από ποντικό (Cell Signalling)
Πολυκλωνικό αντίσωμα PEPCK H-300 από κόνικλο (Santa-Cruz), με τον επίτοπο να αναγνωρίζει την ελαφριά αλυσίδα.
Πολυκλωνικό αντίσωμα GR H-300 από κόνικλο (Sigma)
Πολυκλωνικό αντίσωμα Bcl-2 από κόνικλο (Cell Signalling)
Πολυκλωνικό αντίσωμα κασπάσης 3 από κόνικλο (Abcam)
Πολυκλωνικό αντίσωμα p65 (NF-κB) από κόνικλο (Santa Cruz)

Δευτερογενή αντισώματα:

Αντίσωμα για mouse IgG-HRP (Pierce Laboratories).

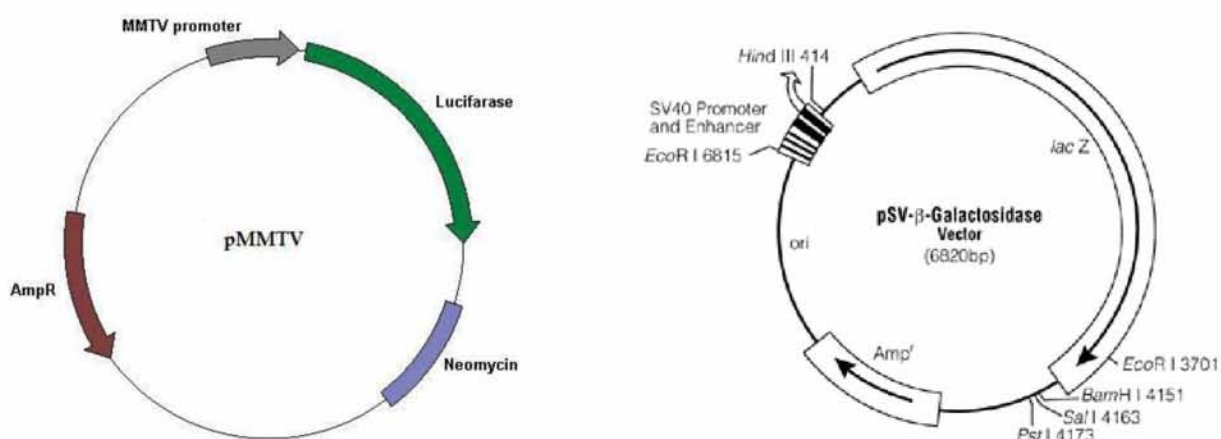
Αντίσωμα για rabbit IgG-HRP (Pierce Laboratories).

3.1.1.4 Βακτηριακά στελέχη

Χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια *Escherichia coli* στελέχους DH5αTM (Life Technologies - Invitrogen), ο γονότυπος των οποίων περιγράφεται στους Sambrook *et al.* [1989].

3.1.1.5 Πλασμιδιακοί φορείς

Στα πειράματα διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pMMTV-GRE-Luc και pSV40-β-Gal.



Εικόνα 3.1 Αναπαρίστανται οι μοριακές κατασκευές των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα περιοδικής διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa.

A) Πλασμιδιακός φορέας pMMTV-Luc, με τον υποκινητή να φέρει GREs αλληλουχίες.

B) Πλασμιδιακός φορέας που φέρει το γονίδιο της β-Gal.

3.1.1.6 Διαλύματα

DEX:

Είναι διαλυμένη σε EtOH 100 % και αποθηκεύεται στους 20 °C σε συγκέντρωση 1 mM. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1 μM.

RU-486:

Είναι διαλυμένο σε DMSO. Είναι φωτοευαίσθητο και αποθηκεύεται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε συγκέντρωση 10^{-1} M . Περαιτέρω αραιώνεται σε 100% EtOH, ώστε να προκύψει συγκέντρωση 10 mM. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 10^{-5} M .

PMSF 200 mM:

Για την παρασκευή 2 mL PMSF 200 mM διαλύονται 0.07 gr PMSF σε 2 mL ισοπροπανόλης. Γίνεται ο διαμοιρασμός του σε aliquots των 200 μL και αποθηκεύονται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Με αραιώση 10 % σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20 mM.

Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (Sonication Buffer):

Αποτελείται από 20 mM Tris pH 7.5, 0.5 % Triton X-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA και αποθηκεύεται στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Σε 1 mL από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 0.5 μL PMSF 20 mM ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) και 2 μL DTT 1 M ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Το DTT χρησιμεύει ως αναγωγικός παράγοντας.

Διάλυμα Bradford:

Stock 5 \times . Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1 \times , αραιωμένο με ddH₂O. Η αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford είναι 1:1000.

Sample Buffer 4 \times :

Αποτελείται από 1M Tris pH 6.8, 10 % γλυκερόλη, 10 % SDS, 5 % β -μερκαπτοαιθανόλη, 1 % κυανού της βρωμοφαινόλης και αποθηκεύεται στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η β -μερκαπτοαιθανόλη αναγάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και καταργεί την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών.

Tris 20 mM pH 7.5:

Σε πλαστικό σωληνάριο τύπου eppendorf (1.5 mL) αναμειγνύονται 20 μL stock διαλύματος Tris 1M pH 7.5 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) με 980 μL ddH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε R.T.

Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:

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

TEMED:

Χρησιμοποιείται χωρίς κάποια αραίωση, όπως ακριβώς παραλαμβάνεται. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

APS 10 %:

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

Μάρτυρας μοριακών μεγεθών:

Χρησιμοποιήθηκε κατάλληλος μάρτυρας μοριακών μεγεθών που καλύπτει ένα εύρος πρωτεϊνικών μεγεθών από 10 έως 170 kDa και διαθέτει προσημασμένη με πορτοκαλί χρώμα τη ζώνη των 70 kDa και με πράσινο χρώμα τη ζώνη στα 10 kDa.

Οι πρωτεΐνες βρίσκονται σεσημασμένες σε διάλυμα που αποτελείται από 62.5 mM Tris-H₃PO₄ (pH 7.5 στους 25 °C), 1 mM EDTA, 2 % SDS, 10 mM DTT, 1 mM NaN₃ και 33 % γλυκερόλη [ThermoFisher Scientific Inc., 2013].

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10×:

Ζυγίζονται 30.3 gr Tris base 0.25M και 144.00 gr γλυκίνης 1.92M τα οποία διαλύονται σε όγκο 1 L ddH₂O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε R.T. [(Ornstein, 1964); (Davis, 1964)].

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1×:

Για την παρασκευή του R.B. 1× αραιώνονται 100 ml R.B. 10× σε 900 ml dH₂O (αναλογία 1:9). Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε αναλογία 0.1 %. [Laemmli, 1970]. Διατηρείται σε R.T.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10×:

Αποτελείται από 10 % Running Buffer 10×, 20 % MeOH και 0.05 % SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH₂O. Το διάλυμα φόρτωσης αποθηκεύεται στους 4 °C.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 1×:

Για την παρασκευή 1L Transfer Buffer 1× χρειάζονται 695ml dH₂O, 200ml μεθανόλη 100%, 100ml Running Buffer 10× και 5ml SDS 10%.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10×:

Αποτελείται από Na₂HPO₄ 1M, KH₂PO₄ 20mM, NaCl 1.37 M και KCl 20mM. Αποθηκεύεται σε R.T.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1×:

Το stock buffer PBS 10× αραιώνεται σε κατάλληλο όγκο dH₂O ή ddH₂O και προστίθεται Tween-20 σε αναλογία 1 %. Ειδικότερα, για την παρασκευή 500ml PBS-T 1× χρειάζονται 450ml dH₂O ή ddH₂O, 50ml PBS 10 × και 0.5-1ml Tween-20. Αποθηκεύεται σε R.T.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (Sodium Phosphate buffer solution):

Παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1 M pH 7.5 με ανάμειξη κατάλληλων όγκων από τα stock διαλύματα μονοβασικού NaH₂PO₄ 0.2 M και διβασικού Na₂HPO₄ 0.2 M. Τα stock διαλύματα παρασκευάζονται με διαλύτη το H₂O, κάνοντας τους κατάλληλους υπολογισμούς για τη μάζα της χημικής ένωσης που απαιτείται.

Διαλύματα για εμφάνιση σήματος:

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα της Kodak. Αποτελείται από ένα διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Τα εκάστοτε διαλύματα παρασκευάζονται με ανάμειξη 1:1 3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε dH₂O. Συγκεκριμένα, η σύστασή τους είναι 45ml Developer/Fixer και 127.5ml dH₂O.

3.1.2 Οργανολογία

Τα όργανα και μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατά κύριο λόγο διαθέσιμα από το εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του TBB, καθώς επίσης και από το δωμάτιο κυτταροκαλλιεργειών του Τμήματος. Αναφέρονται τα βασικότερα εξ αυτών:

Ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (KRÜSS)
Αυτόματοι πιπιεταδότες τύπου Gilson (0.2-10 µL, 1-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)
Επωαστικός κλίβανος CO₂ (Galaxy 170S, New Brunswick)
Θάλαμος καθέτου νηματικής ροής (Laminar flow hood) μικροβιολογικής ασφάλειας επιπέδου II (TELSTARAV-30/70)
Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας (Nuova, Thermolyne)
Θερμαντική πλάκα heat-block (Thermoleader)
Κάθετος αναδευτήρας (SB3 stuart®)
Κυκλομείκτες (vortex)
Λουμινόμετρο-Μηχάνημα μέτρησης χημειοφωταύγειας (Lumat 3 LB 9508, Berthold Technology)
Ξηρός κλίβανος (WTB binder)
Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad)
Συσκευές υπερήχων (sonicator)
Υδατόλουτρο
Φυγόκεντροι (Centrifiger-BLII, eppendorf Centrifuge 5810 R, eppendorf microcentrifuge 5415 D)
Φασματοφωτόμετρο ορατού φωτός (Spectronic® 20 GENESYS™)

3.1.2.1 Αναλώσιμα

Σωληνάρια για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (cryovials ή cryotubes)
Ειδικές φιάλες για ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων (Flasks) (μεγέθοι T25, T75)
Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 mL, 50 mL)
Πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorfs (1.5 mL, 2.0 mL)
Πιπέττες Serological (2, 5, 10 και 25 mL)
Ρύγχοι (0.2-10 µL, 20-200 µL και 100-1000 µL)
Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6× και 24× wells
Καλυπτρίδες coverslips
Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας (3.5, 6.0, 9.0, 10.0 και 15.0 cm)
Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Διαχείριση Κυτταροκαλλιιεργειών

Τα παρακάτω στοιχεία αποτελούν βασικούς κανόνες κατά την εργασία στο χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών και είναι σημαντικό να αναφερθούν πριν ξεκινήσει η περιγραφή των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στον ειδικά διαμορφωμένο αυτόν χώρο.

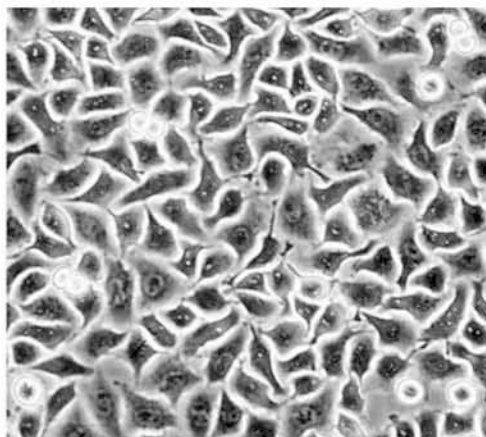
- ✓ Όλες οι πειραματικές διαδικασίες εκπονούνται μέσα στον απαγωγό καθέτου νηματικής ροής.
- ✓ Οτιδήποτε χρησιμοποιείται στον χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών ψεκάζεται με 70% EtOH πριν εισαχθεί στον απαγωγό.
- ✓ Οτιδήποτε χρησιμοποιείται στις κυτταροκαλλιέργειες ανοίγει και κλείνει αυστηρά μέσα στον απαγωγό
- ✓ **ΠΑΝΤΑ**, αφού λήξει η εργασία στον απαγωγό, εφαρμόζεται UV ακτινοβολία για 30 min, προκειμένου να καθαριστεί εσωτερικά ο χώρος. Συνίσταται έλεγχος καθαρότητας και πριν την έναρξη της εργασίας στον απαγωγό.

3.2.1.1 Καρκινική κυτταρική σειρά HeLa

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά HeLa, η οποία ήταν ευγενική χορηγία του ΕΙΕ (Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών) (Εικόνα 3.2). Η σειρά αυτή αποτελείται από καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας κι απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1951 από τον George Otto Gey, γνωστό ερευνητή της Ιατρικής Σχολής του John Hopkins. Το πλήρες γονιδίωμα των κυττάρων HeLa και η αλληλουχία τους δημοσιεύθηκαν τον Μάρτιο του 1953, ενώ ήταν τα πρώτα ανθρώπινα κύτταρα που κλωνοποιήθηκαν με επιτυχία το 1955. Ονομάστηκαν HeLa από τα αρχικά του ονόματος της ασθενούς από την οποία απομονώθηκαν, την 31-ετών Henrietta Lacks.

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

Ονομάζονται «αθάνατα», με την έννοια ότι μπορούν να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον, όταν καλλιεργούνται κάτω υπό κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας. Τις περισσότερες φορές, αυτό αποτελεί ένα σπάνιο γεγονός, αφού η πλειοψηφία των κυττάρων, ακόμη και αυτά που βρίσκονται σε έναν καρκινικό ιστό, σταματά να πολλαπλασιάζεται μετά από έναν συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Ωστόσο, μία συνεχής κυτταρική σειρά, όπως τα κύτταρα HeLa, μπορεί να υποστεί ανακαλλιέργεια άπειρες φορές, χωρίς να χάσει κάποια ιδιότητα του κυτταρικού τύπου ή του ιστού απ' όπου προέρχεται [Capes-Davis A, 2010]. Τέλος, υπάρχουν πολλά στελέχη κυττάρων HeLa, καθώς συνεχίζουν να μεταλλάσσονται σε κυτταρικές καλλιέργειες, αλλά όλα τα κύτταρα HeLa προέρχονται από τα ίδια αρχικά καρκινικά κύτταρα [(Landry *et al.*, 2013); (Rahbari, 2009)].



Εικόνα 3.2 Τα κύτταρα HeLa έτσι όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο (Carson SD, 2013).

3.2.1.2 Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα βρίσκονται αποθηκευμένα στους -80°C ή σε υγρό άζωτο, μέσα σε ειδικά φιαλίδια, τα cryovials ή cryotubes. Η απόψυξή τους λαμβάνει χώρα στο υδατόλουτρο, το οποίο είναι ρυθμισμένο στους 37°C , κι αφού ξεπαγώσει το εσωτερικό του cryovial και γίνει εξωτερικός καθαρισμός του με 70% EtOH (70:30, EtOH:dH₂O), αυτό εισάγεται στο εσωτερικό του απαγωγούκαθέτου νηματικής ροής, όπου και ανοίγεται. Στη συνέχεια, το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε ένα πλαστικό σωλήνα τύπου falcon (15ml) μαζί με περίπου 10ml θρεπτικού κι όλο μαζί φυγοκεντρείται για 5min, στα 1000rpm, σε RT ($19-25^{\circ}\text{C}$). Έπειτα, το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται με αναρρόφηση και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε

θρεπτικό μέσο DMEM, παρουσία ερυθρού της φαινόλης, υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (4,5mg/ml), εμπλουτισμένου με 1% v/v 200mM L-γλουταμίνη (L-Glut), 1% v/v πενικιλίνη/στρεπταμυκίνη (Pen/Strept) και 10% v/v FBS. Η ποσότητα του θρεπτικού που χρησιμοποιείται κάθε φορά για την επαναδιαλυτοποίηση εξαρτάται από τη φλάσκα που θα χρησιμοποιηθεί για την καλλιέργεια.

Ειδικότερα, για T25 flask (φλάσκα επιφάνειας 25cm²) χρησιμοποιούνται 5ml DMEM, ενώ για T75 flask (φλάσκα επιφάνειας 75cm²) χρησιμοποιούνται 15ml DMEM. Τέλος, τα κύτταρα τοποθετούνται για ανάπτυξη στον επωαστήρα, όπου επικρατούν συνθήκες θερμοκρασίας 37°C και υγρασίας 5% CO₂, κι αφήνονται εκεί μέχρι η πληρότητα της φλάσκας (confluency) να φτάσει το 80-85%. Το χρονικό διάστημα που χρειάζεται για να φτάσουν τα κύτταρα σε αυτό το ποσοστό πληρότητας διαφέρει μεταξύ των κυτταρικών σειρών, κι επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Ένας από αυτούς είναι ο αριθμός των περασμάτων που έχει υποστεί η χρησιμοποιούμενη κυτταρική σειρά, καθώς επίσης και από το πόσο καλά έχει χειριστεί τα συγκεκριμένα κύτταρα ο χρήστης.

Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε μονόστρωτη καλλιέργεια και η προσκόλλησή τους στο ταπήτιο της πλαστικής φλάσκας απαιτεί ≥ 24 h. Σε περίπτωση, όμως, που δεν έχει παρατηρηθεί το επιθυμητό confluency μέσα σε περίπου 48h, συνοδευόμενη ή μη από χρωματική αλλαγή στο θρεπτικό μέσο, συνίσταται η άμεση αλλαγή του θρεπτικού μέσου.

3.2.1.3 Καλλιέργεια κυττάρων HeLa

Για την καλλιέργεια των ευκαρυωτικών κυττάρων HeLa χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο DMEM high glucose, εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, 1% v/v 200 mM L-Glut και 1% v/v Pen/Strept (πλήρες θρεπτικό μέσο). Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο με ελεγχόμενη θερμοκρασία 37°C και ποσοστό CO₂ ίσο με 5%.

Στα πειραματικά πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν, έγινε, επίσης, χρήση θρεπτικού μέσου cis-DMEM, το οποίο είναι φωτοευαίσθητο και προκύπτει από το DMEM without phenol red, high glucose (4,5mg/ml), εμπλουτισμένο με 1% Pen/Strept, 1% L-Glut και 10% FBScis (Charcoal Inactivated Fetal Bovine Serum), το οποίο έχει απενεργοποιηθεί μετά από κατεργασία με ζωάνθρακα και είναι φωτοευαίσθητο.

Επιπλέον, πραγματοποιείται καθημερινή παρατήρηση των κυττάρων σε ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης για αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων, με έλεγχο της φυσιολογικής μορφολογίας των κυττάρων και της πληρότητας (confluency) της φλάσκας σε πληθυσμό κυττάρων. Σε κάθε περίπτωση πρέπει να αποφευχθεί πληρότητα μεγαλύτερη του 90%. Εάν συμβεί κάτι τέτοιο, σημαίνει ότι τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση stress, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν αλλοιώσεις σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Με άλλα λόγια, παύουν πλέον να είναι αξιόπιστα για την διεξαγωγή πειραμάτων και συνίσταται η απόρριψή τους.

3.2.1.4 Θρυψινοποίηση κυττάρων

Όταν ο πληθυσμός των κυττάρων καλύψει περίπου το 80% της χρησιμοποιούμενης φλάσκας, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων με τη χρήση διαλύματος πρωτεολυτικών ενζύμων. Αρχικά, απομακρύνεται με αναρρόφηση από την επιφάνεια της φλάσκας το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και προστίθεται ποσότητα διαλύματος θρυψίνης-EDTA 0.25%, κι αφήνεται να δράσει στον επωαστήρα στους 37 °C. Η ποσότητα της θρυψίνης που προστίθεται πρέπει να είναι τόση, ώστε να διαβρέχει την εσωτερική επιφάνεια της φλάσκας, ενώ το χρονικό διάστημα επώασής της με τα κύτταρα, εξαρτάται από το πόσο γρήγορα θα παρατηρηθεί αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα της φλάσκας. Γι' αυτόν τον λόγο, τα κύτταρα ελέγχονται σε τακτά χρονικά διαστήματα στο μικροσκόπιο. Στο στάδιο αυτό απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, καθώς επώαση των κυττάρων με θρυψίνη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, στρεσάρει τα κύτταρα ενώ μπορεί, ακόμα, να συντελέσει και στην καταστροφή τους.

Αμέσως μόλις παρατηρηθεί αποκόλληση των κυττάρων στο μικροσκόπιο, ακολουθεί αδρανοποίηση της θρυψίνης με προσθήκη τετραπλάσιας ποσότητας (4×) θρεπτικού υλικού. Δηλαδή, η αναλογία όγκων είναι 5:1, θρεπτικό υλικό:διάλυμα θρυψίνης. Η αδρανοποίηση αυτή της θρυψίνης προκύπτει ως επακόλουθο της αλλαγής της τιμής του pH της αντίδρασης που λαμβάνει χώρα μέσα στη φλάσκα. Στη συνέχεια, ακολουθεί σχολαστική επαναιώρηση των κυττάρων, έτσι ώστε να σπάσουν πιθανά συσσωματώματα κυττάρων που έχουν δημιουργηθεί, ενώ ταυτόχρονα με τον τρόπο αυτόν διαβρέχεται καλά και η επιφάνεια της φλάσκας και μπορούν, έτσι, να αποκολληθούν τυχόν εναπομείναντα πάνω σε αυτήν κύτταρα. Το εναιώρημα των

κυττάρων μεταφέρεται σε falcon και φυγοκεντρείται για 5 min, στα 1000rpm, σε RT (19-25°C).

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, ακολουθεί αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος και διαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων, με καλό πιπετάρισμα, στο μέσο καλλιέργειας (DMEM high glucose). Και σε αυτήν την περίπτωση η ποσότητα του θρεπτικού που θα χρησιμοποιηθεί, εξαρτάται τόσο από τη φλάσκα από την οποία προέρχονται τα κύτταρα, όσο και από το σκοπό που γίνεται η ανακαλλιέργεια. Αν, δηλαδή, πρόκειται να διεξαχθεί κάποιο πείραμα άμεσα, συνήθως επιστρέφεται μεγάλη ποσότητα κυττάρων από την αρχική καλλιέργεια και συμπληρώνεται με την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού.

Αντίθετα, όταν σκοπός της θρυψινοποίησης είναι απλά η διατήρηση της καλλιέργειας, τότε επιστρέφεται μια πολύ μικρή ποσότητα κυττάρων για ανακαλλιέργεια, συνήθως το 1/20 της αρχικής καλλιέργειας κυττάρων για T25 φλάσκα και το 1/10 για T75 φλάσκα και συμπληρώνεται με την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου, δηλαδή 5 ml για T25 και 15 ml για T75 φλάσκα. Τα κύτταρα διασπείρονται ομοιόμορφα εντός της φλάσκας και αφήνονται προς επώαση στον ειδικό κλίβανο υπό ελεγχόμενες συνθήκες (37°C, 5% CO₂).

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται περίπου 2 φορές ανά εβδομάδα, ανάλογα με το χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων. Μετά από κάθε θρυψινοποίηση, ο αριθμός του περάσματος (passage) των κυττάρων αυξάνεται κατά +1 και μαζί με την ημερομηνία διεξαγωγής της θρυψινοποίησης σημειώνονται στην επιφάνεια της φλάσκας, καθώς αποτελεί δείκτης της γήρανσης των κυττάρων.

3.2.1.5 Ψύξη κυττάρων

Η ψύξη των κυττάρων πραγματοποιείται συνήθως μετά τις πρώτες θρυψινοποιήσεις, ούτως ώστε να υπάρχουν μελλοντικά διαθέσιμα stock στους -80°C. Αμέσως μετά τη φυγοκέντρωση που πραγματοποιείται στη θρυψινοποίηση, για 5 min, στα 1000rpm, σε RT (19-25°C), το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο FBS.

Η ποσότητα αυτή του FBS, στην οποία θα επαναδιαλυτοποιηθεί το ίζημα των κυττάρων καθορίζεται από τον λόγο FBS/DMSO= 9/1. Με άλλα λόγια, σε κάθε cryovial προστίθενται 0,9ml διαλύματος FBS μαζί με εναιώρημα κυττάρων και 0,1ml DMSO. Το DMSO χρησιμεύει ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας και αμέσως μόλις

προσθεθεί, γίνεται γρήγορη ανακίνηση, μεταφορά και αποθήκευση των cryovials στους -80°C .

