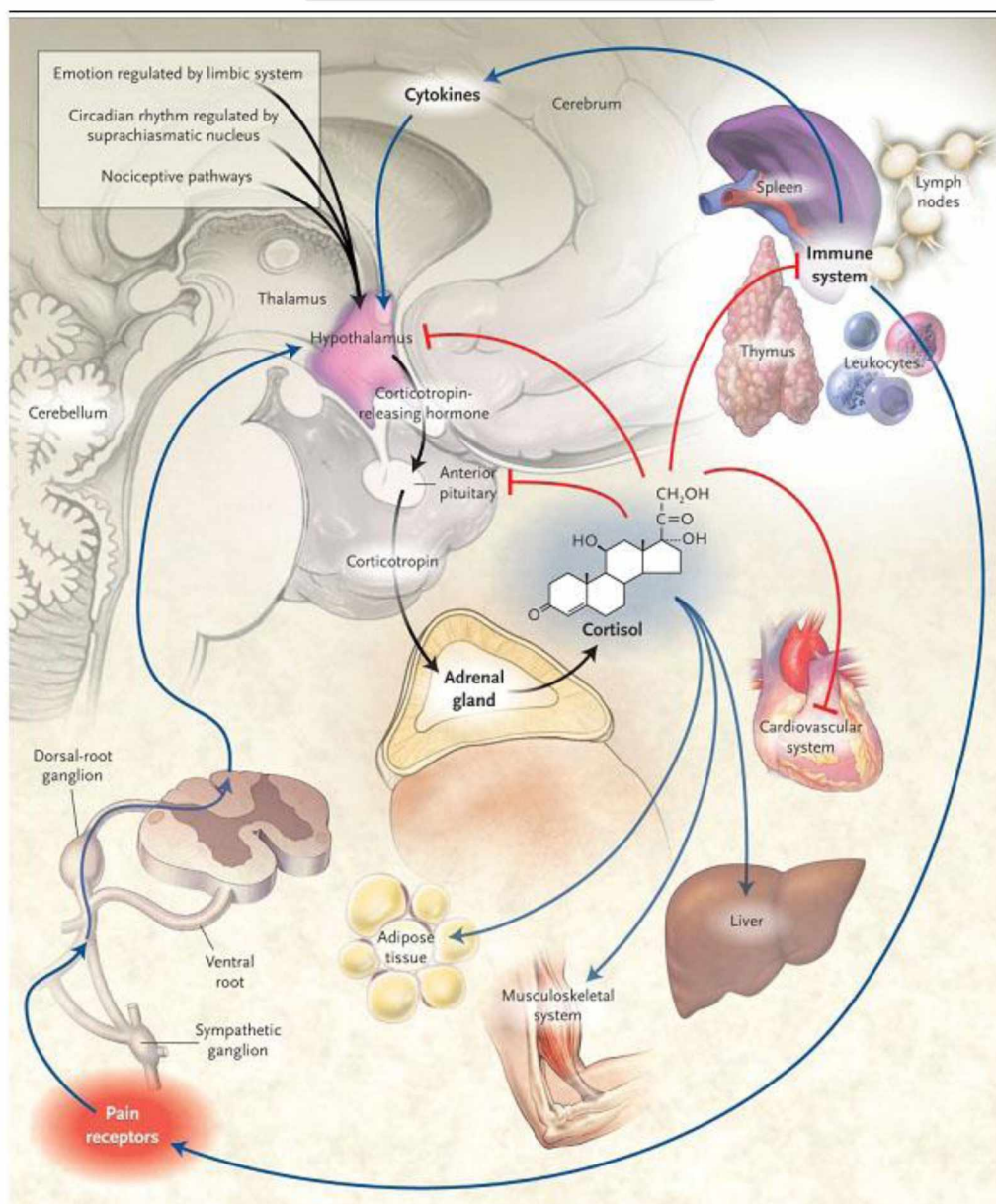




# Διερεύνηση της στεροειδικής δράσης φυτικής προέλευσης τριτερπενοειδών και των παραγώγων αυτών σε ex vivo σύστημα κυττάρων

## ΖΟΡΜΠΙΑΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ



Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ψαρρά Άννα Μαρία

Λάρισα, 2017

Διπλωματική εργασία:

**Διερεύνηση της στεροειδικής δράσης φυτικής  
προέλευσης τριτερπενοειδών και των παραγώγων  
αυτών σε ex vivo σύστημα κυττάρων**

Diploma project:

**Evaluation of steroidal action of plant-derived  
triterpenoids and of their derivatives  
in ex vivo cell system**



Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη της επίκουρου καθηγήτριας, Ψαρρά Άννα-Μαρία, κατά το εαρινό εξάμηνο του 2017.