3.2.1.6 Μέτρηση και στρώσιμο κυττάρων

Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται στο μικροσκόπιο με τη βοήθεια αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer). Αρχικά, γίνεται θρυψινοποίηση των κυττάρων, με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω, δηλαδή σταμάτημα της πρωτεολυτικής αντίδρασης με προσθήκη θρεπτικού μέσου, φυγοκέντρηση (για 5 min, στα 1000 rpm, σε RT ($19-25^{\circ}\text{C}$)) του εναιωρήματος των κυττάρων, απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος και αναδιάλυση του ίζηματος σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού υλικού. Έτσι, λοιπόν, αμέσως μόλις επαναδιαλυτοποιηθεί το ίζημα που προκύπτει μετά τη φυγοκέντρηση, μία πολλή μικρή ποσότητα κυττάρων μεταφέρεται σε ένα erpendorf, απ' όπου γίνεται λήψη 10μl εναιωρήματος με πιπέτα και μεταφορά στο αιμοκυττόμετρο Neubauer. Στο στάδιο αυτό απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην καλή ανακίνηση του περιεχομένου του erpendorf, καθώς τα κύτταρα έχουν την τάση να καθιζάνουν, και η ποσότητα των 10μl που θα ληφθεί πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική.

Κατόπιν, τα 10μl κυττάρων μεταφέρονται στην εσοχή της μιας πλευράς της πλάκας και μετρίεται στο μικροσκόπιο ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων στα 4 τεταρτημόρια. Αφού υπολογιστεί ο μέσος όρος του αριθμού των ζωντανών κυττάρων στα 4 αυτά τεταρτημόρια, ο οποίος και αντιστοιχεί στα 10 μl, ακολουθεί η αναγωγή του σε αριθμό κυττάρων ανάml. Ακολούθως υπολογίζεται μαθηματικά ο όγκος του εναιωρήματος κυττάρων που απαιτείται να χρησιμοποιηθεί στο πείραμα, ανάλογα με τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων ανά well και το συνολικό αριθμό των wells προς χρήση. Έτσι, ο συνολικός αριθμός κυττάρων που χρειάζεται για το πείραμα διαιρείται με το συνολικό αριθμό των ζωντανών κυττάρων που είναι διαθέσιμα στην καλλιέργεια και, ως εκ τούτου, προκύπτει ο όγκος της αρχικής καλλιέργειας κυττάρων που απαιτείται για το πείραμα.

Ο υπολογισθέντας όγκος φυγοκεντρείται για 5 min, στα 1000 rpm, σε RT ($19-25^{\circ}\text{C}$), το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου, στο οποίο θα αναπτυχθούν τα κύτταρα. Αφού γίνει καλό pipetting, το εναιώρημα των κυττάρων διαμοιράζεται στα πηγάδια-κελιά (wells) της πλάκας ανάπτυξης των κυττάρων (plate).

Ακολουθεί ένα παράδειγμα που συνοψίζει όσα περιγράφηκαν παραπάνω.

Έστω, ότι σε ένα 24άρι well-plate θέλουμε να στρώσουμε 5.000 κύτταρα σε 6 wells. Τα ζωντανά κύτταρα στα 4 τεταρτημόρια βρέθηκαν πως ήταν: $52+66+37+40=195$. Άρα, ο μέσος όρος ισούται με $195/4=48,75$ cells/10μl. Έτσι, στο 1ml υπάρχουν: $48,75 \times 10.000=487.500$ cells.

Εφόσον θέλουμε 5000 cells/well, για τα 6 wells ισχύει: $5.000 \times 6=30.000$ cells θέλουμε συνολικά. Επομένως, απαιτούνται $30.000/487.500=0,0615$ ml ή 61,5μl από την αρχική καλλιέργεια κυττάρων, τα οποία θα φυγοκεντρήσουμε και στη συνέχεια θα επαναδιαλυτοποιήσουμε το ίζημα σε: $0,5 \text{ ml/well} \times 6 \text{ wells}=3 \text{ ml}$ κατάλληλου θρεπτικού, του DMEM cis.

3.2.2 Western-Blot Analysis

3.2.2.1 Προετοιμασία των δειγμάτων

Ημέρα 0: Πραγματοποιείται θρυψινοποίηση, μέτρηση και στρώσιμο κυττάρων HeLa σε δύο 6-wells-plates. Συγκεκριμένα, σε 9 wells προστίθενται 150.000 cells/well, τα οποία ήταν διαλυτοποιημένα σε 2 ml/well DMEM cis, και αφήνονται προς επώαση στους 37 °C, με πλούσια υγρασία περιβάλλοντος και 5 % CO₂, για 2 ημέρες. Τα κύτταρα αυτά θα αποτελέσουν πηγή πρωτεϊνικού εκχυλίσματος για την ανοσοαποτύπωση Western.

Ημέρα 2: Αφαιρείται το DMEM cis με αναρρόφηση από τα wells και προστίθενται οι υπό εξέταση ουσίες. Από εδώ και στο εξής η ουσία echinocystic acid θα αναφέρεται ως ουσία 26 ενώ η ουσία 3-O-glycoside of echinocystic acid θα αναφέρεται ως ουσία 27.

Η σύσταση των ουσιών είναι οι εξής:

- Control: 1.9ml DMEM cis + 1.9μl DMSO + 1.9μl EtOH 100%
- DEX: 1.9ml DMEM cis + 1.9μl DMSO + 1.9μl DEX 10⁻³ M
- DEX + RU: 1.9ml DMEM cis + 1.9μl DEX 10⁻³ M + 1.9μl RU 10⁻² M
- Δείγμα με ουσία 26: 1.9ml DMEMcis + 1.9μl TFC26 + 1.9μl EtOH 100%
- Δείγμα με ουσία 26 + DEX: 1.9ml DMEMcis + 1.9μl TFC26 + 1.9μl DEX 10⁻³M
- Δείγμα με ουσία 26 + RU: 1.9ml DMEMcis + 1.9μl TFC26 + 1.9μl RU 10⁻²M
- Δείγμα με ουσία 27: 1.9ml DMEMcis + 1.9μl TFC27 + 1.9μl EtOH 100%
- Δείγμα με ουσία 27 + DEX: 1.9ml DMEMcis + 1.9μl TFC27 + 1.9μl DEX 10⁻³M
- Δείγμα με ουσία 27 + RU: 1.9ml DMEMcis + 1.9μl TFC27 + 1.9μl RU 10⁻²M

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

3.2.2.2 Συλλογή κυτταρικών εκχυλισμάτων για Western Blot

Μετά το πέρας 48 ωρών, την τέταρτη δηλαδή ημέρα, πραγματοποιήθηκε η συλλογή των κυτταρικών εκχυλισμάτων, με την όλη διαδικασία να πραγματοποιείται στους 4 °C. Αρχικά, απομακρύνεται με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό των κυττάρων από τα wells και γίνεται μία πλύση με παγωμένο κι αποστειρωμένο PBS 1× (1ml/well). Στη συνέχεια, απορρίπτεται το PBS 1× με αναρρόφηση από τα wells και προστίθεται ξανά η ίδια ποσότητα διαλύματος PBS 1×. Με τη χρήση ειδικού scraper (για 1× και 6× wells-plates) ή ρύγχου πιπέτας (για 24× wells-plate) πραγματοποιείται η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων από τα wells και κάθε δείγμα μεταφέρεται σε falcon των 15 ml (για 1× well-plate) ή σε αριθμημένο σωληνάριο τύπου erpendorf των 1.5 ml (για 6× και 24× wells-plates), τα οποία διατηρούνται στον πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία για όλα τα δείγματα.

Μόλις, λοιπόν, ολοκληρωθεί η διαδικασία της αποκόλλησης για το σύνολο των δειγμάτων, προστίθεται μία επιπλέον ποσότητα, περίπου 250μl PBS 1× ανά well, κι επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία, ώστε να διασφαλιστεί η πλήρης αποκόλληση και συλλογή των κυττάρων από τα wells. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των εναιωρημάτων για 6 min, στα 1200 rpm, στους 4 °C και αφού γίνει η απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος, το ίζημα των κυττάρων που προκύπτει μπορεί, είτε να αποθηκευτεί στους -80 °C για μελλοντική χρήση, είτε να διαλυτοποιηθεί εκείνη τη στιγμή σε Lysis Buffer.

Έτσι, σε περίπτωση που ακολουθήσει αμέσως η λύση των κυττάρων, τα δείγματα μετά από αυτό το στάδιο απομακρύνονται από τον χώρο των κυτταροκαλλιεργειών και μεταφέρονται στο εργαστήριο, όπου και συνεχίζεται η υπόλοιπη διαδικασία. Τα πάντα από εδώ και πέρα γίνονται στον πάγο.

3.2.2.3 Λύση κυττάρων

Τα κύτταρα που προκύπτουν σε μορφή ιζήματος μετά τη φυγοκέντρηση, κατά τη διαδικασία της συλλογής τους, λύνονται σε Lysis Buffer (LB) 1×. Το LB

αποτελείται από 20mM Tris pH 7.5, 0.5% TritonX-100, 250mM NaCl και 3mM EDTA. Τα 4 αυτά αντιδραστήρια συγκροτούν το Buffer A, το οποίο φυλάσσεται στους 4 °C, και στο 1ml του διαλύματος αυτού, προστίθενται 10μl ProteaseI nhibitors 1/100, 2μl DTT 1M, το οποίο χρησιμεύει ως αναγωγικός παράγοντας και 0.5μl PMSF 20mM. Έτσι, προκύπτει το τελικό LB.

Η ποσότητα του LB που θα προστεθεί σε κάθε erpendorf γίνεται εμπειρικά και συνήθως εξαρτάται από το μέγεθος του ιζήματος. Συνήθως, προστίθεται ποσότητα των 50-70μl LB/erpendorf, το οποίο φροντίζουμε κάθε φορά να κάνουμε καλή ανακίνηση (Vortex), καθώς έχει δυσδιάλυτα κομμάτια. Τα κύτταρα επωάζονται με το LB για διάστημα 40-60 min, ενώ αποφεύγονται μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, λόγω της ύπαρξης του PMSF στο διάλυμα. Κατά τη διάρκεια της επώασης, τα δείγματα παραμένουν στον πάγο.

3.2.2.4 Ομογενοποίηση κυττάρων (Sonication)

Το κυτταρικό ίζημα, αφού διαλυθεί σε Sonication Buffer (ή Lysis Buffer), υπόκειται στην εφαρμογή υπερήχων με τη χρήση συσκευής υπερήχων (sonicator), με σκοπό την περαιτέρω λύση των κυττάρων. Πραγματοποιούνται 4-6 κύκλοι sonication διάρκειας 1sec, στο 40% ATT, με ενδιάμεσα διαστήματα παύσεων διάρκειας 28-30sec. Τα δείγματα διατηρούνται στον πάγο (4 °C).

3.2.2.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Bradford

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων που προέκυψαν από τα παραπάνω στάδια, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford [1976], χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford protein assay της Bio-Rad. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δείγματα, στα οποία η πρωτεϊνική συγκέντρωση κυμαίνεται από 1 μg/ml έως 1500 μg/ml.

Η μέθοδος Bradford είναι μια χρωματική μέθοδος που στηρίζεται στο εύρος των απορροφήσεων της χρωστικής Coomassie® Brilliant Blue G-250. Υπό όξινες συνθήκες, η εν λόγω χρωστική αντιδρά με αμινοξέα πρωτεϊνών, οπότε και δημιουργείται ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής

Coomassie, με το σύμπλοκο που δημιουργείται να εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε $\lambda=595$ nm, από τα 365nm που την εμφάνιζε αρχικά. Τυχόν αύξηση της απορρόφησης στα 595 nm, είναι ενδεικτική του ποσού της συνδεδεμένης χρωστικής κι ως εκ τούτου υποδεικνύει αύξηση στην περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη.

Γενικά, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο Bradford είναι αρκετά αξιόπιστα και εμφανίζουν μεγάλη επαναληψιμότητα, δύο χαρακτηριστικά που την καθιστούν την πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδο στα περισσότερα εργαστήρια [Bradford MM., 1976].

Αρχικά, κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη, βάση της οποίας θα γίνει η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Για τη δημιουργία αυτής της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιείται μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων πρωτεΐνης αλβουμίνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin, BSA) γνωστής συγκέντρωσης. Σε όγκο 20 μ l από το εκάστοτε πρότυπο δείγμα, συγκέντρωσης 0–20 mg/ml, προστίθενται 980 μ l αντιδραστήριου Bradford 1 \times . Τα διαλύματα (όγκου 1 ml) αναδεύονται και αφήνονται για επώαση για 30min, σε θερμοκρασία δωματίου (Room Temperature, R.T.), στο σκοτάδι. Μετά το πέρας των 30 min (χρονικό όριο ανάπτυξης χρώματος: από 5 έως 60 min), τα διαλύματα αναδεύονται καλά και φασματοφωτομετρούνται σε $\lambda=595$ nm.

Στον Πίνακα 3.1 που ακολουθεί δίνονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης BSA.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ BSA				
BSA 1mg/ml (μ l)	Tris 10mM pH 7.4 (μ l)	Αντιδραστήριο Bradford 1 \times (μ l)	BSA (μ g)	BSA (μ g/ml)
0	20	980	0	0
1	19	980	1	1
5	15	980	5	5
10	10	980	10	10
15	5	980	15	15
20	0	980	20	20

Οι τιμές της απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Πιο αναλυτικά, σχεδιάστηκε ένα καρτεσιανό επίπεδο συντεταγμένων, με τις τιμές των συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης

στον άξονα των τετημένων (οριζόντιος άξονας x) και τις τιμές των απορροφήσεων που προέκυψαν στα 595nm στον άξονα των τεταγμένων (κατακόρυφος άξονας y). Από τις τιμές της πρότυπης καμπύλης αναφοράς προκύπτει μία εξίσωση $OD_{595nm}=f(C)$, από την οποία μπορεί να υπολογιστεί η πρωτεϊνική συγκέντρωση κάθε δείγματος, εκφρασμένη σε $\mu\text{g/ml}$.

Ειδικότερα, για το κάθε δείγμα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Αρχικά, προστέθηκε 1 μl του υπό εξέταση δείγματος σε αριθμημένο erpendorf, στο οποίο έχει από πριν προστεθεί 1ml αντιδραστηρίου Bradford 1 \times . Ακολούθησε καλή ανάδευση των δειγμάτων κι επώαση για 20min, σε RT, απουσία φωτός. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στα 595nm και προσδιορισμός της συγκέντρωσης, και κατ' επέκταση της σύστασης κάθε δείγματος που θα ηλεκτροφορηθεί, σε πρωτεΐνη.

Στον Πίνακα 3.2 που ακολουθεί παρουσιάζεται η σύσταση των δειγμάτων HeLa που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν σε επόμενο στάδιο. Η σύσταση κάθε δείγματος είναι τετραπλάσια, ώστε να επαρκεί για την πραγματοποίηση 4 ηλεκτροφορήσεων. Αυτό συμβαίνει με σκοπό την εξοικονόμηση χρόνου, ώστε να μην χρειάζεται να επαναλαμβάνονται οι διαδικασίες της λύσης, της ομογενοποίησης και της ποσοτικοποίησης κάθε φορά που πρόκειται να ηλεκτροφορήσουμε κάποια δείγματα. Επιπλέον, με αυτόν τον τρόπο δεν καταπονούνται τα κύτταρα από το συνεχές πάγωμα-ξεπάγωμα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2					
ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ HeLa ΠΟΥ ΠΡΟΚΕΙΤΑΙ ΝΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΘΟΥΝ					
Δείγματα	OD_{595nm}	Συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα (μg)	Ποσότητα δείγματος (μl)	Tris pH 7.5 20mM (μl)	Ποσότητα S.B 4 \times (μl)
Control	0,714	20,4029	9,802529	50,20	20
DEX	0,553	15,73623	12,70952	47,29	20
TFC26	0,685	19,56232	10,22374	49,78	20
TFC26+DEX	0,507	14,4029	13,88609	46,11	20
TFC27	0,563	16,02609	12,47965	47,52	20
TFC27+DEX	0,475	13,47536	14,8419	45,16	20
DEX+RU	0,541	15,38841	12,9968	47,00	20
TFC26+RU	0,561	15,96812	12,52496	47,48	20
TFC27+RU	0,562	15,9971	12,50226	47,50	20

3.2.2.6 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Βάσει των αποτελεσμάτων της μεθόδου κατά Bradford, προετοιμάζονται τα διαλύματα φόρτωσης (loading samples), ώστε να περιέχεται σε αυτά μία σταθερή ποσότητα πρωτεΐνης ίση με 50 µg/well. Σε eppendorfs των 1.5 ml προστίθεται πρώτα η κατάλληλη ποσότητα ομογενοποιημένου εκχυλίσματος κυττάρων, στη συνέχεια το Tris 20 mM pH 7.5 και τέλος το Sample Buffer 4×, ώστε η τελική συγκέντρωση στο διάλυμα φόρτωσης του κάθε δείγματος να είναι 1×. Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση (loading samples) φυλάσσονται στους -20 °C, λόγω της παρουσίας του Sample Buffer, ενώ τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αποθηκεύονται στους -80 °C.

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

Για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών του βιολογικού εκχυλίσματος των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτυπώσεως κατά Western. Πρώτο απαραίτητο βήμα είναι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα SDS.

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

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πηκτώματα αгарόξης ή πολυακρυλαμιδίου. Η επιλογή εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του δείγματος που πρόκειται να διαχωριστεί. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιούνται για το

διαχωρισμό μορίων, όταν είναι αναγκαία μεγάλη διακριτική ικανότητα, ακόμη και μεταξύ μορίων που διαφέρουν σε μέγεθος μόνο κατά 0,1%. Αντίθετα, τα πηκτώματα αγαρόζης παρουσιάζουν μεγαλύτερο εύρος διαχωρισμού μεταξύ των μορίων (Sambrook J, 2000).

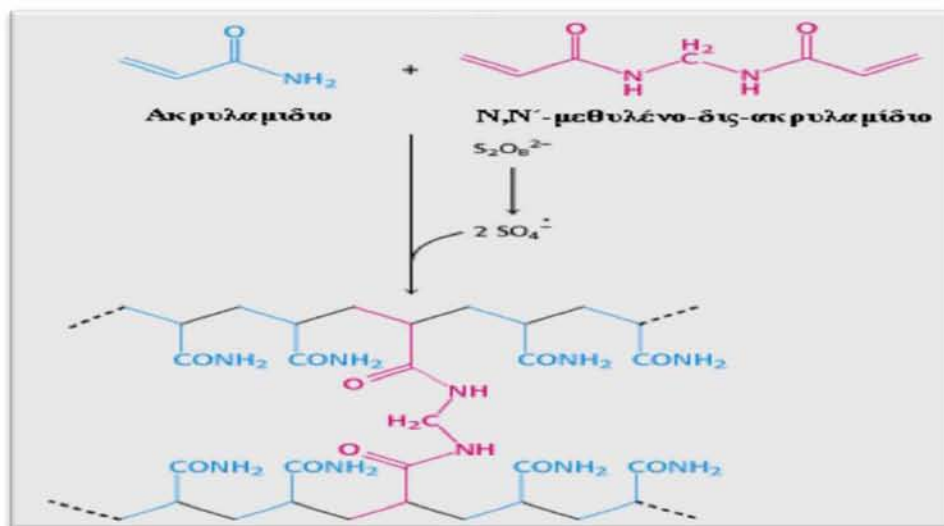
Στην παρούσα διπλωματική εργασία, έγινε χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε μια λεπτή πλάκα πολυακρυλαμιδίου ενώ η κατεύθυνση ροής είναι από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προτιμάται, επειδή το υλικό της είναι χημικά ουδέτερο, διαφανές και σταθερό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

Σε πρώτο βήμα, λοιπόν, στην ανάλυση κατά Western προετοιμάζεται η πηκτή ηλεκτροφόρησης. Η πηκτή διακρίνεται σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel), οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος των πόρων, το pH και την ιονική ισχύ. Το πήκτωμα συσσώρευσης, το οποίο έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από το πήκτωμα διαχωρισμού, χρησιμεύει για τη συμπύκνωση των πρωτεϊνών σε μια μικρή ζώνη, ώστε κατά την ηλεκτροφορητική διαδικασία αυτές να φτάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού, στο οποίο, όπως μαρτυρά και το όνομά του, θα διαχωριστούν οι πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτόν, η σύσταση του πηκτώματος συσσώρευσης είναι σταθερή, ενώ του πηκτώματος διαχωρισμού ποικίλει ανάλογα το μέγεθος των πρωτεϊνών που πρόκειται να διαχωριστούν.

Ο σχηματισμός της πηκτής γίνεται με την αντίδραση πολυμερισμού των μονομερών ακρυλαμιδίου και του N,N-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμιδίου (Bis acrylamide) (αντιδραστήριο διασταύρωσης) σε R.T., με τη βοήθεια των πολυμεριστικών παραγόντων: APS και TEMED. Το TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη) δρα ως επιταχυντής της αντίδρασης πολυμερισμού καταλύοντας το σχηματισμό ελεύθερων ριζών θείου που προκύπτουν από το APS (Ammonium Persulfate, υπερθειικό αμμώνιο), το οποίο παρέχει τις ελεύθερες ρίζες για να γίνει η έναρξη του πολυμερισμού. Η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να πραγματοποιηθεί απουσία O₂, καθώς αυτό μπορεί να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού και, ως εκ τούτου, να σταματήσει τη δημιουργία της πηκτής.

Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μακρών αλυσίδων ακρυλαμιδίου που συνδέονται μεταξύ τους με εγκάρσιες γέφυρες μορίων δισ-ακρυλαμιδίου,

δημιουργώντας πηκτώματα με μέγεθος πόρων που εξαρτώνται από την αναλογία των δύο μορίων αλλά και από την ολική τους συγκέντρωση (Εικόνα 3.3). Έτσι αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμιδίου, οδηγεί στη μείωση του μεγέθους των πόρων και το αντίστροφο. Η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου που θα χρησιμοποιηθεί τελικά, εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που πρόκειται να διαχωριστούν.



Εικόνα 3.3 Η αντίδραση σχηματισμού πηκτής πολυακρυλαμιδίου.

Με την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Στο μίγμα των πρωτεϊνών προστίθεται ο αποδιατακτικός παράγοντας SDS (Sodium DodecylSulfate, Δωδεκανοθειϊκό νάτριο), το οποίο συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να καταργούνται οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών, καθώς καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ των πρωτεϊνών.

Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες των πρωτεϊνών, έτσι αυτές φορτίζονται αρνητικά και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποδιάταξη τους, τον διαχωρισμό, δηλαδή, των υπομονάδων τους και τη δημιουργία συμπλόκων πρωτεΐνης-SDS. Στα σύμπλοκα αυτά, τα οποία όλα είναι αρνητικά φορτισμένα, ο λόγος της ποσότητας του SDS (ανιονικού φορτίου) που συνδέεται ανά μονάδα μάζας πρωτεΐνης, είναι σταθερός. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται είναι πολύ μεγαλύτερο από το αρχικό φορτίο της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα το αρχικό φορτίο να καθίσταται αμελητέο και έτσι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών που επιτυγχάνεται με τη κίνησή τους κατά μήκος του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου, να βασίζεται μόνο στη μοριακή τους μάζα (MW). Πρωτεΐνες μικρής μοριακής μάζας κινούνται ταχύτερα

στους πόρους της πηκτής από πρωτεΐνες μεγαλύτερης μοριακής μάζας. Οι πρωτεΐνες που χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο μέγεθος παρουσιάζουν αυξημένη τριβή κι έτσι έχουν ελαττωμένη κινητικότητα [John *et al.*, 1991].

Επιπλέον, γίνεται και περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών πριν την ηλεκτροφόρηση, είτε με τη χρήση αντιδραστηρίων, που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς και καταργούν τη 3D δομή και τα οποία περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (Sample Buffer, SB), όπως είναι η 2-μερκαπτοαιθανόλη, είτε με θέρμανση στους 100 °C. Τα βήματα αυτά γίνονται, έτσι ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη και μετουσίωση των πρωτεϊνών.

Η μήτρα εντός της οποίας σχηματίζεται η πηκτή είναι μια επίπεδη διάταξη δύο τζαμιών (επίπεδη ηλεκτροφόρηση) που απέχουν μεταξύ τους 1.0 mm. Οι θέσεις υποδοχής (slots ή wells) δημιουργούνται με την τοποθέτηση ειδικής χτένας στο πήκτωμα συσσώρευσης όσο αυτό είναι ακόμη σε υγρή μορφή.

Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού το πήκτωμα στερεώνεται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer 1×), τόσο στο επάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, έτσι ώστε να βρίσκεται σε άμεση επαφή με την πηκτή.

Τα προς φόρτωση δείγματα, αφού αποψυχθούν, υπόκεινται σε θέρμανση (95 °C, για 5 min) σε θερμαντική πλάκα για την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών και του DNA. Αμέσως μετά τη θέρμανση, υποβάλλονται σε μία φυγοκέντρηση διάρκειας λίγων δευτερολέπτων, στη μέγιστη ταχύτητα, έτσι ώστε τα δείγματα να έχουν ομοιογενή σύσταση πριν τη φόρτωσή τους στην πηκτή. Ακολουθεί το φόρτωμά τους στις ειδικές αύλακες, ενώ παράλληλα σε ένα από τα wells φορτώνεται ποσότητα από τον μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με τροφοδοτικό, δημιουργώντας ένα κλειστό σύστημα, στο οποίο διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής έντασης ίσο με 0.02 A.

Πειραματική διαδικασία:

Για την παρασκευή της πηκτής χρησιμοποιήθηκε μείγμα ακρυλαμίδιου: bis acrylamide αναλογίας 1:39 ενώ οι πηκτές διαχωρισμού, που παρασκευάστηκαν για τις ανάγκες του πειράματος, ήταν συγκέντρωσης 10% και 12%. Οι συστάσεις των πηκτωμάτων αναγράφονται στον Πίνακα 3.3 που ακολουθεί:

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3			
ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ (ΣΤΑΘΕΡΗ = 4 %) ΚΑΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ (10% ΚΑΙ 12%)			
Διαλύματα	Πήκτωμα συσσώρευσης	Πήκτωμα διαχωρισμού	
	4 %	10 %	12 %
ddH ₂ O	2,025 ml	2,425 ml	2,175 ml
Tris-HCl 1.5 MpH 6.8	0,21 ml	-	-
Tris-HCl 1.5 MpH 8.8	-	1,25ml	1,25 ml
SDS 10 %	25 μl	50 μl	50 μl
Bis/Acrylamide 40 %	0,25 ml	1,25ml	1,5 ml
TEMED	2,5 μl	2,5 μl	2,5 μl
APS 10 %	12,5 μl	25 μl	25μl

Στην ανοσοαποτύπωση κατά Western τα πηκτώματα διαχωρισμού ήταν πυκνότητας 10% και 12%. Η πυκνότητα 10% χρησιμοποιείται για τον καλύτερο διαχωρισμό πρωτεϊνών μοριακού μεγέθους 15-70 kDa, ενώ η πυκνότητα 12% για το διαχωρισμό πρωτεϊνών 10-55 kDa. Το Tris-HCl αποτελεί ρυθμιστικό διάλυμα. Οι ποσότητες που φορτώθηκαν ήταν 20 μl loading sample/well και 1-2 μl από το μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών (marker).

3.2.2.8 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blotting)

Αμέσως μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αφαιρείται από την ειδική συσκευή, απορρίπτεται το πήκτωμα συσσώρευσης και το πήκτωμα διαχωρισμού τοποθετείται προς εξισορρόπηση εντός ενός παγωμένου (4°C) διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί κάποιες φορές (mild used), για περίπου 10-15 min. Παράλληλα, εμποτίζονται σε παγωμένο, μη χρησιμοποιημένο διάλυμα Transfer Buffer (new) τέσσερα χαρτιά νιτροκυτταρίνης (W.B. filter papers) και μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κατάλληλων διαστάσεων, καθώς επίσης και δύο υδροαπορροφητικά σφουγγάρια ίδιων διαστάσεων. Όλες αυτές οι διαστάσεις είναι ίσες με το νέο μέγεθος της πηκτής.

Αφού περάσει ο χρόνος εξισορρόπησης, ετοιμάζεται η ειδική κασέτα και τα επιμέρους υλικά τοποθετούνται σε μια διάταξη τύπου sandwich, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην απομάκρυνση φυσαλίδων από το σύστημα με εφαρμογή ήπιας

μηχανικής πίεσης, καθώς η ύπαρξη τους μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στη διέλευση των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Η κασέτα τοποθετείται με κατάλληλο προσανατολισμό εντός της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς, η οποία βρίσκεται τοποθετημένη μέσα σε ένα κουτί από διογκωμένο πολυστυρένιο και περιτριγυρίζεται από μεγάλη ποσότητα πάγου ή παγοκύστες. Αυτό έχει ως σκοπό τη διατήρηση της θερμοκρασίας σε χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της ηλεκτρομεταφοράς, καθώς αυτή γίνεται σε μεγάλη ένταση ρεύματος και το ποσό θερμότητας που εκλύεται, μπορεί να συντελέσει στην εξάτμιση του Transfer Buffer και τελικά στην καταστροφή της πηκτής, εάν δεν υπάρχει πάγος.

Η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επιτελείται παρουσία φρέσκου παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Transfer Buffer με την εφαρμογή σταθερής έντασης ρεύματος 0.35 A, για χρονικό διάστημα 70 min. Ο χρόνος μπορεί να διαφοροποιηθεί ανάλογα με τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς, την πυκνότητα του πηκτώματος και το μέγεθος των υπό μελέτη πρωτεϊνών.

Μετά το πέρας των 70min, ακολουθεί σύντομη έκπλυση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε PBST (1×, σε ddH₂O) και σημειώνονται με μολύβι οι θέσεις των ζωνών του μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 10 % σε PBST (1×, σε ddH₂O), για 1 h, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου (R.T.), ώστε να δεσμευτούν και να αποκλειστούν οι θέσεις μη ειδικής σύνδεσης του αντισώματος (blocking).

Κατόπιν, η μεμβράνη εκπλένεται στιγμιαία με PBST (1×, σε ddH₂O) και είτε αποθηκεύεται στους -20 °C, είτε επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της υπό μελέτη πρωτεΐνης. Η επώαση γίνεται ολονύκτια (12-16h), υπό ανάδευση, στους 4 °C. Αφού απομακρυνθεί το πρωτογενές αντίσωμα, πραγματοποιούνται 5 εκπλύσεις των 5 min σε PBST (1×, σε ddH₂O) και η μεμβράνη επωάζεται για 1-3h (συνήθως 1h και 30min) σε R.T. με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα σε 2 % διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος. Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά έναντι σταθερών επιτόπων IgG του πρωτογενούς αντισώματος και είναι χημικά προσδεδεμένο με κατάλληλο προσδέτη (HRP) που επιτρέπει την ανίχνευσή του. Τόσο τα πρωτογενή όσο και τα δευτερογενή αντισώματα εμπεριέχονται σε διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 2% με PBST 1% (σε ddH₂O) και φυλάσσονται στους -20 °C. Κατόπιν, γίνονται 3 εκπλύσεις των 5 min σε PBST (1×, σε ddH₂O).

Για την αντίδραση εμφάνισης σήματος χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit της Pierce, το οποίο περιλαμβάνει τα διαλύματα ECL A και ECL B. Γίνεται ανάμειξη κατάλληλου όγκου των δύο διαλυμάτων σε αναλογία 1:1 και με το διάλυμα αυτό επωάζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για 3 min, στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Συνήθως, η ποσότητα που θα προστεθεί από τα δύο διαλύματα καθορίζεται από τον ερευνητή κι έχει να κάνει με το μέγεθος της μεμβράνης. Μόλις περάσει το διάστημα των 3min, η μεμβράνη τοποθετείται εντός μίας πλαστικής διαφανούς μεμβράνης σε μία ειδική κασέτα που δεν επιτρέπει τη διέλευση του φωτός, καθώς τα ECL διαλύματα είναι φωτοευαίσθητα.

Η εμφάνιση του σήματος σε φιλμ γίνεται σε σκοτεινό θάλαμο με χρήση των αντιδραστηρίων του εμπορικού kit της Kodak. Ένα κομμάτι φιλμ κατάλληλων διαστάσεων έρχεται σε άμεση επαφή με τη μεμβράνη, για χρονικό διάστημα που ορίζει ο ερευνητής, και ακολουθεί η εμφάνιση του σήματος με επώαση του φιλμ για ~1 min στο διάλυμα Developer, ενδιάμεση έκπλυσή του σε νερό για περίπου 10sec, επώαση για ~1 min στο διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) και ξανά έκπλυσή του σε νερό.

Μόλις τελειώσει η διαδικασία της εμφάνισης και προκύψει φιλμ με σήμα κατάλληλης έντασης, η μεμβράνη εκπλένεται με PBST 1× για περίπου 10-15 min, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του ECL. Στο σημείο αυτό, η μεμβράνη μπορεί είτε να χρησιμοποιηθεί για νέο κύκλο εμφανίσεων, είτε να αποθηκευτεί στους -20 °C. Ωστόσο, είναι σημαντικό η μεμβράνη να μην ξηραίνεται, γι' αυτό και τυλίγεται σε πλαστική διαφανή μεμβράνη πριν από την αποθήκευσή της.

3.2.2.9 Western Blot για PEPCK, GR, Caspase 3, Caspase 9, Bcl-2, p65 (NF-κB) & β-actin

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιολόγηση της δράσης δύο τριτερπενίων, του echinocystic acid και του 3-O-glycoside of echinocystic acid, στην GR σηματοδότηση. Έτσι, για την εξαγωγή συμπερασμάτων, μελετήθηκε, με την τεχνική Western Blot, η επίδραση των παραπάνω τριτερπενίων σε ορισμένα ένζυμα-κλειδιά του μεταβολισμού (PEPCK) και της απόπτωσης (Caspase3, Caspase 9, Bcl-2), όπου αποδεδειγμένα εμπλέκονται τα

γλυκοκορτικοειδή μέσω του υποδοχέα τους, καθώς επίσης και στον ίδιο τον υποδοχέα (GR) και σε μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται μ' αυτόν (NF-κB).

Αρχικά, λοιπόν, μελετήθηκε η επιρροή των ουσιών 26 και 27 στα μεταγραφικά επίπεδα του γλυκονεογενετικού ενζύμου καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), παρουσία κι απουσία DEX και του RU-486. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί εάν οι ουσίες αυτές επηρεάζουν το μονοπάτι της γλυκονεογένεσης, εξαιτίας των δομικών ομοιοτήτων τους που έχουν βρεθεί με τα γλυκοκορτικοειδή. Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το PEPCK H-300 της εταιρείας Santa-Cruz σε αραιώση 1/1.000 και το αντίστοιχο δευτερογενές ήταν το rHRP της εταιρείας Pierce σε αραιώση 1/50.000.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον υποδοχέα GR, προκειμένου να διαπιστωθεί, κατά πόσο οι ουσίες αυτές, παρουσία κι απουσία DEX και του RU-486, επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης του ίδιου του GR. Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το GR H-300 της εταιρείας Santa-Cruz σε αραιώση 1/1.000 και το αντίστοιχο δευτερογενές ήταν το rHRP της εταιρείας Pierce σε αραιώση 1/50.000.

Ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε, ακόμα, για να αξιολογηθούν οι αντικαρκινικές ιδιότητες των ουσιών 26 και 27. Η αξιολόγηση αυτή έγινε με μελέτη της επίδρασης των ουσιών 26 και 27, παρουσία κι απουσία DEX και του RU-486, στην επαγωγή της απόπτωσης, μέσω ελέγχου των επιπέδων των κασπασών 3 και 9 και του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Caspase 3 E₂₇ της εταιρείας Abcam σε αραιώση 1/1.000, η Caspase 9 (9508) και το Bcl-2 (2876) της εταιρείας Cell Signalling σε αραιώση 1/500. Τα δευτερογενή αντισώματα ήταν για την Caspase 9 (9508) το mHRP και για τις υπόλοιπες περιπτώσεις το rHRP της εταιρείας Pierce σε αραιώση 1/50.000.

Οι ουσίες 26 και 27, παρουσία κι απουσία DEX και του RU-486, μελετήθηκαν με δοκιμασίες Western Blotting για να διαπιστωθεί εάν το σύμπλοκο ουσίας-υποδοχέα επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το p65 (SC-109) της εταιρείας Santa-Cruz σε αραιώση 1/500 και το αντίστοιχο δευτερογενές ήταν το rHRP της εταιρείας Pierce σε αραιώση 1/50.000.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί πως οι ακτίνες είναι άκρως συντηρημένες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική κίνηση, δομή και ακεραιότητα (Gunning P, 1997). Η β-actin αποτελεί μία από τις έξι διαφορετικές ισομορφές της ακτίνης που έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο και χρησιμοποιείται στην ανοσοαποτύπωση κατά Western ως μάρτυρας ισοφόρτωσης (loading control) των δειγμάτων. Το αντίσωμα της β-actin που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Sigma σε αραιώση 1/4.000 ενώ το αντίστοιχο δευτερογενές αντίσωμα ήταν το mHRP της εταιρείας Pierce σε αραιώση 1/50.000. Βάση των επιπέδων έκφρασης της β-actin, έγινε η επεξεργασία-κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων και η εξαγωγή των συμπερασμάτων όσον αφορά τις μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των υπόλοιπων μορίων που μελετήθηκαν με τη διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

3.2.3 Κατεργασία με ενεργό άνθρακα για παρασκευή cis-FBS

Για την απενεργοποίηση του FBS προς παρασκευή cis-FBS εφαρμόστηκε κατεργασία με ενεργό άνθρακα σύμφωνα με πρωτόκολλο που αφορά διαδοχικές επώσεις του FBS με τον ενεργό άνθρακα και τελικά απομάκρυνση αυτού με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και διηθήσεις μέσα από φίλτρα πόρων 0,2μm.

Γενικά, ο ενεργός άνθρακας έχει τη δυνατότητα να προσδένεται σε λιπόφιλα μόρια και να αφαιρεί, με αυτόν τον τρόπο, ορμόνες από το FBS, όπως ανδρογόνα, οιστραδιόλη, προγεστερόνη, κορτιζόλη, T3 και T4 ή έστω να μειώνει σημαντικά τα επίπεδά τους. Η αφαίρεση των λιπιδικών αυτών ορμονών του ορού είναι εξαιρετικά σημαντική, καθώς συμβάλλει στην κατανόηση της επίδρασής τους μετά την εξωγενή τους προσθήκη.

3.2.4 Μετασηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Η συγκεκριμένη διαδικασία γίνεται στον πάγκο του εργαστηρίου παρουσία αναμένου λύχου για την επίτευξη ημιστείρων συνθηκών ενώ σε καμία περίπτωση δεν γίνεται στον χώρο των κυτταροκαλλιεργειών, λόγω του υψηλού κινδύνου επιμόλυνσης των κυττάρων που διατηρούνται στο χώρο αυτό.

Ο μετασηματισμός έγινε σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* στελέχους DH5aTM (LifeTechnologies-Invitrogen), τα οποία ήταν αποθηκευμένα σε 30-40 % γλυκερόλη

στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν αυτή του θερμικού σοκ (heat-shock), η οποία περιλαμβάνει τα εξής στάδια: Σε πλαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf (1.5 ml) που περιέχει 80 μl E.coli DH5a κυττάρων, προστίθεται 1 μl του επιθυμητού πλασμιδίου, το οποίο βρίσκεται αποθηκευμένο στους -80°C σε γλυκερόλη, και αφήνονται για επώαση στον πάγο στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, για $\geq 30\text{ min}$. Ανά 10 min κάνουμε μία πολύ μικρή ανάδευση. Κατόπιν, το erpendorf μεταφέρεται για 1 min σε υδατόλουτρο, που είναι ρυθμισμένο στους $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, και ξανά στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 2 min. Αμέσως μετά ακολουθεί η προσθήκη 1 ml αποστειρωμένου LB Broth, κλείσιμο του erpendorf με parafilm και επώασή του για 1 h, στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, υπό ανάδευση (210 rpm). Τέλος, γίνεται επίστρωση 1/500 του αρχικού όγκου σε τρυβλίο με LB-άγαρ, το οποίο περιέχει και κατάλληλο αντιβιοτικό, αμπικιλίνη (amp) ή καναμυκίνη (kan), σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$ ή 50 $\mu\text{g/ml}$, αντίστοιχα. Υπό στείρες συνθήκες και με τη βοήθεια γαλίνου διανομέα, γίνεται η διασπορά των βακτηριακών κυττάρων στο τρυβλίο κι έπειτα επωάζονται ολονύκτια ($\sim 16\text{ h}$), στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.5 Πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (pDNA) από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα σε μεσαία κλίμακα (midi prep)

Μετά το πέρας των 16h, έγινε απομόνωση και καθαρισμός των νέων πλασμιδίων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της QIAGEN και χρησιμοποιώντας το plasmid midi kit για πλασμίδια υψηλής καθαρότητας και υψηλών αντιγράφων, επαρκούς, δηλαδή, καθαρότητας και συγκέντρωσης για τα πειράματα διαμόλυνσης [QIAGEN®, 2012]. Τα πλασμίδια που απομονώθηκαν ήταν το pSV40- β Gal και το pMMTV-GRE-Luc, για την κλωνοποίηση των οποίων χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων Escherichia coli στελέχους DH5a, με τη διαδικασία που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2.4. Ο έλεγχος καθαρότητας καθώς και η ποσοτικοποίηση του pDNA έγινε με φωτομέτρηση (UV/Vis) σε αραιώση 1/200. Τέλος, τα πλασμίδια αποθηκεύτηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.6 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων (Transfection)

Τα καρκινικά κύτταρα HeLa υπέστησαν παροδική διαμόλυνση με εξωγενές γενετικό υλικό, μέσω της μεθόδου των λιποσωμάτων. Με βάση τη μέθοδο αυτή, το εξωγενές γενετικό υλικό βρίσκεται στο εσωτερικό του λιποσώματος και εισέρχεται

στο εσωτερικό του κυττάρου, λόγω της λιπιδικής φύσης της μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, εντός των λιποσωμάτων εσωκλείεται κατάλληλο πλασμιδιακό DNA και δεδομένης της λιπιδικής φύσης της κυτταρικής μεμβράνης, τα λιποσώματα συντήκονται με αυτή, απελευθερώνοντας εντός του κυττάρου το περιεχόμενό τους. Επίσης, τα λιποσώματα είναι δυνατό να διεισδύσουν στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης με παθητική διάχυση ή ακόμη και να εισαχθούν με διαδικασίες ενδοκυττάρωσης κ.ά. [Torchilin, 2005].

Για το συγκεκριμένο πείραμα, έγινε χρήση του εμπορικού αντιδραστηρίου λιποφεκταμίνη® 2000 με αναλογία εξωγενούς DNA:χρησιμοποιούμενη λιποφεκταμίνη 1:1. Η συγκεκριμένη μέθοδος διαμόλυνσης αλλά και ο συγκεκριμένος λόγος DNA/λιποφεκταμίνη επιλέχθηκαν μετά από δοκιμαστικά test διαμόλυνσης, όπου εξετάστηκαν διάφορες συνθήκες. Γενικότερα, ο χρησιμοποιούμενος λόγος συγκεντρώσεων υφίσταται τροποποιήσεις, για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της διαμόλυνσης [Dalby *et al.*, 2004].

Τα πειράματα διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa που πραγματοποιήθηκαν, χωρίζονται σε 3 κατηγορίες, με βάση τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά και βέβαια το σκοπό εκτέλεσης κάθε πειράματος. Ακολουθεί η παρουσίασή τους στις επόμενες παραγράφους.

3.2.6.1 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40-βGal & pMMTV-GRE-Luc

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa ήταν να εξακριβωθεί το κατά πόσο οι υπό εξέταση ουσίες 26 και 27 μπορούν, μετά από πρόσδεσή τους στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), να προσδεθούν άμεσα στα στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη (GREs) και να προκαλέσουν επαγωγή ή καταστολή των γονιδίων-στόχων. Για το λόγο αυτόν, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pSV40 με ένθεμα τη β-γαλακτοσιδάση (pSV40-βGal) και pMMTV με ένθεμα το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράση υπό έναν υποκινητή που φέρει GREs αλληλουχίες (pMMTV-GRE-Luc) με αρχικές συγκεντρώσεις 920 ng/μl και 882 ng/μl, αντίστοιχα.

Επιπλέον, η όλη διαδικασία γίνεται παρουσία κι απουσία δεξαμεθαζόνης (DEX), η οποία αποδεδειγμένα προσδένεται στον υποδοχέα, προκαλώντας την

μετατόπιση του στον πυρήνα και την έναρξη της μεταγραφής. Με άλλα λόγια, αποτελεί το θετικό control του πειράματος. Έτσι, είναι δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το αν οι ουσίες δρουν συνεργικά ή ανταγωνιστικά με την DEX.

Πειραματική διαδικασία:

Ημέρα 0: Πραγματοποιείται θρυψινοποίηση των κυττάρων HeLa και στρώσιμο σε 18 κελιά ενός 24× wells-plate 50.000 cells/well σε θρεπτικό υλικό DMEM cis. Τα κύτταρα αφήνονται για επώαση για 24h, στους 37 °C, με πλούσια υγρασία περιβάλλοντος και 5 % CO₂.

Ημέρα 1: Ελέγχεται η πληρότητα των κελιών (wells) της πλάκας ανάπτυξης (plate) σε κύτταρα. Έφτασε περίπου στο 80 %, ποσοστό ικανό για διαμόλυνση, οπότε συνεχίστηκε το εργαστηριακό πρωτόκολλο.

Σε πρώτο βήμα, γίνεται αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού των κυττάρων με το θρεπτικό υλικό της διαμόλυνσης, προσθέτοντας 200μl αντιδραστηρίου OptiMEM/well ενώ τα plates επανατοποθετούνται στον επωαστήρα, μέχρι να γίνει η διαμόλυνση των κυττάρων με το εξωγενές γενετικό υλικό. Το OptiMEM δεν διαθέτει αντιβιοτικά (αντιμυκωτικά), ούτε FBS και η προσθήκη του γίνεται, προκειμένου τα κύτταρα να συνηθίσουν στις νέες συνθήκες, δηλαδή στο νέο θρεπτικό, κι έτσι να γίνει πιο εύκολα ο μετασχηματισμός. Για το λόγο αυτό, αυτή η αλλαγή του DMEM cis με το OptiMEM συνίσταται να γίνει τουλάχιστον μισή ώρα προτού ξεκινήσει η διαδικασία της διαμόλυνσης των κυττάρων (transfection).

Ακολούθως ετοιμάζονται 2 μείγματα: Το μείγμα I αποτελείται από το σύνολο των επιθυμητών πλασμιδιακών DNA μαζί με OptiMEM και το μείγμα II συνίσταται από την κατάλληλη ποσότητα λιποφεκταμίνης με OptiMEM, ως εξής:

- MixI: 625μl OptiMEM + 4,075μl pSV40-βGal (920 ng/μl) + 4,25μl pMMTV-GRE-Luc (882 ng/μl)
- MixII: 625μl OptiMEM + 7,5μl lipofectamine

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι συγκεντρώσεις των πλασμιδίων pSV40-βGal και pMMTV-GRE-Luc ήταν 920 ng/μl και 882 ng/μl, αντίστοιχα.

Έτσι, οι παραπάνω ποσότητες προέκυψαν ως εξής:

- Για το OptiMEM: $25 \mu\text{l/well} \times 25 \text{ wells} = 625 \mu\text{l}$ συνολικά σε κάθε Mix
- Για την β -Gal: $0,15 \mu\text{g/well} \times 25 \text{ wells} = 3,75 \mu\text{g} = 3750(\text{ng}) / 920(\text{ng}/\mu\text{l}) = 4,075 \mu\text{l}$
- Για το GRE-Luc: $0,15 \mu\text{g/well} \times 25 \text{ wells} = 3,75 \mu\text{g} = 3750(\text{ng}) / 882(\text{ng}/\mu\text{l}) = 4,25 \mu\text{l}$

Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι συνολικά εισάγονται $0,3 \mu\text{g DNA/well}$. Με βάση το ότι χρησιμοποιείται λιποφεκταμίνη® 2000 με αναλογία εξωγενούς DNA:χρησιμοποιούμενη λιποφεκταμίνη 1:1, η κατάλληλη ποσότητα λιποφεκταμίνης προκύπτει ως εξής:

- $0,3 \mu\text{g DNA/well}$ άρα και $0,3 \mu\text{l lipofectamine/well} \times 25 \text{ wells} = 7,5 \mu\text{l lipofectamine}$ συνολικά

Πριν την προσθήκη της λιποφεκταμίνης, φροντίζουμε να κάνουμε πολύ καλή ανάδευση, καθώς έχει την τάση να δημιουργεί στιβάδες.

Οι παραπάνω ποσότητες αντιστοιχούν σε 25 wells ενώ το στρώσιμο των κυττάρων έγινε σε 18 wells. Αυτό συνέβη, ώστε να υπάρχει περίσσεια των δύο Mix και έτσι να είμαστε σίγουροι ότι η ποσότητά τους θα φτάσει για όλα τα wells.