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:**

**Ψαρρά Άννα-Μαρία:** Επίκουρος καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Τριμελής επιτροπή:**

**Ψαρρά Άννα-Μαρία:** Επίκουρος καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Λεωνίδας Δ. Δημήτριος:** Καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Παπαδοπούλου Καλλιόπη:** Αναπληρώτρια καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες,

Με την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά και ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Ψαρρά Άννα-Μαρία, που μου έδωσε την ευκαιρία να αποτελώ μέλος της επιστημονικής της ομάδας και να ολοκληρώσω με επιτυχία τη διπλωματική μου εργασία. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ανάθεση αυτής της εργασίας, για την πολύτιμη βοήθειά της και φυσικά για τις συμβουλές που μου έδωσε για όλη τη διάρκεια που πραγματοποιήθηκε η διπλωματική μου εργασία. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Καρρά Κατερίνα, για την πολύτιμη βοήθειά της αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και φυσικά για την υπέροχη ομάδα που δημιουργήσαμε. Ακόμη, να ευχαριστήσω, τους υποψήφιο διδάκτορα Βύρων Γοργογιέτα και υποψήφιο μεταπτυχιακό Ιωάννη Τσιάλλα, για τη βοήθειά τους και την άποψη συνεργασία που είχαμε όλον αυτόν τον καιρό. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για το όμορφο κλίμα και τη συνεργασία που είχαμε, αλλά και τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου που έδωσαν τη δυνατότητα να ολοκληρώσω τη διπλωματική μου εργασία.

# Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	5
Περίληψη.....	7
Abstract.....	8
<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Τα γλυκοκορτικοειδή.....</b>	<b>9</b>
1.1.1. Γενικές πληροφορίες.....	9
1.1.2. Η δομή των γλυκοκορτικοειδών ορμονών.....	10
1.1.3. Γλυκοκορτικοειδή και καρδιακός ρυθμός.....	12
<b>1.2. Πυρηνικοί υποδοχείς.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ( Glucocorticoid receptor, GR ).....</b>	<b>13</b>
1.3.1. Γενικές πληροφορίες.....	13
1.3.2. Η δομή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	14
1.3.3. Το γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	15
1.3.4. Οι ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	16
1.3.5. GR μηχανισμοί σηματοδότησης.....	19
1.3.6. Ο ρόλος του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στην απόπτωση.....	22
1.3.7. Ο ρόλος του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στη γλυκονεογένεση.....	23
1.3.8. Ο GR ως θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση του διαβήτη.....	23
1.3.9. Βιολογικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών και χρήση τους ως θεραπευτικό μέσο.....	24
1.3.10. Παρενέργειες από τη θεραπευτική αγωγή με γλυκοκορτικοειδή.....	25
<b>1.4. SEGRAs: Επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....</b>	<b>25</b>
<b>1.5. Τα τριτερπένια: Γενικές πληροφορίες και εν δυνάμει αντικαρκινικοί παράγοντες.....</b>	<b>26</b>
1.5.1. Οι αμυρίνες: Δομή-Βιοσύνθεση και βιολογική δράση.....	26
<b>2. Σκοπός.....</b>	<b>28</b>
<b>3. Υλικά και μέθοδοι.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Υλικά.....</b>	<b>29</b>
3.1.1. Αντιδραστήρια.....	29
3.1.1.1. Χημικά αντιδραστήρια.....	29
3.1.1.2. Θρεπτικά υλικά.....	30
3.1.2. Αντισώματα.....	30
3.1.2.1. Πρωτογενή αντισώματα.....	30
3.1.2.2. Δευτερογενή αντισώματα.....	30
3.1.3. Βακτηριακά στελέχη.....	30
3.1.4. Πλασμιδιακοί φορείς.....	30

3.1.5.	Διαλύματα .....	31
3.1.6.	Οργανολογία.....	33
3.1.7.	Αναλώσιμα .....	33
3.2.	Μέθοδοι.....	34
3.2.1.	Καρκινική κυτταρική σειρά HeLa.....	34
3.2.1.1.	Απόψυξη κυττάρων .....	34
3.2.1.2.	Θρυψινοποίηση των κυττάρων.....	35
3.2.1.3.	Πάγωμα των κυττάρων.....	35
3.2.1.4.	Μέτρηση και στρώσιμο των κυττάρων.....	35
3.2.1.5.	Ανοσοιστοχημεία.....	36
3.2.2.	Western Blot Analysis.....	38
3.2.2.1.	Προετοιμασία δειγμάτων.....	38
3.2.2.2.	Συλλογή των κυττάρων.....	39
3.2.2.3.	Λύση των κυττάρων .....	39
3.2.2.4.	Ομογενοποίηση των κυττάρων ( Sonication ) .....	39
3.2.2.5.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	39
3.2.2.6.	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτη πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες(SDS-PAGE) 40	
3.2.2.7.	Ανοσοαποτύπωση κατά Western ( Western Blotting ).....	42
3.2.3.	Παροδική διαμόλυνση κυττάρων ( Transfection ) .....	43
3.2.3.1.	Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40-β-Gal και pMMTV-GRE-Luc.....	43
3.2.4.	Πρωτόκολλο λουσιφεράσης/ β-γαλακτοσιδάσης.....	46
3.2.4.1.	Δοκιμασία λουσιφεράσης.....	46
3.2.4.2.	Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης .....	47
4.	Αποτελέσματα.....	48
4.1.	Οι αμυρίνες επάγουν την μετατόπιση του GR στον πυρήνα .....	48
4.2.	Επίδραση των αμυρινών στην GR μεταγραφική δραστηριότητα .....	48
4.3.	Επίδραση των αμυρινών στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK.....	49
4.4.	Επίδραση των αμυρινών στην επαγωγή της απόπτωσης .....	50
4.5.	Επίδραση των αμυρινών στα πρωτεολυτικά ένζυμα προ-κασπάση 9 και προ-κασπάση 3.....	53
5.	Συζήτηση .....	56
6.	Βιβλιογραφία .....	57