Ακολουθεί ανάμιξη των 2 Mix, με το MixI να μεταφέρεται στο falcon που περιέχει το MixII, ανάδευση και επώαση του νεοσχηματιζόμενου Master-mix στο σκοτάδι, για 5-10 min. Κατόπιν, το ολικό μείγμα διαμοιράζεται με σταδιακή ροή στα wells, σε ποσότητα $50 \mu\text{l/well}$, ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε well να είναι $250 \mu\text{l}$, και τα κύτταρα αφήνονται για επώαση για 4 h στον επωαστικό κλίβανο (37°C , 5 % CO_2). Μετά το πέρας των 4h, γίνεται αντικατάσταση του Master mix με $0,5 \text{ ml/well DMEM cis}$ και τα plates επανατοποθετούνται στον επωαστήρα για 48h.

Ημέρα 3: Αφού αφαιρεθεί με αναρρόφηση το DMEM cis από τα wells, γίνεται προσθήκη ουσιών στο $24 \times \text{wells-plate}$.

Το plate χωρίζεται στα δύο ανάλογα με το αν στα δείγματα υπάρχει ή όχι DEX και η προσθήκη των ουσιών γίνεται όπως φαίνεται στο σχήμα.

-DEX			+DEX		
Control ₁	Control ₂	Control ₃	DEX ₁	DEX ₂	DEX ₃
TFC26 ₁	TFC26 ₂	TFC26 ₃	TFC26 ₁	TFC26 ₂	TFC26 ₃
TFC27 ₁	TFC27 ₂	TFC27 ₃	TFC27 ₁	TFC27 ₂	TFC27 ₃

Έχουμε εις τριπλούν δείγματα μάρτυρες (controls), δείγματα που έχουν επωαστεί μόνο με DEX 10^{-3} M και δείγματα που έχουν επωαστεί με τις ουσίες, παρουσία ή απουσία DEX 10^{-3} M. Αυτό ονομάζεται triplicate και γίνεται με σκοπό τη μείωση των πειραματικών σφαλμάτων.

Προκειμένου, να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη μείωση των πειραματικών σφαλμάτων και κατά την προσθήκη των ουσιών, έγιναν 2 Mix, ανάλογα με το αν περιείχαν ή όχι δεξαμεθαζόνη, ως εξής:

- Mix DEX⁻ : 3,25ml DMEM cis + 0,375μl EtOH 100%
- Mix DEX⁺ : 3,25ml DMEM cis + 0,375μl DEX 10-3 M

Αναλυτικά η σύσταση των δειγμάτων ήταν η ακόλουθη:

- Control: 750μl Mix DEX⁻ + 0,75μl DMSO
- DEX: 750μl Mix DEX⁺ + 0,75μl DMSO
- TFC_{26,27}DEX⁻ : 750μl Mix DEX⁻ + 0,75μl TFC_{26,27}
- TFC_{26,27}DEX⁺ : 750μl Mix DEX⁺ + 0,75μl TFC_{26,27}

Σε κάθε well γίνεται εισαγωγή 250μl του αντίστοιχου δείγματος και έπειτα τα plates τοποθετούνται στον επωαστήρα για 6h.

Οι παραπάνω συγκεντρώσεις έχουν επιλεγεί ως οι καταλληλότερες βάσει αποτελεσμάτων από παλαιότερες μελέτες μας. Ο χρόνος έκθεσης επιλέχθηκε, επίσης, βάσει προηγούμενων αποτελεσμάτων που αποδεικνύουν πως η μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση του GR παρουσία της DEX παρατηρείται στις 5 με 16 h έκθεσης [Nehmé *et al.* 2009].

Μετά το πέρας των 6h, γίνεται απομάκρυνση των ουσιών με αναρρόφηση από το plate και έκπλυση των wells με παγωμένο κι αποστειρωμένο PBS 1×. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 70μl/well παγωμένου Lysis Buffer 1× (συγκέντρωση stock 5×), ώστε να γίνει λύση των κυττάρων και το plate αφήνεται για επώαση για 30min, στους 4°C, σε ήπια ανάδευση. Ακολουθεί αποκόλληση του περιεχομένου

κάθε well μέσω απόξεσης με tip και τοποθέτησή του σε αριθμημένο σωληνάριο τύπου erpendorf (1.5ml). Τα erpendorfs φυγοκεντρώνονται για 30min, στους 4°C, στα 13.500rpm. Τέλος, συλλέγεται το υπερκείμενο κάθε δείγματος σε νέο αριθμημένο erpendorf (1.5ml) και αποθηκεύονται στους -80 °C, μέχρι την εκτέλεση των δοκιμασιών λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης.

3.2.6.2 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40-βGal & p-NF-κB-Luc

Σκοπός του συγκεκριμένου transfection ήταν η μελέτη της πιθανής καταστολής του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB από τις εξεταζόμενες ουσίες 26 και 27 μέσω της GR σηματοδότησης και κατ' επέκταση της επίδρασής τους στις ανοσολογικές αποκρίσεις, όπως η καταστολή φλεγμονωδών γονιδίων. Γι' αυτόν το λόγο, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pSV40-βGal και p-NF-κB-Luc, ενώ όλη η διαδικασία της διαμόλυνσης έγινε παρουσία και απουσία του TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha), ο οποίος αποτελεί ισχυρό ενεργοποιητή του NF-κB [(Malinin NL, 1997); (Psarra AM, 2009)]. Επομένως, έγινε δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την πιθανή συνεργική ή ανταγωνιστική δράση μεταξύ του TNFα και των υπό εξέταση ενώσεων. Όλες οι υπόλοιπες συνθήκες του πειράματος παρέμειναν ίδιες με αυτές που περιγράφηκαν στο προηγούμενο transfection.

Πειραματική διαδικασία:

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στο συγκεκριμένο transfection ήταν η ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.6.1., με ορισμένες διαφοροποιήσεις στη σύσταση των Mix πριν το transfection, καθώς και στη σύσταση των ουσιών. Στη συνέχεια, παρουσιάζεται συνοπτικά η πειραματική διαδικασία, δίνοντας έμφαση στα σημεία που διαφοροποιείται από το προηγούμενο transfection.

Ημέρα 0: Θρυψινοποίηση κυττάρων HeLa και στρώσιμο σε 18 κελιά ενός 24× wells-plates 50.000 cells/well σε DMEMcis.

Ημέρα 1: Transfection των κυττάρων με τα πλασμίδια pSV40-βGal και p-NF-κB-Luc σε συγκεντρώσεις 920 ng/μl και 770 ng/μl, αντίστοιχα.

Τα Μίχ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- MixI: 625μl OptiMEM + 4,075μl pSV40-βGal (920 ng/μl) + 4,87μl p-NF-κB-Luc (770 ng/μl)
- MixII: 625μl OptiMEM + 7,5μl lipofectamine

Ημέρα 3: Προσθήκη ουσιών στο 24× wells-plate. Το plate χωρίζεται στα δύο ανάλογα με το αν στα δείγματα υπάρχει ή όχι TNFα και η προσθήκη των ουσιών γίνεται όπως φαίνεται στο σχήμα.

TNFα -			TNFα+		
Control ₁	Control ₂	Control ₃	TNFα ₁	TNFα ₂	TNFα ₃
TFC26 ₁	TFC26 ₂	TFC26 ₃	TFC26 ₁	TFC26 ₂	TFC26 ₃
TFC27 ₁	TFC27 ₂	TFC27 ₃	TFC27 ₁	TFC27 ₂	TFC27 ₃

Τα Μίχ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Mix TNFα- : 3,25ml DMEM cis + 0,375μl ddH₂O
- Mix TNFα+ : 3,25ml DMEM cis + 0,375μl TNFα (10 μg/μl)

Αναλυτικά η σύσταση των δειγμάτων ήταν η ακόλουθη:

- Control: 750μl Mix TNFα- + 0,75μl DMSO
- TNFα: 750μl Mix TNFα+ + 0,75μl DMSO
- TFC_{26,27}TNFα - : 750μl Mix TNFα- + 0,75μl TFC_{26,27}
- TFC_{26,27}TNFα+ : 750μl Mix TNFα+ + 0,75μl TFC_{26,27}

Μετά τη λύση και τη συλλογή των κυττάρων, εφαρμόζονται τα πρωτόκολλα προσδιορισμού της λουσιφεράσης και της β-γαλακτοσιδάσης.

3.2.6.3 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40-βGal, p-NF-κB-Luc, pEGFPC₂ & pEGFPC₂-GR

Σύμφωνα με δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας είναι γνωστό και καθολικά αποδεκτό ότι το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη (DEX) μπορεί να καταστείλει τον πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα NF-κB. Ειδικότερα, σε πειράματα

διαμόλυνσης κυττάρων HeLa, με πλασμίδιο που περιείχε τον υποδοχέα GR, παρατηρήθηκε καταστολή της δράσης του NF-κB από τη δεξαμεθαζόνη, μέσω διασταυρούμενης επικοινωνίας των σηματοδοτικών μονοπατιών GR και NF-κB. Επίσης, όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, ο TNFα αποτελεί ισχυρό ενεργοποιητή του NF-κB, επάγοντας, έτσι, τη μεταγραφή φλεγμονωδών γονιδίων.

Με βάση, λοιπόν, αυτά τα δεδομένα αποφασίστηκε ο σχεδιασμός και η εκτέλεση ενός πειράματος παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa, με στόχο την εξακρίβωση του κατά πόσο οι υπό εξέταση ουσίες 26 και 27, μπορούν να λειτουργήσουν ως ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες μέσω της επίδρασης τους στο σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες λουσιφεράσης ελέγχου της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB, παρουσία ή απουσία DEX, TNFα και υπερεκφρασμένου GR. Γι' αυτόν το λόγο, στο συγκεκριμένο transfection χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pEGFPC₂ και pEGFPC₂-GR, που υπερεκφράζουν ή όχι τον υποδοχέα GR, καθώς επίσης και τα πλασμίδια pSV40-βGal και p-NF-κB-Luc.

Πειραματική διαδικασία:

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε και στο συγκεκριμένο transfection ήταν η ίδια με αυτή που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.6.1., με ορισμένες διαφοροποιήσεις και πάλι στη σύσταση των Mix πριν το transfection και στη σύσταση των ουσιών. Στη συνέχεια, παρουσιάζεται συνοπτικά η πειραματική διαδικασία, δίνοντας έμφαση στα σημεία που διαφοροποιείται από τα προηγούμενα transfection.

Ημέρα 0: Θρυψινοποίηση κυττάρων HeLa και στρώσιμο τριών 24× wells-plates με 50.000 cells/well σε DMEMcis.

Ημέρα 1: Transfection των κυττάρων με τα πλασμίδια pSV40-βGal, p-NF-κB-Luc, pEGFPC₂ και pEGFPC₂-GR σε συγκεντρώσεις 920 ng/μl, 770 ng/μl, 935 ng/μl και 890 ng/μl, αντίστοιχα.

Αρχικά, δημιουργήθηκε ένα Master-mix που είχε την εξής σύσταση:

- Master-mix: 1875μl OptiMEM + 12,23μl pSV40-βGal (920ng/μl) + 14,61μl p-NF-κB-Luc (770 ng/μl)

Αυτό το Master-mix χωρίστηκε στα 2 κι έτσι προέκυψαν δύο MixI διαμόλυνσης των κυττάρων, στα οποία, στο ένα προσθέσαμε το πλασμίδιο pEGFPC₂ και στο άλλο το πλασμίδιο pEGFPC₂-GR, ως ακολούθως:

- MixIGR- = 945μl Master-mix + 28,065μl pEGFPC₂ (935 ng/μl)
- MixIGR+ = 945μl Master-mix + 29,49μl pEGFPC₂-GR (890 ng/μl)

Το σύνολο των wells των τριών 24× wells-plate του πειράματος είναι 72. Όλες οι παραπάνω ποσότητες, όμως, αντιστοιχούν σε 75 wells. Αυτό συνέβη, ώστε να υπάρχει περίσσεια των Mix και έτσι να είμαστε σίγουροι ότι η ποσότητά τους θα φτάσει για όλα τα wells.

Να σημειωθεί πως στο Master-mix υπάρχει συνολικά ποσότητα 0.3μg DNA/well, 0.15 μg/well από το κάθε πλασμίδιο, ενώ η ποσότητα του κάθε πλασμιδίου που προστίθεται στο αντίστοιχο Mix είναι 0.35 μg/well.

Με βάση την αναλογία εξωγενούς DNA:λιποφεκταμίνη 1:1, η κατάλληλη ποσότητα λιποφεκταμίνης προκύπτει ως εξής:

- 0,65μg DNA/well άρα και 0,65μl lipofectamine/well × 75 wells = 48,75μl lipofectamine συνολικά

Για τη λιποφεκταμίνη έγιναν 2 MixII κοινής σύστασης, ένα για κάθε συνθήκη, δηλαδή για GR⁻/GR⁺:

- MixII: 937,5μl OptiMEM + 24,375μl lipofectamine

Ημέρα 3: Προσθήκη ουσιών στα τρία 24× wells-plate. Τα plates έχουν χωριστεί στα δύο ανάλογα με το transfection που έχουν υποστεί.

Επίσης, η προσθήκη των ουσιών δεν γίνεται σε 3 wells κάθε φορά αλλά σε ολόκληρη σειρά, αφού στόχος είναι η εξαγωγή συμπερασμάτων για τα ίδια δείγματα, παρουσία κι απουσία υπερκφρασμένου GR. Έτσι, στο 1^ο plate δεν εισάγεται ποσότητα από τις εξεταζόμενες ουσίες, καθώς στο plate αυτό υπάρχουν τα control δείγματα της κάθε συνθήκης. Αντίθετα, στο 2^ο και 3^ο plate προστίθενται οι ουσίες 26 και 27, υπό 4 διαφορετικές συνθήκες. Για την καλύτερη κατανόηση της διαδικασίας παρατίθενται τα ακόλουθα σχήματα.

Plate #1(Control)

**Διαμόλυνση με PEGFPC₂
(Mix_{GR-})**

**Διαμόλυνση με PEGFPC₂-GR
(Mix_{GR+})**

Control ₁	Control ₂	Control ₃	Control ₁	Control ₂	Control ₃
Control+DEX ₁	Control+DEX ₂	Control+DEX ₃	Control+DEX ₁	Control+DEX ₂	Control+DEX ₃
Control+TNFa ₁	Control+TNFa ₂	Control+TNFa ₃	Control+TNFa ₁	Control+TNFa ₂	Control+TNFa ₃
Control+DEX+TNFa ₁	Control+DEX+TNFa ₂	Control+DEX+TNFa ₃	Control+DEX+TNFa ₁	Control+DEX+TNFa ₂	Control+DEX+TNFa ₃

Plate #2 (TFC26)

**Διαμόλυνση με PEGFPC₂
(Mix_{GR-})**

**Διαμόλυνση με PEGFPC₂-GR
(Mix_{GR+})**

TFC26 ₁	TFC26 ₂	TFC26 ₃	TFC26 ₁	TFC26 ₂	TFC26 ₃
TFC26+DEX ₁	TFC26+DEX ₂	TFC26+DEX ₃	TFC26+DEX ₁	TFC26+DEX ₂	TFC26+DEX ₃
TFC26+TNFa ₁	TFC26+TNFa ₂	TFC26+TNFa ₃	TFC26+TNFa ₁	TFC26+TNFa ₂	TFC26+TNFa ₃
TFC26+DEX+TNFa ₁	TFC26+DEX+TNFa ₂	TFC26+DEX+TNFa ₃	TFC26+DEX+TNFa ₁	TFC26+DEX+TNFa ₂	TFC26+DEX+TNFa ₃

Plate #3 (TFC27)

**Διαμόλυνση με PEGFPC₂
(Mix_{GR-})**

**Διαμόλυνση με PEGFPC₂-GR
(Mix_{GR+})**

TFC27 ₁	TFC27 ₂	TFC27 ₃	TFC27 ₁	TFC27 ₂	TFC27 ₃
TFC27+DEX ₁	TFC27+DEX ₂	TFC27+DEX ₃	TFC27+DEX ₁	TFC27+DEX ₂	TFC27+DEX ₃
TFC27+TNFa ₁	TFC27+TNFa ₂	TFC27+TNFa ₃	TFC27+TNFa ₁	TFC27+TNFa ₂	TFC27+TNFa ₃
TFC27+DEX+TNFa ₁	TFC27+DEX+TNFa ₂	TFC27+DEX+TNFa ₃	TFC27+DEX+TNFa ₁	TFC27+DEX+TNFa ₂	TFC27+DEX+TNFa ₃

Τα Μίχ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Για το Plate #1: MixI: 6,5ml DMEM cis + 6,5μl DMSO
- Για το Plate #2: MixII: 6,5ml DMEM cis + 6,5μl TFC26
- Για το Plate #3: MixIII: 6,5ml DMEM cis + 6,5μl TFC27

Αναλυτικά η σύσταση των δειγμάτων, ανάλογα με το plate που πρόκειται να προστεθούν, ήταν η ακόλουθη:

- Control/TFC26/TFC27: 1,5ml MixI/II/III + 1,5μl EtOH 100% + 1,5μl ddH₂O
- Control/TFC26/TFC27 (+DEX): 1,5ml MixI/II/III + 1,5μl DEX 10⁻³M + 1,5μl ddH₂O
- Control/TFC26/TFC27 (+TNFa): 1,5ml MixI/II/III + 1,5μl TNFa 10 μM + 1,5μl EtOH 100%
- Control/TFC26/TFC27 (+DEX+ TNFa): 1,5ml MixI/II/III + 1,5μl DEX 10⁻³M + 1,5μl TNFa 10μM.

Μετά τη λύση και τη συλλογή των κυττάρων, εφαρμόζονται τα πρωτόκολλα προσδιορισμού της λουσιφεράσης και της β-γαλακτοσιδάσης.

3.2.7 Πρωτόκολλο λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης

Συνίσταται από δύο ξεχωριστές δοκιμασίες: τη δοκιμασία μέτρησης της ενεργότητας της λουσιφεράσης και της β-γαλακτοσιδάσης. Βάσει των αποτελεσμάτων και των δύο δοκιμασιών, εξάγονται οι τιμές σε κανονικοποιημένη μορφή.

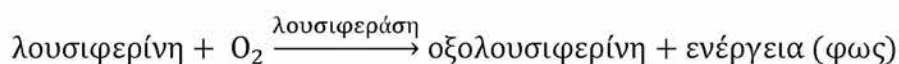
3.2.7.1 Δοκιμασία λουσιφεράσης

Η έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης υπόκειται σε μεταγραφικό έλεγχο από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) ή από το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, καθώς βρίσκεται καθοδικά ενός υποκινητή που φέρει επαναλαμβανόμενες GRE αλληλουχίες ή NF-κB ανταποκρινόμενες αλληλουχίες αντίστοιχα. Έτσι,

χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς, δίνοντας πληροφορίες σχετικά με τη μεταγραφική ενεργότητα των κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί με τη συγκεκριμένη μοριακή κατασκευή.

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος στηρίζεται στην ανίχνευση φωτός που παράγεται από την οξείδωση της χρωστικής λουσιφερίνη. Η αντίδραση χημειοφωταύγειας είναι η ακόλουθη:



Η παραπάνω αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο λουσιφεράση και γίνεται σε 2 στάδια, με την παρουσία συμπαραγόντων, όπως το ATP ή τα Ca²⁺. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης προσδιορίζεται με μέτρηση του παραγόμενου φωτός σε λουμινόμετρο (της εταιρείας Berhold) και εκφράζεται σε μονάδες RLU.

Πειραματική διαδικασία:

Η δοκιμασία της λουσιφεράσης έπεται της διαδικασίας της διαμόλυνσης των κυττάρων (βλέπε § 3.2.6 «Παροδική διαμόλυνση κυττάρων»). Αρχικά, τα δείγματα αφήνονται να ξεπαγώσουν σε πάγο από τους -80 °C που ήταν αποθηκευμένα. Στη συνέχεια, γίνεται ανάμιξη 10μl του υπό εξέταση δείγματος με 100μl διαλύματος υποστρώματος λουσιφεράσης. Το διάλυμα αυτό είναι φωτοευαίσθητο και απαρτίζεται από τα εξής συστατικά:

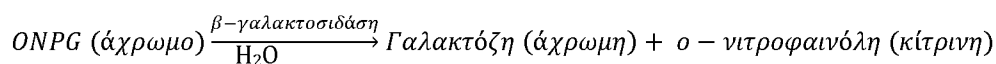
- ✚ 470 μM λουσιφερίνη
- ✚ 530 μM ATP
- ✚ 270 μM συνένζυμο-A
- ✚ 20 mM Tris pH 8.0
- ✚ 2.67 mM MgSO₄
- ✚ 0.1 mM EDTA
- ✚ 33.3 mM DTT
- ✚ ddH₂O μέχρι τη συμπλήρωση του απαιτούμενου όγκου

3.2.7.2 Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης

Σε αντίθεση με τη λουσιφεράση, η έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης δεν υπόκειται σε μεταγραφική ρύθμιση από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Ο προσδιορισμός της ενεργότητάς της, όμως, είναι απαραίτητος για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την έκφραση του γονιδίου της GRE-λουσιφεράσης.

Αρχή της μεθόδου:

Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης προσδιορίζεται με μελέτη της υδρόλυσης του χρωμογόνου υποστρώματος 2-Nitrophenyl b-D-galactopyranoside (ONPG), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη διαλύματος Na_2CO_3 1 M (R.T.), το οποίο διαμορφώνει την τιμή του pH της αντίδρασης στο 11. Στο συγκεκριμένο pH η β-γαλακτοσιδάση καθίσταται ανενεργή και η ο-νιτροφαινόλη σταθεροποιείται στην ανιονική της μορφή, κίτρινου χρώματος [Miller, 1972]. Το έγχρωμο προϊόν που παράγεται μπορεί να προσδιοριστεί με φωτομέτρηση στα 420nm.

Πειραματική διαδικασία:

Η δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, όπως και της λουσιφεράσης, έπεται της διαδικασίας της διαμόλυνσης των κυττάρων (βλέπε § 3.2.6 «Παροδική διαμόλυνση κυττάρων»).

Σε όγκο 20μl από το κάθε υπό εξέταση δείγμα προστίθενται 0.3μl διαλύματος ιόντων Mg^{2+} 100× και 201μl διαλύματος sodium phosphate, δουλεύοντας στον απαγωγό. Το διάλυμα ιόντων Mg^{2+} αποτελείται από 31.5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 10% v/v MgCl_2 και 58.5% v/v ddH₂O. Το διάλυμα sodium phosphate αποτελείται από NaH_2PO_4 0.2M, Na_2HPO_4 0.2M και ddH₂O. Τελευταίο προστίθεται το υπόστρωμα της αντίδρασης, ONPG, σε όγκο 66 μl. Ακολουθεί γρήγορη ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στους 37 °C, στο σκοτάδι, μέχρι την ανάπτυξη επαρκούς έντασης κίτρινου χρώματος. Το διάστημα αυτό μπορεί να διαρκέσει από 30min έως

και όλη νύχτα. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 500μl διαλύματος Na₂CO₃ 1M σε κάθε erpendorf και ακολουθεί φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 420nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα, το οποίο περιέχει ό, τι περιέχουν και τα υπόλοιπα δείγματα, με τη διαφορά πως, αντί για δείγμα, προστίθενται 20μl από το Lysis Buffer που χρησιμοποιήθηκε.

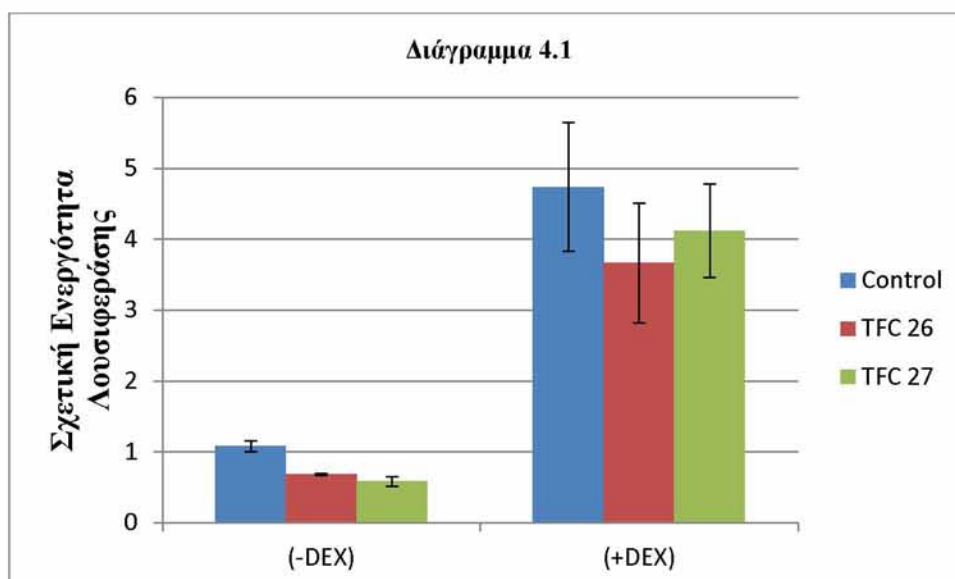
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η απαρχή για τη διεξαγωγή των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε με βάση τα αποτελέσματα πειραμάτων ανοσοϊστοχημείας, που είχαν ήδη διεξαχθεί στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, σύμφωνα με τα οποία τα τριτερπένια echinocystic acid και 3-O glycoside of echinocystic acid ή οι ουσίες TFC26 και TFC27 αντίστοιχα, όπως ονομάστηκαν για λόγους διευκόλυνσης, επάγουν τη μετατόπιση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) από το διαλυτό κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Για τη διαλεύκανση της περαιτέρω δράσης τους, έλαβαν χώρα δοκιμασίες λουσιφεράσης και αναλύσεις Western Blot, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια.

4.1 Διερεύνηση της επίδρασης των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας και στα επίπεδα έκφρασης του GR

Σκοπός του πρώτου πειράματος παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40-βGal και pMMTV-GRE-Luc ήταν ο έλεγχος της επίδρασης των υπό εξέταση ουσιών 26 και 27 στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR, μέσω άμεσης πρόσδεσης του συμπλόκου ουσία-υποδοχέα στα στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη (GREs) και κατά συνέπεια ελέγχου της έκφρασης του γονιδίου της λουσιφεράσης. Επιπλέον, όλη η πειραματική διαδικασία έγινε παρουσία ή απουσία δεξαμεθαζόνης, η οποία αποδεδειγμένα προσδένεται στον υποδοχέα, προκαλώντας την μετατόπιση του στον πυρήνα και την έναρξη της μεταγραφής, υπό συνθήκες ελαχιστοποίησης των επιπέδων των ορμονών που περιέχονται στο υλικό ανάπτυξης των κυττάρων.

Έτσι, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4.1, παρουσία δεξαμεθαζόνης, επάγεται αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, όπως και αναμενόταν. Αντίθετα, τόσο απουσία όσο και παρουσία δεξαμεθαζόνης, οι ουσίες 26 και 27 παρουσιάζουν μία σχετική μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, σε σχέση τα αντίστοιχα κύτταρα μάρτυρες (ανερέθιστα (control) κύτταρα και ενεργοποιημένα με DEX κύτταρα αντίστοιχα), γεγονός που αποδεικνύει ότι καμία από τις δύο ουσίες δεν ενεργοποιεί τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR. Αντίθετα, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η μετακίνηση του υποδοχέα στον πυρήνα, υπό την επίδραση των ουσιών, πιθανόν να οδηγεί σε μερική καταστολή της μεταγραφικής του δραστηριότητας.

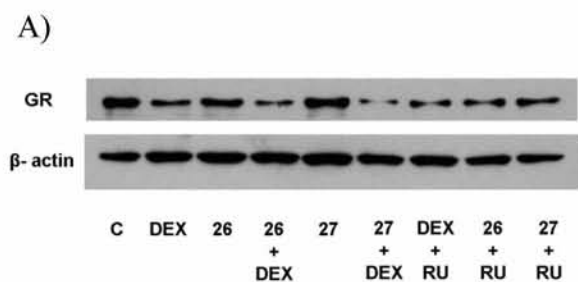


Διάγραμμα 4.1 Επίδραση των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στην ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR.

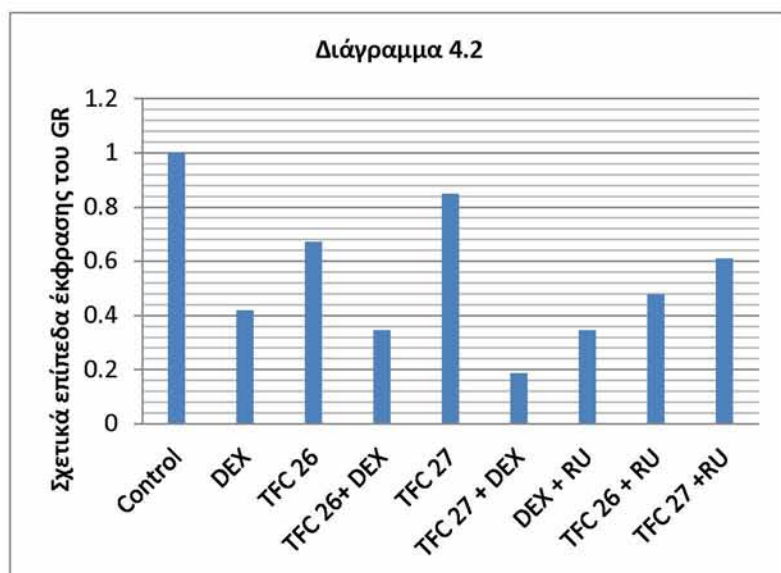
Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί πως με βάση τη βιβλιογραφία, η δεξαμεθαζόνη μειώνει σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα του διαθέσιμου GR στους περιφερικούς ιστούς (σπλήνα και υπόφυση) αλλά και στα κύτταρα HeLa [(Shimojo *et al.*, 1995); (Ramamoorthy and Cidlowski, 2013)]. Επίσης, έχει αποδειχθεί πως η μείωση αυτή εξαρτάται από τη δόση της χορηγούμενης δεξαμεθαζόνης [(Chenran Zhang, 2015); (Cole MA, 2000); (Nishimura K, 2001)]. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται στην ανάλυση Western Blot που έγινε με αντίσωμα έναντι του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, όπου παρατηρείται αισθητή μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων

του διαθέσιμου GR, σε δείγματα παρουσία δεξαμεθαζόνης, σε σχέση με τα αντίστοιχα απουσία δεξαμεθαζόνης. Επίσης, όμοια με την επίδραση της δεξαμεθαζόνης, μικρή σχετικά μείωση των επιπέδων GR παρατηρούμε και παρουσία των ουσιών 26 και 27, η οποία μάλιστα ενισχύεται όταν οι ουσίες χορηγηθούν σε συνδυασμό με την δεξαμεθαζόνη, υποδηλώνοντας ότι οι υπό μελέτη ουσίες δρουν συνεργικά με τη δεξαμεθαζόνη. Η εικόνα που προέκυψε από την ανάλυση Western Blot (Εικόνα 4.1A), συνοδεύεται από ποσοτικό προσδιορισμό της έντασης της κάθε ζώνης του διαθέσιμου GR, μέσω πυκνομετρίας, που προέκυψε από κανονικοποίηση συγκριτικά πάντα με τα επίπεδα της β-ακτίνης (Διάγραμμα 4.2).

Ο αναστολέας RU-486 (RU) αποτελεί γνωστό ανταγωνιστή των γλυκοκορτικοειδών [Valsala Haridas, 2011]. Επομένως, ανταγωνίζεται, σε μεταγραφικό επίπεδο, τη δράση και των συνθετικών γλυκοκορτικοειδών, της δεξαμεθαζόνης, και ενδεχομένως και των ουσιών 26 και 27. Παρουσία RU δεν παρατηρούμε άρση της επαγόμενης από DEX, TFC 26 και TFC 27 μείωσης των επιπέδων GR, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων GR, τόσο παρουσία DEX, όσο και παρουσία των ουσιών, πιθανόν να μην οφείλεται σε μεταγραφικό έλεγχο αλλά σε μη γενωμικές δράσεις του υποδοχέα, πειραματικό σφάλμα ή βελτιστοποίηση του πειραματικού πρωτοκόλλου.



B)



Εικόνα 4.1 Επίδραση των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στα επίπεδα έκφρασης του GR. A) Western blot ανάλυση B) Γραφική απεικόνιση της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων ως προς τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης.

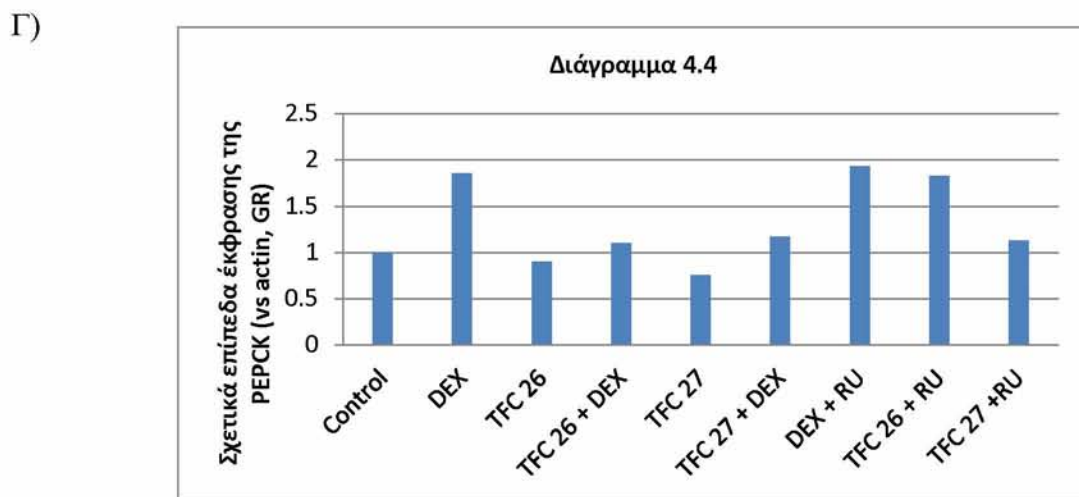
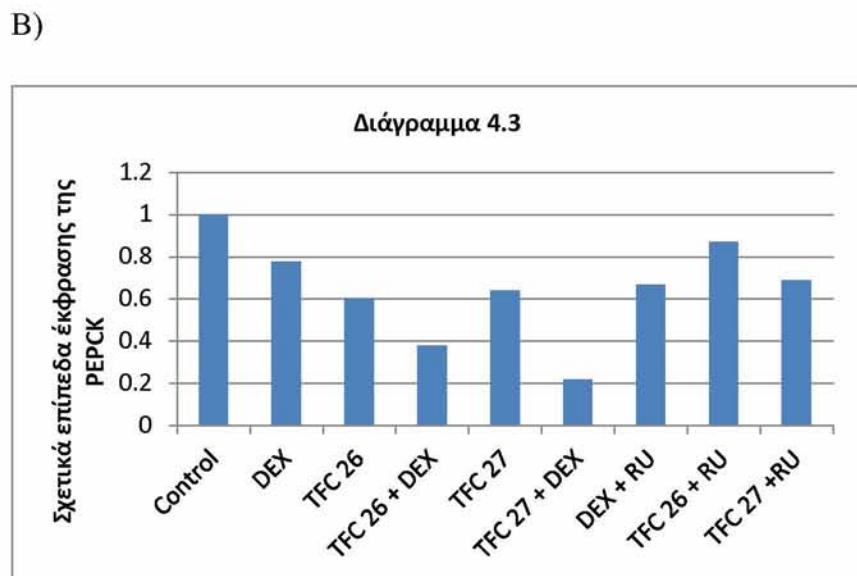
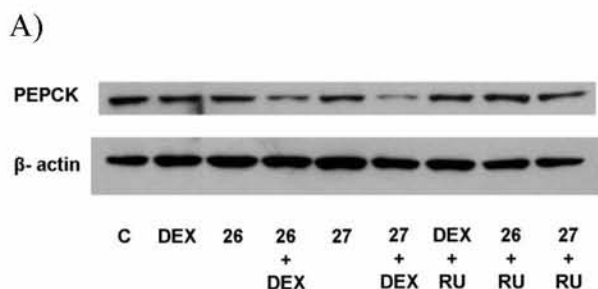
4.2 Διερεύνηση της επίδρασης των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK

Western Blot πραγματοποιήθηκε και για το γλυκονεογενετικό ένζυμο καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), που αποτελεί γονίδιο-στόχο του GR. Η δράση του ρυθμίζεται από την παρουσία γλυκοκορτικοειδών και είναι γνωστό πως επάγεται παρουσία δεξαμεθαζόνης [(Hwang SL, 2012); (Sengupta S, 2001); (Hall RK, 2007)]. Ωστόσο, στο διάγραμμα 4.3 παρατηρούμε πως παρουσία τόσο δεξαμεθαζόνης όσο και των ουσιών 26 και 27 σημειώνεται μία μείωση στα επίπεδα της PEPCK. Επειδή, όμως, όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 4.1, παρουσία δεξαμεθαζόνης αλλά και των υπό εξέταση ουσιών, που έχουν συνεργική δράση με τη δεξαμεθαζόνη, παρατηρείται μείωση των επιπέδων του GR και η PEPCK αποτελεί γονίδιο-στόχο του GR, πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της PEPCK που προέκυψαν από την ανάλυση Western Blot (Εικόνα 4.2A) συγκριτικά με τα επίπεδα της β-ακτίνης και του GR. Έτσι, προκύπτει το διάγραμμα 4.4, όπου παρατηρείται ότι λαμβάνοντας υπ' όψιν τις μεταβολές του GR σε πρωτεϊνικό επίπεδο και κανονικοποιώντας τα αποτελέσματα μας ως προς αυτές, προκύπτει ότι η παρουσία δεξαμεθαζόνης προκάλεσε, όπως αναμενόταν, ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας των υπάρχοντων μορίων GR και κατά συνέπεια μικρή αύξηση των επιπέδων της PEPCK.

Είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι τελικά παρατηρούμε μείωση των επιπέδων της PEPCK (εικόνα 4.2A), η οποία, όμως, όπως αποδεικνύεται από το διάγραμμα 4.4, οφείλεται σε μείωση των επιπέδων GR και όχι σε μείωση της μεταγραφικής του δραστηριότητας. Πράγματι, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4.4, παρουσία των ουσιών 26 και 27 δεν παρατηρείται σημαντική αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK, από τα διαθέσιμα μόρια GR. Παρουσία ουσιών και δεξαμεθαζόνης, ωστόσο, παρατηρούμε ότι αίρεται η επαγωγική δράση της DEX στην ενεργοποίηση της έκφρασης των επιπέδων της PEPCK, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ουσίες δεν ενεργοποιούν την μεταγραφική δραστηριότητα του GR, κάτι που βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τα πειράματα μέτρησης της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR. Αντίθετα, προκύπτει ότι οι υπό εξέταση ουσίες δρουν σαν ανταγωνιστές της δράσης της DEX, μειώνοντας τα επίπεδα έκφρασης της PEPCK. Κατ' αυτόν τον τρόπο, δεν επάγεται η γλυκονεογενετική πορεία και έτσι

συμπεραίνουμε ότι οι ουσίες έχουν και αντικαρκινική δράση, επεμβαίνοντας στην αποτροπή της εμφάνισης του φαινομένου Warburg.

Παρουσία RU και DEX δεν παρατηρείται η αναμενόμενη άρση της δράσης της DEX, ενώ παρουσία RU και των ουσιών 26 και 27 παρατηρείται μείωση της ανασταλτικής τους δράσης.

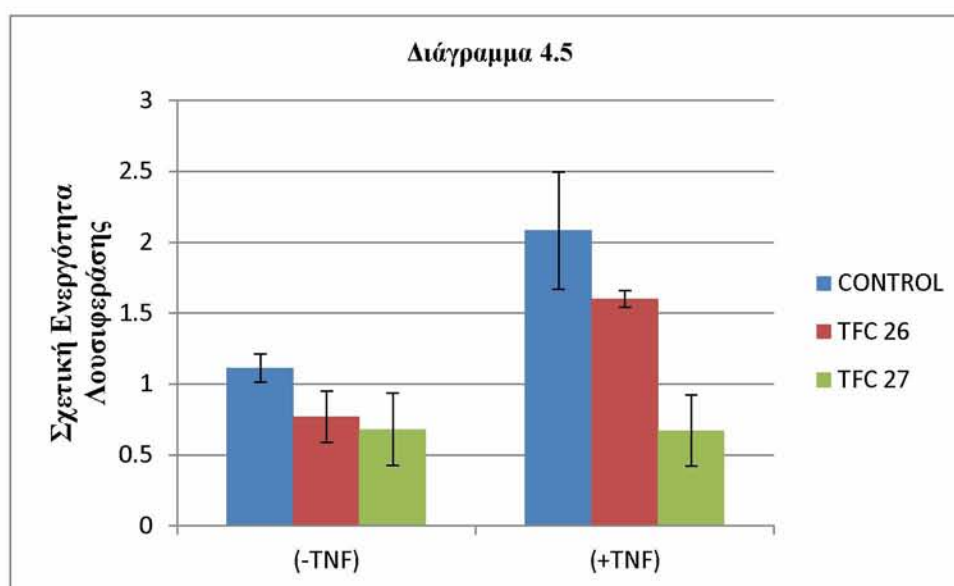


Εικόνα 4.2 Επίδραση των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK. A) Western blot ανάλυση B) Γραφική απεικόνιση της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων ως προς τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης. Γ) Γραφική απεικόνιση της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων ως προς τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης και του GR.

4.3 Διερεύνηση της επίδρασης των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας και στα επίπεδα έκφρασης του NF-κB

Σκοπός του δεύτερου πειράματος παροδικής διαμόλυνσης με τα πλασμίδια pSV40-βGal και p-NF-κB-Luc, ήταν η εξακρίβωση του κατά πόσο οι υπό εξέταση ουσίες 26 και 27 ασκούν τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις καταστέλλοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Όλη η πειραματική διαδικασία έγινε παρουσία και απουσία του TNFα, ο οποίος αποτελεί ενεργοποιητή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB.

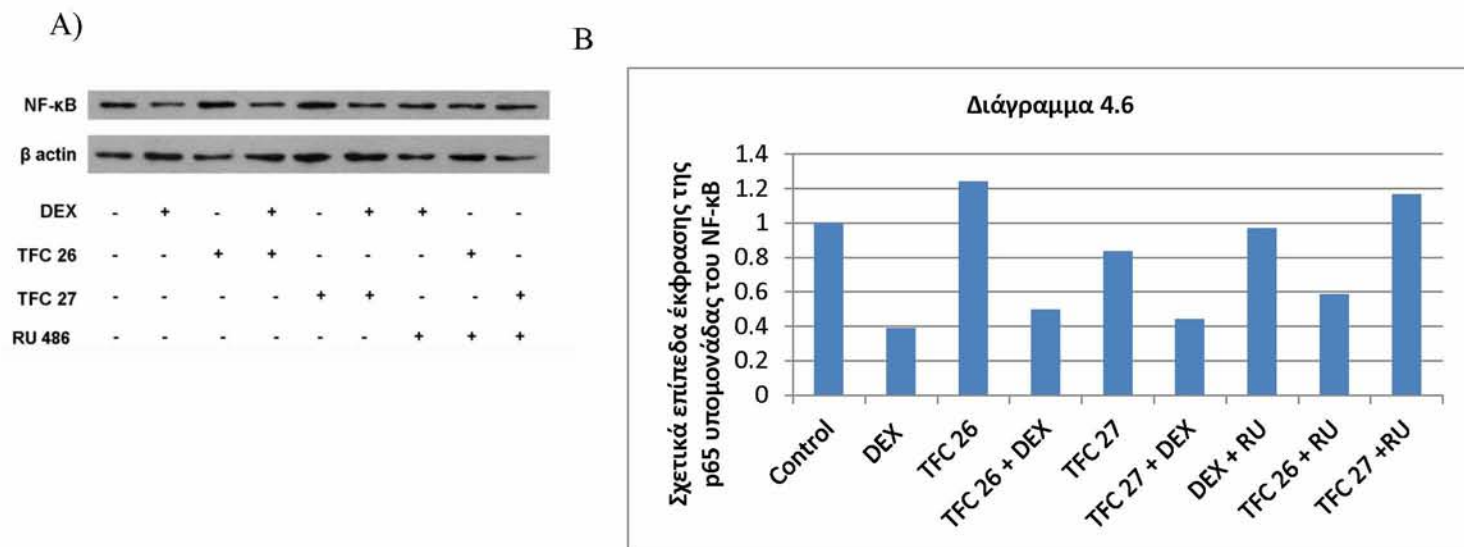
Έτσι, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4.5, ο TNFα, όπως και αναμενόταν, ενεργοποιεί τον NF-κB. Αντίθετα οι ουσίες 26 και 27 καταστέλλουν την από τον TNFα-επαγόμενη (παρουσία TNFα) ενεργοποίηση του NF-κB. Ομοίως σε ανερέθιστα κύτταρα (απουσία TNFα) παρατηρείται μείωση της δραστηριότητας του ενδογενώς ενεργοποιημένου NF-κB. Επομένως, οι ουσίες 26 και 27 έχουν ανταγωνιστική δράση σε σχέση με τον TNFα, άρα και αντιφλεγμονώδη δράση.



Διάγραμμα 4.5 Μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB υπό την επίδραση των ουσιών TFC 26 και TFC 27.

Στην συνέχεια, έγινε έλεγχος της επίδρασης των ουσιών στα επίπεδα έκφρασης της p65 υπομονάδας του NF-κB. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.3, οι

ουσίες 26 και 27 δεν μεταβάλουν σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης της p65 υπομονάδας του NF-κB, σε αντίθεση με την DEX, που φαίνεται να τα μειώνει. Ο ανταγωνιστής των γλυκοκορτικοειδών RU-486, όταν χορηγείται σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη, αίρει την ανασταλτική της δράση, όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης της p65 υπομονάδας του NF-κB, όπως και αναμενόταν. Έτσι, λοιπόν, από το Διάγραμμα 4.5 και από την εικόνα 4.3 διαφαίνεται ότι οι ουσίες 26 και 27 μειώνουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB, χωρίς να επηρεάζουν τα επίπεδά του.



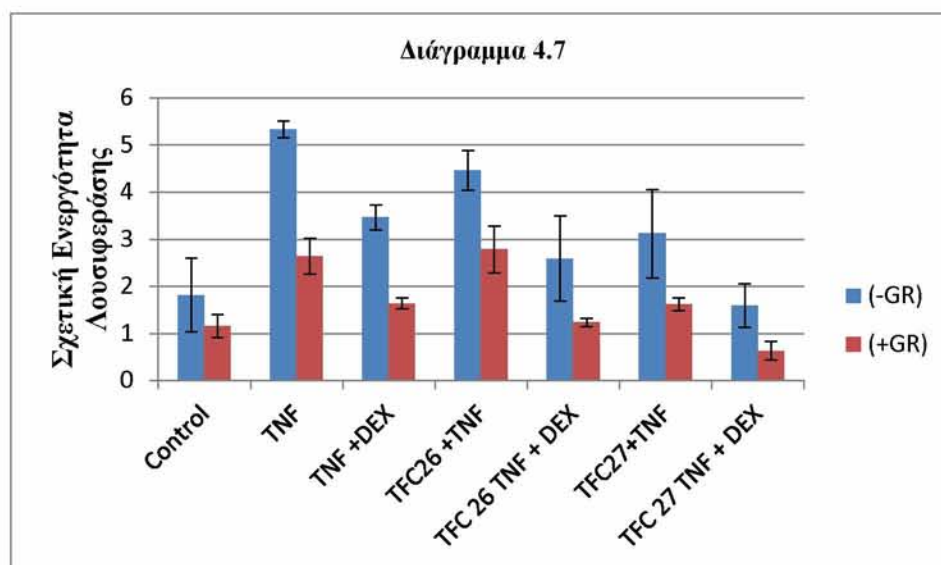
Εικόνα 4.3 Επίδραση των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στα επίπεδα έκφρασης της p65 υπομονάδας του NF-κB. A) Western blot ανάλυση B) Γραφική απεικόνιση της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων ως προς τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης.

Έτσι, λοιπόν, ομοίως με την DEX, οι ουσίες φαίνεται να έχουν ανοσοκατασταλτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Η διαφοροποίηση, ωστόσο, σε σχέση με την DEX, έγκειται στο ότι η DEX μειώνει και τα επίπεδα του NF-κB, ενώ οι ουσίες όχι. Ανάλογη μείωση των επιπέδων του NF-κB παρατηρείται και στα κύτταρα που έχουν επεξεργαστεί με τις ουσίες 26 και 27 σε συνδυασμό με τη δεξαμεθαζόνη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η οι ουσίες 26 και 27 δεν ενισχύουν αλλά ούτε και αναιρούν την από δεξαμεθαζόνη επαγόμενη μείωση των επιπέδων της p65 υπομονάδας του NF-κB.

4.4 Η επίδραση του GR στην επαγόμενη από τις ουσίες TFC 26 και TFC 27 καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB

Μέχρι στιγμής, τα πειραματικά δεδομένα υπέδειξαν ότι παρουσία των ουσιών 26 και 27, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου αναστέλλεται μερικώς η μεταγραφική του δραστηριότητα. Παράλληλα, η ανασταλτική δράση των ουσιών στη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB υποδεικνύει ότι πιθανώς η μετακίνηση του GR στον πυρήνα συνοδεύεται από ενεργοποίηση της τρανσ-κατασταλτικής δράσης του υποδοχέα μέσω αλληλεπίδρασής του με τον NF-κB και τελικά καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του παράγοντα. Προκειμένου, λοιπόν, να γίνει συγκριτική μελέτη της ανοσοκατασταλτικής δράσης των ουσιών σε σχέση με το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές DEX και παράλληλα να εξακριβωθεί κατά πόσο τα επίπεδα του GR επηρεάζουν την ανοσοκατασταλτική δράση των ουσιών 26 και 27, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων HeLa με το πλασμίδιο p-NF-κB-Luc, παρουσία ή απουσία υπερεκφρασμένου GR, δεξαμεθαζόνης και/ή TNFα.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4.7 τα μισά δείγματα υπέστησαν διαμόλυνση με πλασμίδιο που φέρει υπερεκφρασμένο τον υποδοχέα GR (pEGFPC2-GR) και τα άλλα μισά με ένα κενό πλασμίδιο (pEGFPC2), ώστε να χρησιμοποιηθούν ως κύτταρα μάρτυρες.



Διάγραμμα 4.7 Επίδραση του GR στην επαγόμενη από τις ουσίες TFC 26 και TFC 27 καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB

Στα δείγματα που δεν υπερεκφράζουν τον υποδοχέα GR (μπλε), γίνεται ορατή μία σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του NF-κB παρουσία TNFα, όπως ήταν αναμενόμενο με βάση τη βιβλιογραφία και τα ήδη υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα. Παρουσία και των δύο παραγόντων (δεξαμεθαζόνης και TNFα) παρατηρείται μείωση της δραστηριότητας του NF-κB, αφού η δεξαμεθαζόνη αποτελεί ισχυρό αναστολέα της επαγόμενης από τον TNFα ενεργοποίησης του NF-κB [(Mengozzi M, 1994); (Sakuma S, 2000)]. Παρουσία TFC 26 και TNFα ή TFC 27 και TNFα παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας του NF-κB σε σχέση με το αντίστοιχο control (δείγμα με TNFα), λόγω της παρουσίας των δύο ανοσοκατασταλτικών ουσιών 26 και 27, όπως αναφέραμε και στην παράγραφο 4.3, ενώ η μείωση αυτή ήταν φανερά πιο εμφανής στο δείγμα που περιείχε την ουσία 27. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB που παρατηρείται παρουσία TFC 26 ή TFC 27, σε συνδυασμό με δεξαμεθαζόνη και TNFα, σε σχέση με το αντίστοιχο control δείγμα (TNF+DEX), γεγονός που αποδίδεται και πάλι στην ανοσοκατασταλτική δράση των ουσιών 26 και 27, η οποία στην περίπτωση της ουσίας 27 πιθανόν να δρα αθροιστικά με αυτήν της DEX, γι' αυτό και η μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB που παρατηρείται σ' αυτή την περίπτωση είναι μεγαλύτερη.

Στα δείγματα που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα GR (κόκκινα), ο αριθμός των διαθέσιμων υποδοχέων GR είναι αυξημένος και όπως γνωρίζουμε ο GR καταστέλλει τον NF-κB μέσω της αλληλεπίδρασής του με αυτόν. Κατ' αυτόν τον τρόπο, εξηγείται η περισσότερο μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB στο control δείγμα που υπερεκφράζεται ο GR, σε σχέση με το αντίστοιχο control δείγμα, όπου δεν υπερεκφράζεται ο GR. Για τον ίδιο λόγο, σε όλα τα δείγματα της συνθήκης όπου υπερεκφράζεται ο GR (κόκκινα) παρατηρείται ισχυρότερη καταστολή της δραστηριότητας του NF-κB, σε σχέση με τα δείγματα της συνθήκης όπου δεν υπερεκφράζεται ο GR (μπλε). Ομοίως, το δείγμα που φέρει TNFα και στο οποίο υπερεκφράζεται ο GR παρουσιάζει μία μικρή αύξηση της δραστηριότητας του NF-κB, σε σχέση με το αντίστοιχο δείγμα της άλλης συνθήκης, ενώ παρουσία DEX και TNFα, παρατηρείται και πάλι μείωση της δραστηριότητας του NF-κB. Παρουσία TFC 26 και TNFα ή TFC 27 και TNFα παρατηρήθηκε και πάλι μείωση της δραστηριότητας του NF-κB σε σχέση με το αντίστοιχο control (δείγμα με TNFα), η οποία ήταν και σε αυτή τη συνθήκη πιο εμφανής στο δείγμα που περιείχε την ουσία 27. Τέλος, παρουσία δεξαμεθαζόνης και TNFα σε συνδυασμό με TFC 26 ή TFC 27,

παρατηρείται αποτελεσματικότερη καταστολή της δραστηριότητας του NF-κB σε σχέση με την επαγόμενη από τον TNFα ενεργοποίηση του NF-κB παρουσία DEX, γεγονός που οφείλεται στην ανοσοκατασταλτική δράση των ουσιών 26 και 27, η οποία και πάλι δρα συνεργικά με την DEX και ενισχύεται παρουσία GR. Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ακόμα, το γεγονός ότι η ανοσοκατασταλτική δράση της ουσίας 27 είναι συγκρίσιμη με αυτήν της DEX.

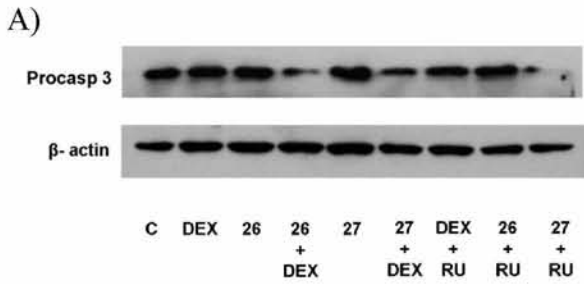
Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, προκύπτει ότι οι ουσίες 26 και 27 δρουν ανασταλτικά πάνω στον NF-κB και πιθανώς εν μέρει και μέσω της GR σηματοδότησης. Παρατηρήσεις που υποστηρίζουν αυτήν την υπόθεση είναι α) η επίδραση των ουσιών στην πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα, β) η αντιφλεγμονώδης και ανοσοκατασταλτική τους δράση, η οποία μάλιστα είναι ίδιας τάξης και συνεργική με αυτήν της δεξαμεθαζόνης, αφού συνδυασμός των ουσιών και της δεξαμεθαζόνης μειώνει αισθητά την δραστηριότητα του NF-κB, καθώς και γ) οι παρατηρήσεις ότι η υπερέκφραση του υποδοχέα GR, ενισχύει αυτήν την δράση.

4.5 Διερεύνηση της επίδρασης των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στη μιτοχondριακά επαγόμενη απόπτωση

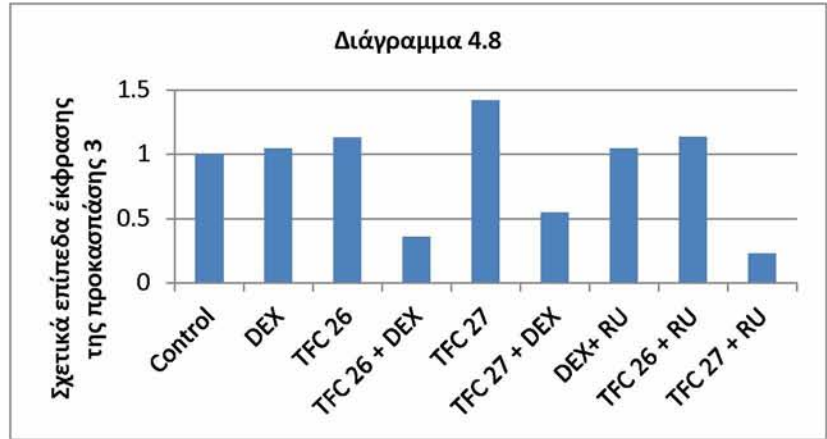
Προκειμένου να διερευνηθεί κατά πόσο οι ουσίες 26 και 27 μπορούν να επάγουν την απόπτωση, πραγματοποιήθηκε Western Blot ανάλυση με αντισώματα έναντι της προκασπάσης 3, της προκασπάσης 9 και του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2.

Η ενεργή κασπάση 3, η οποία προκύπτει μετά από πρωτεόλυση της προκασπάσης 3, αποτελεί μόριο-τελεστή της απόπτωσης από όποιο μονοπάτι κι αν αυτή πυροδοτηθεί, προκαλώντας την εμφάνιση όλων των βιοχημικών και μορφολογικών αλλαγών που παρατηρούνται σε ένα αποπτωτικό κύτταρο και το οδηγούν στο θάνατο [Slee EA, 2001]. Οι εικόνες που προέκυψαν από την ανάλυση Western Blot (Εικόνα 4.4), συνοδεύονται από ποσοτικό προσδιορισμό της έντασης της κάθε ζώνης της προκασπάσης 3, μέσω πυκνομετρίας που προέκυψε από κανονικοποίηση, συγκριτικά πάντα με τα επίπεδα της β-ακτίνης. Έτσι, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4.8, μειωμένα επίπεδα της προκασπάσης 3 παρατηρούνται στα δείγματα που έχουν προεπωαστεί με κάθε μία από τις ουσίες 26 και 27 σε συνδυασμό

με DEX. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως οι ουσίες αυτές μπορεί να επάγουν την απόπτωση και δρουν συνεργατικά με την DEX προς αυτήν την κατεύθυνση.

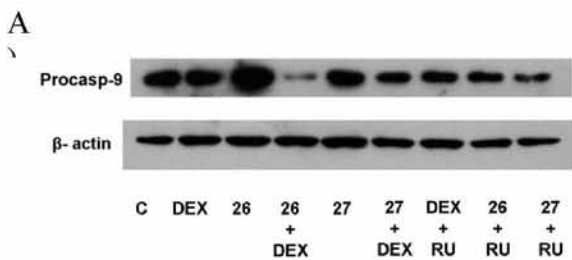


B)

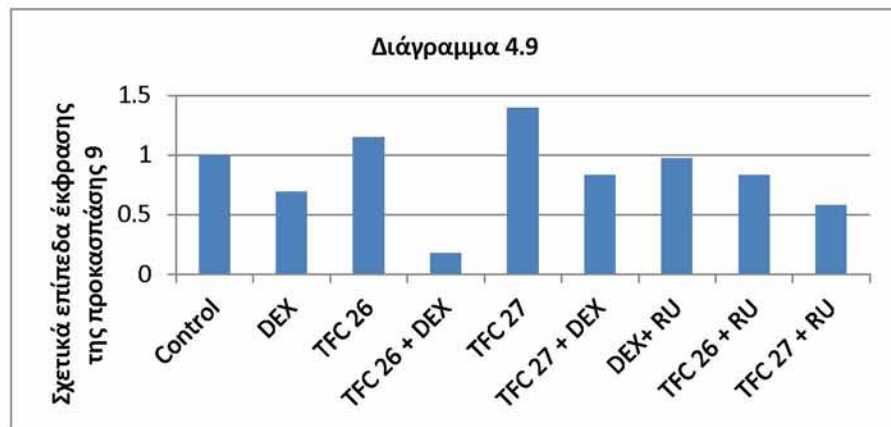


Εικόνα 4.4 Επίδραση των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στα επίπεδα έκφρασης της προκασπάσης 3. A) Western blot ανάλυση με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. B) Γραφική απεικόνιση της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων ως προς τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης.

Με στόχο την περαιτέρω κατανόηση του σηματοδοτικού μονοπατιού μέσω του οποίου οι υπό εξέταση ουσίες προκαλούν απόπτωση, πραγματοποιήθηκε ανάλυση Western Blot για την προκασπάση 9, ώστε να διαπιστωθεί εάν κάποια ουσία δρα μέσω του ενδογενούς ή μιτοχονδριακού μονοπατιού. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης φαίνονται στην εικόνα 4.5 ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός της έντασης της κάθε ζώνης της προκασπάσης 9 μέσω πυκνομετρίας, που προέκυψε από κανονικοποίηση συγκριτικά πάντα με τα επίπεδα της β-ακτίνης, παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4.9. Τα επίπεδα της προκασπάσης 9 ακολουθούν σε γενικές γραμμές το ίδιο μοτίβο με την προκασπάση 3, γεγονός που υποδηλώνει πως οι ουσίες 26 και 27 μπορεί να προκαλούν την επαγόμενη από το μιτοχόνδριο κυτταρική απόπτωση.

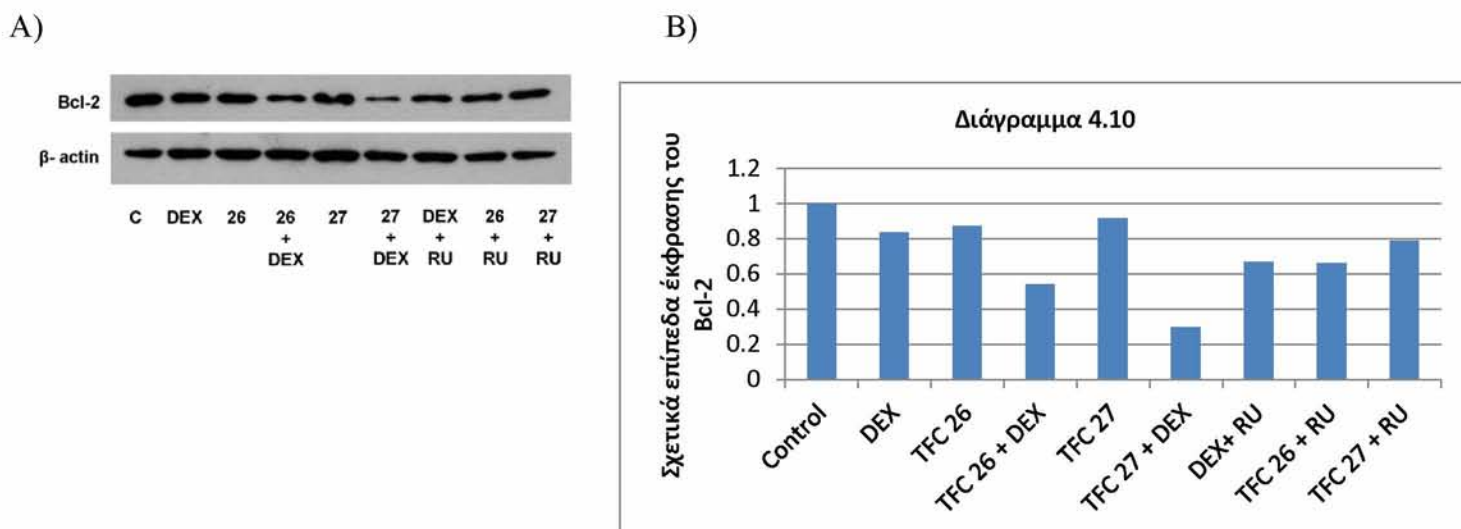


B)



Εικόνα 4.5 Επίδραση των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στα επίπεδα έκφρασης της προκασπάσης 9. A) Western blot ανάλυση με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. B) Γραφική απεικόνιση της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων ως προς τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση Western Blot και για τα επίπεδα έκφρασης του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2. Οι εικόνες που προέκυψαν από την ανάλυση Western Blot (Εικόνα 4.6), συνοδεύονται από ποσοτικό προσδιορισμό της έντασης της κάθε ζώνης του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2, μέσω πυκνομετρίας που προέκυψε από κανονικοποίηση συγκριτικά πάντα με τα επίπεδα της β-ακτίνης. Έτσι, προέκυψε το διάγραμμα 4.10, στο οποίο διαφαίνεται ότι παρουσία των ουσιών 26 και 27, τα επίπεδα του Bcl-2 δεν παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές σε σχέση αυτών στα κύτταρα μάρτυρες. Όμοια με την μείωση των επιπέδων των προκασπασών 3 και 9, και τα επίπεδα της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 είναι μειωμένα σε καταστάσεις συνύπαρξης των ουσιών 26 και 27 με την DEX, γεγονός που υποστηρίζει την άποψη της συνεργατικής δράσης των ουσιών αυτών με την DEX στην επαγωγή της απόπτωσης.



Εικόνα 4.6 Επίδραση των ουσιών TFC 26 και TFC 27 στα επίπεδα έκφρασης του Bcl-2. Α) Western blot ανάλυση με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Β) Γραφική απεικόνιση της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων ως προς τα επίπεδα έκφρασης της ακτίνης.

Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας όσα παρουσιάστηκαν στην ενότητα αυτή, πρέπει πρώτα απ' όλα να υπογραμμίσουμε ότι οι υπό εξέταση ουσίες 26 και 27 επάγουν τη μετατόπιση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) από το διαλυτό κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, χωρίς, ωστόσο, να ενεργοποιούν τη μεταγραφική του δραστηριότητα. Αντίθετα, φαίνεται να προκαλούν μία μερική καταστολή της μεταγραφικής του δραστηριότητας. Επιπρόσθετα, οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν ανοσοκατασταλτική και αντιφλεγμονώδη δράση μέσω καταστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και όχι μέσω μεταβολών των επιπέδων έκφρασής του. Μάλιστα, αυτό είναι πιθανόν να επιτυγχάνεται μέσω του GR, καθώς σε περιπτώσεις υπερέκφρασης του GR, αυτές οι δράσεις ενισχύονται. Ακόμα, ενίσχυση των συγκεκριμένων δράσεων παρατηρείται και παρουσία DEX, γεγονός που υποδεικνύει τη συνεργική αντιφλεγμονώδη δράση των ουσιών 26 και 27 και της DEX.

Επιπλέον, έγινε φανερό ότι οι ουσίες έχουν αντικαρκινική δράση, δεδομένου ότι οι ουσίες που μελετήσαμε επάγουν την απόπτωση σε συνεργική δράση με τη DEX, αφού παρουσία αυτών και DEX τα επίπεδα των προκασπασών 3 και 9 και του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2 μειώνονται ενώ παράλληλα δρουν ανταγωνιστικά με τη δεξαμεθαζόνη και μειώνουν τα από DEX αυξημένα επίπεδα έκφρασης της PEPCK, άρα δρουν ανταγωνιστικά στα φυσικά ή συνθετικά γλυκοκορτικοειδή καταστέλλοντας τη γλυκονεογένεση. Αυτό συμβαίνει σε περιπτώσεις όπου τα επίπεδα GR είναι ή κανονικοποιούνται, ώστε να θεωρηθούν αμετάβλητα. Σε περιπτώσεις, όπου παρατηρείται μείωση των επιπέδων GR παρατηρείται και μείωση των επιπέδων της PEPCK, που όμως πιθανόν να οφείλεται στην μείωση των επιπέδων GR και/ή όχι στην μείωση της μεταγραφικής του δραστηριότητας.

Επομένως, όλα τα παραπάνω καθιστούν το echinocystic acid και το 3-O γλυκοσίδιο του echinocystic acid σημαντικούς υποψήφιους εκλεκτικούς αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και πιθανώς ισχυρά αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινικά φάρμακα. Έτσι, λοιπόν, χρίζουν ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, όμως σε κάθε περίπτωση απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των μορίων αυτών και του ακριβούς μοριακού μηχανισμού δράσης τους, γεγονός που αποτελεί αντικείμενο των συνεχιζόμενων μελετών του εργαστηρίου.

5. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

aa: amino acids || αμινοξέα

amp: ampicillin || αμπικιλίνη

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

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

APS: ammonium persulfate || υπερθειικό αμμώνιο

BSA: bovine serum albumin || αλβουμίνη βόειου ορού

CDK: cell cycle-dependent kinase || κυκλινοεξαρτώμενη κινάση

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

CTD: C-terminal domain || καρβοξυτελικό άκρο

DBD: DNA-binding domain || περιοχή δέσμησης του DNA

DEX: dexamethazone || δεξαμεθαζόνη

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

DTT: dithiothreitol || 1.4-διθειοθρεϊτόλη

DMSO: dimethylsulfoxide || διμεθυλοσουλφοξείδιο

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid || αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ

EtOH: ethanol || αιθανόλη

FBS: fetal bovine serum || εμβρυϊκός βόειος ορός

GCs: glucocorticoids || γλυκοκορτικοειδή

GR: glucocorticoid receptor || υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών

G6Pase: glucose-6 phosphatase || φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης

GPCR: G-protein coupled receptors || υποδοχείς συνδεδεμένοι με G-πρωτεΐνες

GRE: glucocorticoid response element || στοιχείο αποκρινόμενο στα γλυκοκορτικοειδή

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

HRE: hormone response element || στοιχείο αποκρινόμενο σε ορμόνη

HPA: hypothalamic-anterior pituitary-adrenal axis || άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων

HRP: horseradish peroxidase || υπεροξειδάση του χρένου

IgG: immunoglobulin G || ανοσοσφαιρίνη G

kan: kanamycin || καναμυκίνη

kDa: kilo Dalton

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

L.B.: Lysis Buffer || διάλυμα λύσης

LBD: ligand-binding domain || περιοχή δέσμευσης του προσδέματος

L-Glut: L-glutamine || L-γλουταμίνη

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

MBA: N,N'-methylenebisacrylamide || N, N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο

NR: nuclear receptor || πυρηνικός υποδοχέας

NTD: N-terminal domain || αμινοτελικό άκρο

O/N: overnight || για όλη τη νύχτα

ONPG: o-nitrophenyl β-D-galactoside || ο-νιτροφαινυλο β-D-γαλακτοσίδιο

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis || ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

PBS: phosphate-buffered saline || ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

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

PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase || καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride || φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλοφθορίδιο

P.R.: phenol red || ερυθρό της φαινόλης

PVA: polyvinyl alcohol || πολυβινυλική αλκοόλη

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

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

rpm: revolution per minute || στροφές ανά λεπτό

SDS sodium dodecyl sulfate || δωδεκακυλοθειικό νάτριο

SNP(s): single nucleotide polymorphism(s) || πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου

SUMO: small ubiquitin-like modifier || μικρός τροποποιητής με δράση που θυμίζει αυτή της ουβικιτίνης

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

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane || 2-αμινο-2-(υδροξυμεθυλο)-προπανοδιόλη 1,3

W.B.: Western blot || ανοσοαποτύπωμα Western

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams JM, Cory S (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-6.
- Ardail, D., Lerme, F., Puymirat, J., and Morel, G. (1993) Evidence for the presence of alpha and beta-related T3 receptors in rat liver mitochondria. *Eur. J. Cell Biol.* 62, 105–113.
- Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. (2000). Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol.* 18:309-45.
- Attardi G., Schatz G., Biogenesis of mitochondria, *Annu. Rev. Cell Biol.* 4 (1988) 289–333.
- Avenant, C., Ronacher, K., Stubrud, E., Louw, A., and Hapgood, J. P. (2010). Role of ligand-dependent GR phosphorylation and half-life in determination of ligand-specific transcriptional activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 327, 72–88
- Ayroidi E, Cannarile L, Migliorati G, Nocentini G, Delfino DV, Riccardi C.(2012). Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEBJ.*26(12):4805-20.
- Aranda A, Pascual A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 81(3):1269-304.
- Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* 1995;95:2435-41.
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. (1996). Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev.* 17(3):245-61. Beato M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335–344.
- Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998;94:557-72.
- Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgerit F. (2004). Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEBJ.* 18(1):70-80.
- Baschant, U. et al. (2012) The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 8, 645–655
- Beato M, Herrlich P, Schütz G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell.* 83(6):851-857.
- Beck, I. M., Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Yamamoto, K. R., Haegeman, G., and De Bosscher, K. (2009). Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr. Rev.* 30, 830–882.
- Beger C., Gerdes K., Lauten M., Tissing W. J., Fernandez-Munoz I., Schrappe M. and Welte K. (2003). Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. *Br. J. Haematol.* 122, 245–252.
- Belvisi MG, Wicks SL, Battram CH, Bottoms SE, Redford JE, Woodman P, Brown TJ, Webber SE, Foster ML. (2001). Therapeutic benefit of a dissociated glucocorticoid and the relevance of in vitro separation of transrepression from transactivation activity. *J Immunol.* 166(3): 1975-82.
- 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. et al. (2002). Crystal structure of the glucocorticoid receptor

ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell*. 110: 93–105.

Bledsoe, R.K., Stewart, E.L., Pearce, K.H., 2004. Structure and function of the glucocorticoid receptor ligand binding domain. *Vitam. Horm.* 68, 49–91.

Blind RD, Garabedian MJ. Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008 Mar;109(1-2):150-7. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.01.002. Epub 2008 Jan 19. PubMed PMID: 18304804; PubMed Central PMCID: PMC2699583.

Bhatti HN, Khera RA. (2014). Biotransformations of diterpenoids and triterpenoids: a review. *J Asian Nat Prod Res.* 16(1):70-104.

Biddie SC, Conway-Campbell BL, Lightman SL. (2012). Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. *Rheumatology (Oxford).* 51(3):403-12.

Bolt RJ, van Weissenbruch MM, Lafeber HN, Delemarre-van de Waal HA. (2001). Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr Pulmonol.* 32(1):76-91.

Bonawitz N.D., Clayton D.A., Shadel G.S., Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery, *Mol. Cell* 24 (2006) 813–825.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.

Brasier AR. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol.* 2006;6(2):111-30. Review. PubMed PMID: 17303919.

Breckenridge D.G., Germain M., Mathai J.P., Nguyen M., Shore G.C., Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways, *Oncogene* 22 (2003) 8608–8618.

Breslin M.B., Geng C.-D. and Vedeckis V.W. (2001). Multiple Promoters Exist in the Human GR Gene, One of Which Is Activated by Glucocorticoids. *Molecular Endocrinology.* 15:1381-1395.

Busillo JM, Cidlowski JA. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:109-19.

Buttgereit, F., Straub, R. H., Wehling, M. and Burmester, G.-R. (2004). Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: An update on the mechanisms of action. *Arthritis & Rheumatism*, 50: 3408–3417.

Buttgereit, F. (2012) A fresh look at glucocorticoids how to use an old ally more effectively. *Bull. NYU Hosp. Jt. Dis.* 70 (Suppl. 1), 26–29

Cairns, B.R., Levinson, R.S., Yamamoto, K.R., Kornberg, R.D., 1996. Essential role of Swp73p in the function of yeast Swi/Snf complex. *Genes Dev.* 10, 2131–2144.

Callaway Ewen (2013). HeLa publication brews bioethical storm: Genome of controversial cell line no longer public, but another sequence is in the works. *Nature* 12689.

Callaway Ewen (2013b). Most popular human cell in science gets sequenced: The HeLa cell genome is riddled with errors, raising questions about its continued use. *Nature* 12609.

Cammarata, P. R., Chu, S., Moor, A., Wang, Z., Yang, S. H., and Simpkins, J. W. (2004) Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta subtypes in cultured human lens epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 78, 861–871.

Canalis, E., Delany, A.M., 2002. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 966, 73–81.

- Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. (2010). Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *Int J Cancer*. 127(1):1-8.
- Carlstedt-Duke J, Strömstedt PE, Wrangé O, Bergman T, Gustafsson JA, Jörnvall H. Domain structure of the glucocorticoid receptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Jul;84(13):4437-40. PubMed PMID: 3474612; PubMed Central PMCID: PMC305104.
- Carson SD, Pirruccello SJ. (2013). HeLa cell heterogeneity and coxsackievirus B3 cytopathic effect: implications for inter-laboratory reproducibility of results. *J Med Virol*. 85(4):677-83.
- Casas, F., Daury, L., Grandemange, S., Busson, M., Seyer, P., Hatier, R., Carazo, A., Cabello, G., and Wrutniak-Cabello, C. (2003) Endocrine regulation of mitochondrial activity: involvement of truncated RXRalpha and c-Erb Aalpha proteins. *FASEB J*. 17, 426–436.
- Chambon P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*. 10(9):940-54.
- Chen J.Q., Russo P.A, Cooke C., Russo I.H., Russo J., 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*. 2007 (in press).
- Chen J.Q., Brown T., Yager J.D., Mechanism of hormone carcinogenesis: revolution of views and role of mitochondria, (In, *Innovative Endocrinology of Cancer*, LevMBerstein and Ricard J Santen (edited) *Eurekah Bioscience Database*) (In press).
- Chenran Zhang, Qiang Qiang, Ying Jiang, Liuhua Hu, Xuehua Ding, Yicheng Lu, Guohan Hu (2015). Effects of hypoxia inducible factor-1 α on apoptotic inhibition and glucocorticoid receptor downregulation by dexamethasone in AtT-20 cells. *BMC Endocrine Disorders*. 15:24
- Chin J Cancer; 2011; Vol. 30 (Issue 8) 526-539
- Cidlowski JA., Kadmiel M. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*,34(9):518-30.
- Clarke P, Tyler KL. Reovirus-induced apoptosis: A minireview. *Apoptosis*. 2003 Mar;8(2):141-50. Review. PubMed PMID: 12766474.
- Cohen GM. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*.326 (Pt 1):1-16.
- Cole, T.J.; Blendy, J.A.; Monaghan, A.P.; Kriegstein, K.; Schmid, W.; Aguzzi, A.; Fantuzzi, G.; Hummler, E.; Unsicker, K.; Schutz, G. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev*. 1995, 9, 1608-1621.
- Cole MA, Kim PJ, Kalman BA, Spencer RL. (2000) Dexamethasone suppression of corticosteroid secretion: evaluation of the site of action by receptor measures and functional studies. *Elsevier Science Ltd*.25(2):151-67.
- Collingwood TN, Urnov FD, Wolffe AP. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol*23(3):255-75.
- Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*. 33(2):95-103.
- Daniel P.T., Schulze-Osthoff K., Belka C., Guner D., Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins, *Essays Biochem*. 39 (2003) 73–88.

Davies, L., Karthikeyan, N., Lynch, J. T., Sial, E. A., Gkourtsa, A., Demonacos, C., and Krstic-Demonacos, M. (2008). Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol. Endocrinol.* 22, 1331–1344.

Davis BJ. (1964). Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sci.* 121:404-27.

Dawson V.L., Dawson T.M., Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk, *J. Bioenerg. Biomembranes* 36 (2004) 287–294.

De Bosscher K, Schmitz ML, Vanden Berghe W, Plaisance S, Fiers W, Haegeman G. (1997). Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor- κ B-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(25):13504-9.

De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: Molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev.* 24:488–522.

De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., Joels, M., 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev.* 19, 269–301.

de Lange P., Segeren C. M., Koper J. W., Wiemer E., Sonneveld P., Brinkmann A. O., White A., Brogan I. J., de Jong F. H. and Lamberts S. W. (2001). Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. *Cancer Res.* 61, 3937–3941.

Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. (2005). Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 1(2):66-74

Deng Y., Ren X., Yang L., Lin Y., Wu X., A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis, *Cell* 115 (2003) 61–70.

Derijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J, et al. A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001;28:2383-8.

Deroo, B. J., Rentsch, C., Sampath, S., Young, J., DeFranco, D. B. and Archer, T. K. (2002). Proteasomal inhibition enhances glucocorticoid receptor transactivation and alters its subnuclear trafficking. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4113–4123.

Dong X.Z., Gao Z.J., Xu S.X., Three new triterpenoid saponins from *Ixeris sonchifolia* and their cytotoxic activity, *Planta Med.* 69 (2003) 1036–1040.

Druker J, Liberman AC, Antunica-Noguerol M, Gerez J, Paez-Pereda M, Rein T, et al. RSUME enhances glucocorticoid receptor SUMOylation and transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 2013;33:2116-27.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102(1):33-42.

Duckles S.P., Krause D.N., Stirone C., Procaccio V., Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection? *Mol. Interv.* 6 (2006) 26–35.

Edwards CRW, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, DeKloet ER and Monder C. (1988). Localisation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*, ii, 986–989.

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35(4):495-516.

- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 391(6662):43-50.
- Engblom D, Kornfeld JW, Schwake L, Tronche F, Reimann A, Beug H, Hennighausen L, Moriggl R, Schütz G. Direct glucocorticoid receptor-Stat5 interaction in hepatocytes controls body size and maturation-related gene expression. *Genes Dev*. 2007 May 15;21(10):1157-62. PubMed PMID: 17504935; PubMed Central PMCID: PMC1865487.
- Enriquez J.A., Fernandez-Silva P., Montoya J., Autonomous regulation in mammalian mitochondrial DNA transcription, *Biol. Chem.* 380 (1999) 737–747.
- Evans R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240 (4854): 889–95.
- Evans-Storms, R. B., and Cidlowski, J. A. (1995) Regulation of apoptosis by steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53, 1–8.
- Evans SJ, Moore FL, Murray TF. (1998). Solubilization and pharmacological characterization of a glucocorticoid membrane receptor from an amphibian brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67:1–8.
- Fletcher TM, Xiao N, Mautino G, Baumann CT, Wolford R, Warren BS, Hager GL. (2002). ATP-dependent mobilization of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. *Mol Cell Biol*.22(10):3255-63.
- Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. (2000). Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol.* 182(1):41-9.
- Frego Lee and Davidson Walter. (2006). Conformational changes of the glucocorticoid receptor ligand binding domain induced by ligand and cofactor binding, and the location of cofactor binding sites determined by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Protein Science*. Volume 15, Issue 4: 722-730
- Gallihier-Beckley AJ, Williams JG, Collins JB, Cidlowski JA. Glycogen synthase kinase 3beta-mediated serine phosphorylation of the human glucocorticoid receptor redirects gene expression profiles. *Mol Cell Biol* 2008;28:7309-22.
- Gallihier-Beckley, A. J., and Cidlowski, J. A. (2009). Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life* 61,979–986.
- Gametchu B, Chen F, Sackey F, Powell C, Watson CS. (1999). Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids*. 64: 107– 119.
- Garesse R., Vallejo C.G., Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes, *Gene* 263 (2001) 1–16.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 13(9):1423-33.
- Geelhoed JJ, van Duijn C, van Osch-Gevers L, Steegers EA, Hofman A, Helbing WA, et al. Glucocorticoid receptor-9beta polymorphism is associated with systolic blood pressure and heart growth during early childhood. The Generation R Study. *Early Hum Dev* 2011;87:97-102.
- Gehring U, Segnitz B, Foellmer B, Francke U. (1985). Assignment of the human gene for the glucocorticoid receptor to chromosome 5. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3751–3755.
- Gene R.M., Cartana C., Adzet T., Marin E., Parella T., Canigual S., Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents, *Planta Med.* 62 (1996) 232–235.

- Giguère V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*. 1986 Aug 29;46(5):645-52. PubMed PMID: 3742595.
- Giguère V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev*. 20(5):689-725.
- Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6680-4. Review. PubMed PMID: 17072321.
- Goecke I. A., Alvarez C., Henríquez J., Salas K., Molina M. L., Ferreira A. and Gatica H. (2007). Methotrexate regulates the expression of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in normal human peripheral mononuclear cells and human lymphocyte cell lines in vitro. *Mol. Immunol.* 44, 2115–2123.
- Goffart S., Wiesner R.J., Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis, *Exp. Physiol.* 88 (2003) 33–40.
- Goldenthal M.J., Marin-Garcia J., Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle, *Mol. Cell. Biochem.* 262 (2004) 1–16.
- Göttlicher M, Heck S, Herrlich P. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med (Berl)*. 1998 Jun;76(7):480-9. Review. PubMed PMID: 9660166.
- Grad I, Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol* 2007;275:2-12.
- Gross KL, Oakley RH, Scoltock AB, Jewell CM, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor a isoform-selective regulation of antiapoptotic genes in osteosarcoma cells: a new mechanism for glucocorticoid resistance. *Mol Endocrinol* 2011;25: 1087-99.
- Grossman, A., Oppenheim, J., Grondin, G., St. Jean, P., and Beaudoin, A. R. (1989) Immunocytochemical localization of the [3H]estradiolbinding protein in rat pancreatic acinar cells. *Endocrinology* 124, 2857–2866.
- Grünfeld JP and Eloy L. (1987). Role of glucocorticoids in the regulation of blood pressure [Article in French]. *Presse Med.* 16 (28): 1365-7.
- Grünfeld JP. (1990). Glucocorticoids in blood pressure regulation. *Horm Res.* 34 (3-4): 111-3.
- Gruver-Yates AL, Cidlowski JA. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. *Cells*. 2013 Mar 26;2(2):202-23. doi: 10.3390/cells2020202. PubMed PMID: 24709697; PubMed Central PMCID: PMC3972684.
- Gulbins E., Dreschers S., Bock J., Role of mitochondria in apoptosis, *Exp. Physiol.* 88 (2003) 85–90.
- Gunning P, Weinberger R, Jeffrey P. (1997). Actin and tropomyosin isoforms in morphogenesis. *Anat Embryol (Berl)*. 195(4):311-5.
- Gupta P.B.B. and Lalchhandama K. (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid action. *Current Science*, Vol. 83, No. 9, 1103-1111.
- Hall RK, Wang XL, George L, Koch SR, Granner DK. (2007). Insulin represses phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by causing the rapid disruption of an active transcription complex: a potential epigenetic effect. *Mol Endocrinol*.21(2):550-63.
- Han J, Flemington C, Houghton AB, Gu Z, Zambetti GP, Lutz RJ, Zhu L, Chittenden T. (2001). Expression of *bbc3*, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*.98(20):11318-23.
- Hanson RW, Reshef L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem.* 66:581–611.

Haridas V, Xu ZX, Kitchen D, Jiang A, Michels P, Gutterman JU. (2011). The Anticancer Plant Triterpenoid, Avicin D, Regulates Glucocorticoid Receptor Signaling: Implications for Cellular Metabolism. *PLoS ONE*6(11):e28037.

Hauk PJ, Hamid QA, Chrousos GP, Leung DY. Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:782-7.

Heck S, Bender K, Kullmann M, Göttlicher M, Herrlich P, Cato AC. I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1997 Aug 1;16(15):4698-707. PubMed PMID: 9303314; PubMed Central PMCID: PMC1170096.

Hengge, U.R., Ruzicka, T., Schwartz, R.A., Cork, M.J., 2006. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J. Am. Acad. Dermatol.* 54, 1–15.

Herr I., Debatin K.M., Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy, *Blood* 98 (2001) 2603–2614.

Herr I., Gassler N., Friess H., Buchler M.W., Regulation of differential pro- and anti-apoptotic signaling by glucocorticoids, *Apoptosis* 12 (2007) 271–291.

Hittelman AB, Burakov D, Iñiguez-Lluhí JA, Freedman LP, Garabedian MJ. Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J.* 1999 Oct 1;18(19):5380-8. PubMed PMID: 10508170; PubMed Central PMCID: PMC1171607.

Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. (1985). Primary structure and expression fo a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318:635–641.

Holmstrom, S., Van Antwerp, M. E., and Iñiguez-Lluhí, J. A. (2003). Direct and distinguishable inhibitory roles for SUMO isoforms in the control of transcriptional synergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15758–15763.

Holmstrom, S. R., Chupreta, S., So, A. Y., and Iniguez-Lluhi, J. A. (2008). SUMO-mediated inhibition of glucocorticoid receptor synergistic activity depends on stable assembly at the promoter but not on DAXX. *Mol. Endocrinol.* 22, 2061–2075.

Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG. (2002). Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab.* 13(2):55-60.

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*81(4):495-504.

Hudson WH, Youn C, Ortlund EA. (2013). The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nat Struct Mol Biol.*20(1):53-8.

Hyer ML, Shi R, Krajewska M, Meyer C, Lebedeva IV, Fisher PB, Reed JC. Apoptotic activity and mechanism of 2-cyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-oic-acid and related synthetic triterpenoids in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68:2927–2933.

Hwang SL, Kwon O, Lee SJ, Roh SS, Kim YD, Choi JH. (2012). B-cell translocation gene-2 increases hepatic gluconeogenesis via induction of CREB. *Biochem Biophys Res Commun.*427(4):801-5.

Igney FH, Krammer PH. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*2(4):277-88.

Iñiguez-Lluhí, J. A., and Pearce, D. (2000). A common motif within the negative regulatory regions of multiple factors inhibits their transcriptional synergy. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6040–6050.

Ito, K., Yamamura, S., Essilfie-Quaye, S., Cosio, B., Ito, M., Barnes, P. J., and Adcock, I. M. (2006). Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF- κ B suppression. *J. Exp. Med.* 203, 7–13.

Itoh M, Adachi M, Yasui H, Takekawa M, Tanaka H, Imai K. Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol Endocrinol* 2002;16:2382-92.

Iwasaki Y, Aoki Y, Katahira M, Oiso Y, Saito H. (1997). Non-genomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion: possible involvement of GTP-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 235:295–299.

Jenkins BD, Pullen CB, Darimont BD. Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:122-6.

Jiang CL, Liu L, Tasker JG. (2014). Why do we need nongenomic glucocorticoid mechanisms? *Front Neuroendocrinol.*35(1):72-5.

John M, Clark JR & Robert L. Switzer. (1991). Ηλεκτροφόρηση σελ. 45, στο Πειραματική Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell.* 1990 Sep 21;62(6):1189-204. PubMed PMID: 2169351.

Jönsson, D., Nilsson, J., Odenlund, M., Bratthall, G., Broman, J., Ekblad, E., Lydrup, M. L., and Nilsson, B. O. (2007) Demonstration of mitochondrial oestrogen receptor beta and oestrogen-induced attenuation of cytochrome c oxidase subunit I expression in human periodontal ligament cells. *Arch. Oral Biol.* 52, 669–676.

Kassel O, Herrlich P. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Sep 15;275(1-2):13-29. Epub 2007 Jul 10. Review. PubMed PMID: 17689856.

Kastner P, Mark M, Chambon P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell.* 15;83(6):859-69.

Kauppi B, Jakob C, Färnegårdh M, Yang J, Ahola H, Alarcon M, Calles K, Engström O, Harlan J, Muchmore S, Ramqvist AK, Thorell S, Ohman L, Greer J, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J, Carlquist M. (2003). The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. *J Biol Chem.* 278(25):22748-22754.

Kelly A., Bowen H., Jee Y. K., Mahfiche N., Soh C., Lee T., Hawrylowicz C. and Lavender P. (2008). The glucocorticoid receptor beta isoform can mediate transcriptional repression by recruiting histone deacetylases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 203–208.

Kim S. H., Kim D. H., Lavender P., Seo J. H., Kim Y. S., Park J. S., Kwak S. J. and Jee Y. K. (2009). Repression of TNF-alpha-induced IL-8 expression by the glucocorticoid receptor-beta involves inhibition of histone H4 acetylation. *Exp. Mol. Med.* 41, 297–306.

Kino T., Su Y. A. and Chrousos G. P. (2009). Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3435–3448.

Kino Tiulpakov A, Ichijo T, Chheng L, Kozasa T, Chrousos GP. (2005). G protein beta interacts with the glucocorticoid receptor and suppresses its transcriptional activity in the nucleus. *J Cell Biol.*169(6):885-96.

- Kleiman A, Tuckermann JP. Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: lessons from conditional knockout mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Sep 15;275(1-2):98-108. Epub 2007 May 18. Review. PubMed PMID: 17587493.
- Konopleva M, Tsao T, Estrov Z, Lee RM, Wang RY, Jackson CE, et al. The synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxoleana-1,9-dien-28-oic acid induces caspase dependent and -independent apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* 2004; 64:7927–7935.
- Koufali, M. M., Moutsatsou, P., Sekeris, C. E., and Breen K. C. (2003) The dynamic localization of the glucocorticoid receptor in rat C6 glioma cell mitochondria. *Mol. Cell. Endocrinol.* 209, 51–60.
- Krett NL, Pillay S, Moalli PA, Greipp PR, Rosen ST. A variant glucocorticoid receptor messenger RNA is expressed in multiple myeloma patients. *Cancer Res* 1995;55:2727-9.
- Kroemer G., Mitochondria in cancer, *Oncogene* 25 (2006) 4630–4632.
- Kumar R. and Thompson E. B. (2005). Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94, 383–394.
- Kumar, R., and Calhoun, W. J. (2008). Differential regulation of the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through site-specific phosphorylation. *Biologics* 2, 845–854.
- Kwon Y.W., Ueda S., Ueno M., Yodoi J., Masutani H., Mechanism of p53-dependent apoptosis induced by 3-methylcholanthrene: involvement of p53 phosphorylation and p38 MAPK, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 1837–1844.
- La Fleur, S.E. (2006). The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats. *Physiology and Behavior* Vol. 89, No. 1, pp.110-114.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.
- Landry JJ, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, Jauch A, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel JO, Huber W, Steinmetz LM. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda)*. 2013 Aug 7;3(8):1213-24. doi: 10.1534/g3.113.005777. PubMed PMID: 23550136; PubMed Central PMCID: PMC3737162.
- Le Drean, Y., Mincheneau, N., Le Goff, P., and Michel, D. (2002). Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology* 143, 3482–3489.
- Lee SR, Kim HK, Youm JB, Dizon LA, Song IS, Jeong SH, Seo DY, Ko KS, Rhee BD, Kim N, Han J. (2012). Non-genomic effect of glucocorticoids on cardiovascular system. *Pflugers Arch.* 464(6):549-59.
- Lefstin JA, Yamamoto KR. (1998). Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature* 392(6679):885-8.
- Lei K., Nimmual A., Zong W.X., Kennedy N.J., Flavell R.A., Thompson C.B., Bar-Sagi D., Davis R.J., The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 4929–4942.
- Leung DY, Bloom JW.(2003). Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol.* 111(1):3-22.
- Lewis-Tuffin L. J. and Cidlowski J. A. (2006). The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1069, 1–9.
- Lewis-Tuffin L. J., Jewell C. M., Bienstock R. J., Collins J. B. and Cidlowski J. A. (2007). Human Glucocorticoid Receptor β Binds RU-486 and Is Transcriptionally Active. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2266–2282.

- Li H., Kolluri S.K., Gu J., Dawson M.I., Cao X., Hobbs P.D., Lin B., Chen G., Lu J., Lin F., Xie Z., Fontana J.A., Reed J.C., Zhang X., Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3, *Science* 289 (2000) 1159–1164.
- Lin, D. Y., Huang, Y. S., Jeng, J. C., Kuo, H. Y., Chang, C. C., Chao, T. T., Ho, C. C., Chen, Y. C., Lin, T. P., Fang, H. I., Hung, C. C., Suen, C. S., Hwang, M. J., Chang, K. S., Maul, G. G., and Shih, H. M. (2006). Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors. *Mol. Cell* 24, 341–354.
- Lin M.T., Beal M.F., Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Nature* 443 (2006) 787–795.
- Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 1995; 49:57–68.
- Lonard DM, O'Malley BW. Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem Sci* 2005;30:126-32.
- Lonard, D.M. and O'Malley, B.W. (2007) Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol. Cell* 27, 691–700
- Long, C. N. H., B. Katzin, and E. G. Fry. (1940). The adrenal cortex and carbohydrate metabolism. *Endocrinol.* 26: 309-344.
- Lu, N.Z.; Cidlowski, J.A. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann. NY Acad. Sci.* **2004**, 1024, 102-123.
- 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.
- Lu N. Z., Collins J. B., Grissom S. F. and Cidlowski J. A. (2007). Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7143–7160.
- Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*. 1991 Aug 8;352(6335):497-505. PubMed PMID: 1865905.
- Macfarlane DP, Forbes S, Walker BR. (2008). Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol.* 197(2):189-204.
- Madesh M., Antonsson B., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Hajnoczky G., Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 5651–5659.
- Maier Christina, Rünzler Dominik, Schindelar Julia, Grabner Gottfried, Waldhäus Werner, Köhler Gottfried and Luger Anton. (2005). G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane. *Journal of Cell Science* 118, 3353-3361.
- Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D. (1997). MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*385(6616):540-4.
- Malinowska M, Sikora E, Ogonowski J. (2013). Production of triterpenoids with cell and tissue cultures. *Acta Biochim Pol.*60(4):731-5.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*83(6):835-9.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* 83(6):841-50.

- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83 (6): 835–9.
- Mangos JG, Whitworth AJ, Williamson MP, Kelly JJ. (2003). Glucocorticoids and the kidney. *Nephrology*, 8: 267-273.
- Manoli I., Alesci S., Blackman M.R., Su Y.A., Rennert O.M., Chrousos G.P., Mitochondria as key components of the stress response, *Trends Endocrinol. Metab.* 18 (2007) 190–198.
- Marino M, Ascenzi P. (2006). Steroid hormone rapid signaling: the pivotal role of S-palmitoylation. *IUBMB Life*. 58: 716– 719.
- McKay I.L and Cidlowski A.J. (2003). "Chapter 62: Corticosteroids" in Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. *Hamilton (ON): BC Decker*; 2003. Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12354/>
- McNally JG, Müller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL. (2000). The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* 287(5456):1262-5.
- Mengozzi M, Fantuzzi G, Faggioni R, Marchant A, Goldman M, Orencole S, Clark BD, Sironi M, Benigni F, Ghezzi P. (1994). Chlorpromazine specifically inhibits peripheral and brain TNF production, and up-regulates IL-10 production, in mice. *Immunology*. 82(2):207-10.
- Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L and Yamamoto KR. (2009). DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity. *Science* 324, 407–410.
- Mersmann HJ, Segal HL. Glucocorticoid control of the liver glycogen synthetase-activating system. *J Biol Chem*. 1969 Apr 10;244(7):1701-4. PubMed PMID: 5787788.
- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., Gannon, F., 2003. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115, 751–763.
- Miller J. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*, p. 352-355. *Cold Spring Harbor Laboratory*, NY.
- Mills, C.M., Marks, R., 1993. Side effects of topical glucocorticoids. *Curr. Probl. Dermatol.* 21, 122–131.
- Milner, T. A., Ayoola, K., Drake, C. T., Herrick, S. P., Tabori, N. E., McEwen, B. S., Warriar, S., and Alves, S. E. (2005) Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* 491, 81–95.
- Miner N. Jeffrey. (2002). Designer glucocorticoids. *Biochemical Pharmacology*. 64: 355-361.
- Miner, J.N., Hong, M.H., Negro-Vilar, A., 2005. New and improved glucocorticoid receptor ligands. *Expert Opin. Invest. Drugs* 14, 1527–1545.
- Moalli P. A., Pillay S., Krett N. L. and Rosen S. T. (1993). Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 53, 3877–3879.
- Moats, R. K., II, and Ramirez, V. D. (2000) Electron microscopic visualization of membrane-mediated uptake and translocation of estrogen- BSA: colloidal gold by HepG2 cells. *J. Endocrinol.* 166, 631–647.
- Molnár J, Gyémánt N, Tanaka M, Hohmann J, Bergmann-Leitner E, Molnár P, Deli J, Didiziapetris R, Ferreira MJ. (2006). Inhibition of multidrug resistance of cancer cells by natural diterpenes, triterpenes and carotenoids. *Curr Pharm Des.* 12(3):287-311.
- Monje, P., and Boland, R. (2001) Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J. Cell. Biochem.* 82, 467–479.

- Morand EF, Leech M. (1999). Glucocorticoid regulation of inflammation: the plot thickens. *Inflamm Res.* 48(11):557-60.
- Morimoto RI (2002). Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones. *Cell*110(3):281-4.
- Moutsatsou, P., Psarra, A.-M. G., Tsiapara, A., Paraskevakou, H., Davaris, P., and Sekeris, C. E. (2001) Localization of the glucocorticoid receptor in rat brain mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 386, 69–78.
- Nagaich AK, Walker DA, Wolford R, Hager GL. (2004). Rapid periodic binding and displacement of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. *Mol Cell.* 14(2):163-74.
- Navarro P., Giner R.M., Recio M.C., Manez S., Cerda- Nicolas M., Rios J.L., In vivo anti-inflammatory activity of saponins from *Bupleurum rotundifolium*, *Life Sci.* 68 (2001) 1199–1206.
- Necela B. M. and Cidlowski J. A. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 239–246.
- Nehmé A., Lobenhofer K.E., Stamer D.W. and Edelman L.J. (2009). Glucocorticoids with different chemical structures but similar glucocorticoid receptor potency regulate subsets of common and unique genes in human trabecular meshwork cells. *BMC Med Genomics.* 2: 58.
- Newton R. and Holden N. S. (2007). Separating Transrepression and Transactivation: A Distressing Divorce for the Glucocorticoid Receptor? *Mol. Pharmacol.* 72, 799–809.
- Nissen RM, Yamamoto KR. The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 2000 Sep 15;14(18):2314-29. PubMed PMID: 10995388; PubMed Central PMCID: PMC316928.
- Nomura M, Morohashi K, Kirita S, Nonaka Y, Okamoto M, Nawata H, Omura T. (1993). Three forms of rat CYP11B genes: 11 beta-hydroxylase gene, aldosterone synthase gene, and a novel gene. *J Biochem.* 113(2):144-52.
- Noteboom, W. D., and Gorski, J. (1965) Stereospecific binding of estrogens in the rat uterus. *Arch. Biochem. Biophys.* 111, 559–568.
- Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem* 1996;271:9550-9.
- Oakley H. Robert and Cidlowski A. John. (2011). Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific Actions of Glucocorticoids. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 3177-3184.
- Oakley RH, Cidlowski JA. (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem.* 286(5):3177-84.
- Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2013 Nov;132(5):1033-44. doi: 10.1016/j.jaci.2013.09.007. Epub 2013 Sep 29. Review. PubMed PMID: 24084075; PubMed Central PMCID: PMC4084612.
- O'Brien SJ (2001). Cell culture forensics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(14):7656-8.
- Ogawa, S., Lozach, J., Benner, C., Pascual, G., Tangirala, R.K., Westin, S., Hoffmann, A., Subramaniam, S., David, M., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., 2005. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 122, 707–721.
- Olefsky JM. (2001). Nuclear receptor minireview series. *J. Biol. Chem.* 276 (40): 36863–4.

- Orchinik M, Murray TF, Moore FL. (1991). A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science*. 252: 1848– 1851.
- Ornstein L. (1964). Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci*. 121:321-49.
- Ortsäter Henrik, Sjöholm Åke and Rafacho Alex. (2012). Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess. *InTeck* .
- Osbourn A, Goss RJ, Field RA. The saponins: polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Nat Prod Rep*. 2011 Jul;28(7):1261-8. doi: 10.1039/c1np00015b. Epub 2011 May 16. Review. PubMed PMID: 21584304.
- Otte C, Wust S, Zhao S, Pawlikowska L, Kwok PY, Whooley MA. Glucocorticoid receptor gene, low-grade inflammation, and heart failure: the Heart and Soul study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2885-91.
- Park J., Kim I., Oh Y.J., Lee K., Han P.L., Choi E.J., Activation of c-Jun N-terminal kinase antagonizes an anti-apoptotic action of Bcl-2, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16725–16728.
- Pedram, A., Razandi, M., Wallace, D. C., and Levin, E. R. (2006) Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Mol. Biol. Cell* 17, 2125–2137.
- Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC, Levin ER. (2007). A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 282: 22278– 22288.
- Peeke, P.M., Chrousos, G.P., 1995. Hypercortisolism and obesity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 771, 665–676.
- Perissi V, Jepsen K, Glass CK, Rosenfeld MG. (2010). Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat Rev Genet*. 11(2):109-23.
- Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jan;8(1):49-62. Review. PubMed PMID: 17183360.
- Petronelli A, Pannitteri G, Testa U. (2009). Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anticancer Drugs*. 20(10):880-92.
- Phillips DR, Rasbery JM, Bartel B, Matsuda SP. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr Opin Plant Biol* 2006; 9:305–314.
- Pinkoski M.J., Waterhouse N.J., Green D.R., Mitochondria, apoptosis and autoimmunity, *Curr. Dir. Autoimmun.* 9 (2006) 55–73.
- Pirotte B, Levivier M, Goldman S, Brucher JM, Brotchi J, Hildebrand J. Glucocorticoid-induced long-term remission in primary cerebral lymphoma: case report and review of the literature. *J Neurooncol*. 1997 Mar;32(1):63-9. PubMed PMID: 9049864.
- Ploner C, Rainer J, Niederegger H, Eduardoff M, Villunger A, Geley S, Kofler R. (2008). The BCL2 rheostat in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 22(2):370-7.
- Pratt, W.B., Gehring, U., Toft, D.O., 1996. Molecular chaperoning of steroid hormone receptors. *Stress-Inducible Cell. Responses*, 79–95.
- Pratt W. B. and Toft D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18, 306–360.
- Psarra A.-M. G., Bochaton-Piallat L.M., Gabbiani G., Sekeris E.C., Tsacopoulos M. (2003). Mitochondrial localization of glucocorticoid receptor in glial (Mueller) cells in the salamander retina. *Glia* 41(1): 38–49.
- Psarra A.-M G., Solakidi S., Trougakos P.I., Margaritis H.L., Spyrou G., Sekeris E.C. (2005). Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 2544–2558.

Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE. (2006a). The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Mol Cell Endocrinol.* 246(1-2):21-33.

Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE. (2006b). The mitochondrion as a primary site of action of regulatory agents involved in neuroimmunomodulation. *Ann N Y Acad Sci.* 1088:12-22.

Psarra AM, Sekeris CE. (2008a). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta* 1783(1):1-11.

Psarra AM, Sekeris CE. (2008b). Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life.* 60(4):210-23.

Psarra, A.-M. G. and Sekeris, C. E. (2009). Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1787, 431-436.

Psarra AM, Hermann S, Panayotou G, Spyrou G. (2009). Interaction of mitochondrial thioredoxin with glucocorticoid receptor and NF- κ B modulates glucocorticoid receptor and NF- κ B signalling in HEK-293 cells. *Biochem. J.* 422(3):521-31.

Psarra AM, Sekeris CE. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Elsevier B.V.* 1813(10):1814-21.

QIAGEN® Plasmid Purification Handbook. (2012). Protocol: Plasmid or Cosmid DNA Purification Using QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kits. pp 17-21. Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://tinyurl.com/o4y8kvx>

Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques.* 2009 Apr;46(4):277-84. doi: 10.2144/000113089. PubMed PMID: 19450234; PubMed Central PMCID: PMC2696096.

Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. (2005). Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 4(3):138-44.

Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Ligand-induced repression of the glucocorticoid receptor gene is mediated by an NCoR1 repression complex formed by long-range chromatin interactions with intragenic glucocorticoid response elements. *Mol Cell Biol.* 2013 May;33(9):1711-22. doi: 10.1128/MCB.01151-12. Epub 2013 Feb 19. PubMed PMID: 23428870; PubMed Central PMCID: PMC3624172.

Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jan 18;91(2):752-6. PubMed PMID: 8290595; PubMed Central PMCID: PMC43027.

Ray D. W., Davis J. R., White A. and Clark A. J. (1996). Glucocorticoid receptor structure and function in glucocorticoid-resistant small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res.* 56, 3276–3280.

Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schütz G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93(4):531-41.

Reichardt M.H., Tuckermann P.J., Bauer A., Schütz G. (2000). Molecular genetic dissection of glucocorticoid receptor function in vivo. *Zeitschrift für Rheumatologie.* Volume 59, Issue 2 Supplement, pp S1-S5.

Reid R. Ian. (1998). Glucocorticoid Effects on Bone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 83 no. 6: 1860-1862.

Reily, M.M., Pantoja, C., Hu, X., Chinenov, Y., Rogatsky, I., 2006. The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. *EMBO J.* 25, 108–117.

- Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*. 1985 Dec;117(6):2505-11. PubMed PMID: 2998738.
- Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005;353:1711-23.
- Rivers C., Levy A., Hancock J., Lightman S. and Norman M. (1999). Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 4283–4286.
- Robertson J.D., Orrenius S., Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals, *Crit. Rev. Toxicol.* 30 (2000) 609–627.
- Rogatsky I. and Ivashkiv L. B. (2006). Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue Antigens* 68, 1–12.
- Ronacher K, Hadley K, Avenant C, Stubrud E, Simons SS Jr, Louw A, Hapgood JP. (2009). Ligand-selective transactivation and transrepression via the glucocorticoid receptor: role of cofactor interaction. *Mol Cell Endocrinol.* 299(2):219-31.
- Rosenfeld MG, Glass CK. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 2001;276:36865-8.
- Rusconi S, Yamamoto KR. Functional dissection of the hormone and DNA binding activities of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1987 May;6(5):1309-15. PubMed PMID: 2440676; PubMed Central PMCID: PMC553934.
- Rutz HP. Effects of corticosteroid use on treatment of solid tumours. *Lancet.* 2002 Dec 14;360(9349):1969-70. PubMed PMID: 12493280.
- Rutz HP, Herr I. Interference of glucocorticoids with apoptosis signaling and host-tumor interactions. *Cancer Biol Ther.* 2004 Aug;3(8):715-8. Epub 2004 Aug 11. Review. PubMed PMID: 15197349.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenameele P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*23(16):2861-74.
- Sakuma S, Kato Y, Nishigaki F, Sasakawa T, Magari K, Miyata S, Ohkubo Y, Goto T.(2000). FK506 potently inhibits T cell activation induced TNF-alpha and IL-1beta production in vitro by human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Pharmacol.*130(7):1655-63.
- Saleh, A.; Srinivasula, S.M.; Acharya, S.; Fishel, R.; Alnemri, E.S. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 17941-17945.
- Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J. (2008). Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell Mol Life Sci.*65(19):2979-99.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sambrook J, Green R. Michael, *MacCallumPeter*(2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev.* 7(3):284-301.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 2000;21:55-89.

- Scarpulla R.C., Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1576 (2002) 1–14.
- Scarpulla R.C., Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells, *J. Cell. Biochem.* 97 (2006) 673–683.
- Schaaf, M.J., Cidlowski, J.A., 2002. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 37–48.
- Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of. *Pharmacol Ther*96(1):23-43.
- Schäcke, H., Schottelius, A., Döcke, W.D., Strehlke, P., Jaroch, S., Schmees, N., Rehwinkel, H., Hennekes, H., Asadullah, K., 2004. Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 227–232.
- Schäcke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K. (2007). Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. *Mol Cell Endocrinol.* 275(1-2):109-117.
- Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin AS Jr. (1995). Characterization of Mechanisms Involved in Transrepression of NF- κ B by Activated Glucocorticoid Receptors. *Molecular and Cellular Biology*15(2):943-53.
- Scheller, K., Sekeris, C. E., Krohne, G., Hock, R., Hansen, I. A., and Scheer, U. (2000) Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 299–307.
- Scheller K., Seibel P., Sekeris C.E., Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells, *Int. Rev. Cytol.* 222 (2003) 1–61.
- Schlossmacher G, Stevens A, White A. (2011). Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J Endocrinol.* 211(1):17-25.
- Schoepe, S., Schacke, H., May, E., Asadullah, K., 2006. Glucocorticoid therapy induced skin atrophy. *Exp. Dermatol.* 15, 406–420.
- Schüle, R., Rangarajan, P., Klierer, S., Ransone, L.J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I.M., Evans, R.M., 1990. Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62, 1217–1226.
- Schuler M, Green DR. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*29(Pt 6):684-8.
- Schwend, T., and Gustafsson, J. A. (2006) False positives in MALDITOF detection of ERbeta in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343, 707–711.
- Seckl JR, Walker BR. Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology.* 2001 Apr;142(4):1371-6. Review. PubMed PMID: 11250914.
- Sengupta S, Wasylyk B. (2001). Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by Hdm2. *Genes Dev.* 15(18):2367-80.
- Seyer P., Grandemange S., Busson M., Carazo A., Gamaleri F., Pessemeesse L., Casas F., Cabello G., Wrutniak-Cabello C., Mitochondrial activity regulates myoblast differentiation by control of c-Myc expression, *J. Cell. Physiol.* 207 (2006) 75–86.
- Shah SA, Tan HL, Sultan S, Faridz MA, Shah MA, Nurfaizilah S, Hussain M (2014). Microbial-catalyzed biotransformation of multifunctional triterpenoids derived from phytonutrients. *Int J Mol Sci.* 15(7):12027-60.

Shimada K., Nakamura M., Ishida E., Kishi M., Konishi N., Roles of p38- and c-jun NH2-terminal kinase-mediated pathways in 2-methoxyestradiol-induced p53 induction and apoptosis, *Carcinogenesis* 24 (2003) 1067–1075.

Shimajo M, Hiroi N, Yakushiji F, Ueshiba H, Yamaguchi N, Miyachi Y. Differences in down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by cortisol, prednisolone and dexamethasone in HeLa cells. *Endocr J.* 1995 Oct;42(5):629-36. PubMed PMID: 8574285.

Short K.R., Bigelow M.L., Kahl J., Singh R., Coenen-Schimke J., Raghavakaimal S., Nair K.S., Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 5618–5623.

Sigma. (n.d.). Product Number C6241: Charcoal, dextran coated. *Sigma-Aldrich, Inc.* Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://www.sigmaaldrich.com>

Sionov, R. V., Cohen, O., Kfir, S., Zilberman, Y., and Yefenof, E. (2006) Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid- induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 203, 189–201.
Sionov RV, Spokoini R, Kfir-Erenfeld S, Cohen O, Yefenof E. Mechanisms regulating the susceptibility of hematopoietic malignancies to glucocorticoid-induced apoptosis. *Adv Cancer Res.* 2008;101:127-248. doi: 10.1016/S0065-230X(08)00406-5. Review. PubMed PMID: 19055945.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.*276(10):7320-6.

Smith, L.K.; Cidlowski, J.A. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Prog. Brain Res.* 2010, 182, 1-30.

Solakidi, S., Psarra, A.-M. G., and Sekeris, C. E. (2005) Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: localization of ERalpha in the nucleoli and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1745, 382–392.

Solakidi, S., Psarra, A.-M. G., Nikolaropoulos, S., and Sekeris, C. E. (2005) Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum. Reprod.* 20, 3481–3487.

Solakidi S, Psarra AM, Sekeris CE. (2007). Differential distribution of glucocorticoid and estrogen receptor isoforms: localization of GRbeta and ERalpha in nucleoli and GRalpha and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 7(3):240-5.

Stalmans W, Laloux M. Glucocorticoids and hepatic glycogen metabolism. *Monogr Endocrinol.* 1979;12:517-33. Review. PubMed PMID: 114752.

Stavreva D. A., Müller W. G., Hager G. L., Smith C. L. and McNally J. G. (2004). Rapid Glucocorticoid Receptor Exchange at a Promoter Is Coupled to Transcription and Regulated by Chaperones and Proteasomes. *Mol. Cell. Biol.* 24, 2682–2697.

Sterling, K., Campbell, G. A., and Brenner, M. A. (1984) Purification of the mitochondrial triiodothyronine (T3) receptor from rat liver. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 105, 391–397.

Stöcklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F., Groner, B., 1996. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383, 726–728.

Stoecklin, E., Wissler, M., Moriggl, R., Groner, B., 1997. Specific DNA binding of Stat5, but not of glucocorticoid receptor, is required for their functional cooperation in the regulation of gene transcription. *Mol. Cell Biol.* 17, 6708–6716.

Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G.. (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 192(4):571-80.

- Taiz and Zeiger (2012). Φυσιολογία Φυτών. Εκδόσεις Utopia
- Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R. (2006). Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology*. 147(12):5549-56.
- ThermoFisher Scientific Inc. (2013). Διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο: <http://www.piercenet.com/browse>
- Thornberry N.A., Lazebnik Y., Caspases: enemies within, *Science* 281 (1998) 1312–1316.
- Tian, S., Poukka, H., Palvimo, J. J., and Jänne, O. A. (2002). Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem. J.* 367, 907–911.
- Tliba O., Cidlowski J. A. and Amrani Y. (2006). CD38 expression is insensitive to steroid action in cells treated with Tumor Necrosis Factor- α and Interferon- γ by a mechanism involving the up-regulation of the Glucocorticoid Receptor β isoform. *Mol. Pharmacol.* 69, 588–596.
- Tong X, Lin S, Fujii M, Hou DX. Molecular mechanisms of echinocystic acid-induced apoptosis in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Aug 27;321(3):539-46. PubMed PMID: 15358141.
- Torchilin VP. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 4(2):145-60.
- Tronche, F., Opherck, C., Moriggl, R., Kellendonk, C., Reimann, A., Schwake, L., Reichardt, H.M., Stangl, K., Gau, D., Hoefflich, A., Beug, H., Schmid, W., Schutz, G., 2004. Glucocorticoid receptor function in hepatocytes is essential to promote postnatal body growth. *Genes Dev.* 18, 492–497.
- Tuckermann JP, Reichardt HM, Arribas R, Richter KH, Schütz G, Angel P. The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J Cell Biol.* 1999 Dec 27;147(7):1365-70. PubMed MID: 10613894; PubMed Central PMCID: PMC2174255.
- 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.
- van den Akker EL, Koper JW, van Rossum EF, Dekker MJ, Russcher H, de Jong FH, et al. Glucocorticoid receptor gene and risk of cardiovascular disease. *Arch Intern Med* 2008;168:33-9.
- Vilasco, M. et al. (2011) Glucocorticoid receptor and breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 130, 1–10
- Violette S., Poulain L., Dussaulx E., Pepin D., Faussat A.M., Chambaz J., Lacorte J.M., Staedel C., Lesuffleur T., Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status, *Int. J. Cancer* 98 (2002) 498–504.
- Walker R. Brian. (2007). Glucocorticoids and Cardiovascular Disease. *Eur J Endocrinol.* 157: 545-559.
- Wallace D.C., Mitochondrial diseases in man and mouse, *Science* 283 (1999) 1482–1488.
- Wallace, A. D., and Cidlowski, J. A. (2001). Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* 276, 42714–42721.
- Wang, Z., Frederick, J., and Garabedian, M. J. (2002). Deciphering the phosphorylation “code” of the glucocorticoid receptor in vivo. *J. Biol. Chem.* 277, 26573–26580.

- Wang X., DeFranco D. B. (2005). Alternative Effects of the Ubiquitin-Proteasome Pathway on Glucocorticoid Receptor Down-Regulation and Transactivation Are Mediated by CHIP, an E3 Ligase. *Mol. Endocrinol.* 19, 1474–1482.
- Wang, S. C., Myers, S., Dooks, C., Capon, R., and Muscat, G. E. (2009). An ERbeta/gamma agonist modulates GRalpha expression, and glucocorticoid responsive gene expression in skeletal muscle cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 315, 146–152
- Webster J. C., Oakley R. H., Jewell C. M. and Cidlowski J. A. (2001). Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative β isoform: A mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6865–6870.
- Weinstein, R.S. (2012) Glucocorticoid-induced osteonecrosis. *Endocrine* 41, 183–190
- Windle RJ, Wood SA, Kershaw YM, Lightman SL, Ingram CD, Harbuz MS. (2001). Increased corticosterone pulse frequency during adjuvant-induced arthritis and its relationship to alterations in stress responsiveness. *J Neuroendocrinol.* 13(10):905-11.
- Windle RJ, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD. (1998). The pulsatile characteristics of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses. *Endocrinology* 139(10):4044-52.
- Wrutniak, C., Cassar-Malek, I., Marchal, S., Rasclé, A., Heusser, S., Keller, J. M., Fle'chon, J., Dauc, a, M., Samarut, J., Ghysdael, J., Cabello, G. (1995) A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J. Biol. Chem.* 270, 16347–16354.
- Wu I, Shin SC, Cao Y, Bender IK, Jafari N, Feng G, et al. Selective glucocorticoid receptor translational isoforms reveal glucocorticoid-induced apoptotic transcriptomes. *Cell Death Dis* 2013;4:e453.
- Xu K., Thornalley P.J., Signal transduction activated by the cancer chemopreventive isothiocyanates: cleavage of BID protein, tyrosine phosphorylation and activation of JNK, *Br. J. Cancer* 84 (2001) 670–673.
- Xu, J., O'Malley, B.W., 2002. Molecular and cellular biology of steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 3, 185–192.
- Yan XJ, Gong LH, Zheng FY, Cheng KJ, Chen ZS, Shi Z. (2014). Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. *Drug Discov Today.* 19(4):482-8.
- Yang, S. H., Liu, R. Perez, E. J., Wen, Y., Stevens, S. M., Jr., Valencia, T., Brun-Zinkernagel, A. M., Prokai, L., Will, Y., Dykens, J., Koulen, P., and Simpkins, J. W. (2004) Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 4130–4135.
- Yang, S. H., Prokai, L., and Simpkins, J. W. (2006) Correspondence regarding Schwend and Gustafsson. "False positives in MALDI-TOF detection of ERbeta in mitochondria." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 917–918.
- Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, Karin M. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell.* 1990 Sep 21;62(6):1205-15. PubMed PMID: 2169352.
- Yoshinaga SK, Peterson CL, Herskowitz I, Yamamoto KR. Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science.* 1992 Dec 4;258(5088):1598-604. PubMed PMID: 1360703.
- You YN, Short RK, Jourdan M, Klaus AK, Walrand S and Sreekumaran KS. (2009). The Effect of High Glucocorticoid Administration and Food Restriction on Rodent Skeletal Muscle Mitochondrial Function and Protein Metabolism. *PLoS ONE* 4(4): e5283. doi:10.1371/journal.pone.0005283.

Yudt MR, Jewell CM, Bienstock RJ, Cidlowski JA. Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta. *Mol Cell Biol* 2003;23:4319-30.

Zhang, Z., Jones, S., Hagood, J.S., Fuentes, N.L., Fuller, G.M., 1997. STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 272, 30607–30610.

Γαλάτης Β., Γανωτάκης Δ., Γκάνη-Σπυροπούλου Κ., Καραμπουρνιώτης Γ., Κοτζαμπάσης Κ., Κωνσταντινίδου Ε.Ι., Μανέτας Ι., Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Κ.Α. (2009). *Φυσιολογία Φυτών Από το μόριο στο περιβάλλον*. Ηράκλειο:Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Μαρκουλάτος Π., *Σημειώσεις Μοριακής Ογκογένεσης*

Σμοκοβίτης Αθανάσιος (2007). *Φυσιολογία Ζώων*. Θεσσαλονίκη: Αδερφών Κυριακίδη α.ε.

www.rdchemicals.com