## Περίληψη.

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) είναι στεροειδείς ορμόνες που ασκούν τη δράση τους μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Ο GR ανήκει στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας εξαρτώμενος από τη δέσμευση της ορμόνης-προσδέτη. Τα GCs ρυθμίζουν πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική ανάπτυξη, ο μεταβολισμός, η ανοσολογική απόκριση και η απόπτωση. Λόγω της ισχυρής αντιφλεγμονώδους δράσης που έχουν τα GCs χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση, η σκλήρυνση κατά πλάκας, οι φλεγμονώδεις ασθένειες του εντέρου, το άσθμα, η αλλεργική ρινίτιδα και άλλες δερματικές αλλεργίες. Επιπλέον, λόγω των αποπτωτικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών, χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική για τη θεραπεία πολλών καρκίνων του αίματος. Ωστόσο, η χρόνια χορήγηση των GCs προκαλεί ανεπιθύμητες και δυσμενείς παρενέργειες όπως ο διαβήτης, η οστεοπόρωση, η μυϊκή αδυναμία, η καθυστέρηση ανάπτυξης στα παιδιά, η ανακατανομή του λίπους, η υπέρταση, η επιβράδυνση επούλωσης τραυμάτων και οι διαταραχές στη διάθεση και την καταστολή του άξονα HPA. Για τους λόγους αυτούς, έχει προκύψει η ανάγκη εύρεσης εκλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRAs), οι οποίοι θα διατηρούν τις ισχυρές αντιφλεγμονώδεις δράσεις των GCs και παράλληλα θα μειώνουν τις ανεπιθύμητες παρενέργειες. Επίσης, λόγω της κύριας δράσης των γλυκοκορτικοειδών για τον έλεγχο της ομοιοστασίας της γλυκόζης, μέσω της επαγωγής των γλυκονογενετικών ενζύμων, μετά την ενεργοποίηση του συγγενικού υποδοχέα της, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών χρησιμοποιείται ως φαρμακευτικός στόχος για τη θεραπεία διαταραχών ορμονικής ομοιόστασης, όπως ο διαβήτης. Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε εάν τριτερπενοειδείς ενώσεις, όπως οι α-αμυρίνες, που έχουν παρόμοια δομή με τα GCs, ασκούν τη δράση τους μέσω του GR και επομένως αν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως SEGRAs. Προκαταρκτικά αποτελέσματα από την ανάλυση ανοσοϊστοχημείας σε κύτταρα HeLa, έδειξαν ότι οι α-αμυρίνες επάγουν τη μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Έτσι, εφαρμόσαμε δοκιμασίες λουσιφεράσης / β-γαλακτοσιδάσης, για να ελέγξουμε αν οι α-αμυρίνες επηρεάζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι α-αμυρίνες μειώνουν σημαντικά την επαγόμενη από DEX ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR. Ακολούθως διεξήχθη Western Blot ανάλυση για να αξιολογηθεί η επίδραση των α-αμυρινών σε στόχους GR, που εμπλέκονται στη γλυκονογένεση και την απόπτωση. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα επίπεδα πρωτεϊνών της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολπυροσταφυλικού οξέος (PEPCK), ένα γλυκονογενετικό ένζυμο, μειώνονται παρουσία α-αμυρινών. Επίσης, προκαταρκτικές μελέτες δείχνουν πιθανή αρνητική επίδραση των εξεταζόμενων παραγώγων αμυρινών, στα επίπεδα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2, καθώς επίσης στις προ-κασπάσες -9 και -3 που συνιστούν πρωτεολυτικά ένζυμα. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτής της διπλωματικής εργασίας δείχνουν ότι τα εξετασθέντα παράγωγα α-αμυρινών είναι δυνητικοί ρυθμιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με πιθανές αντιδιαβητικές και αποπτωτικές επιδράσεις, φαρμακευτικής σημασίας. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για να αποδειχθεί αυτή η υπόθεση.

## Abstract.

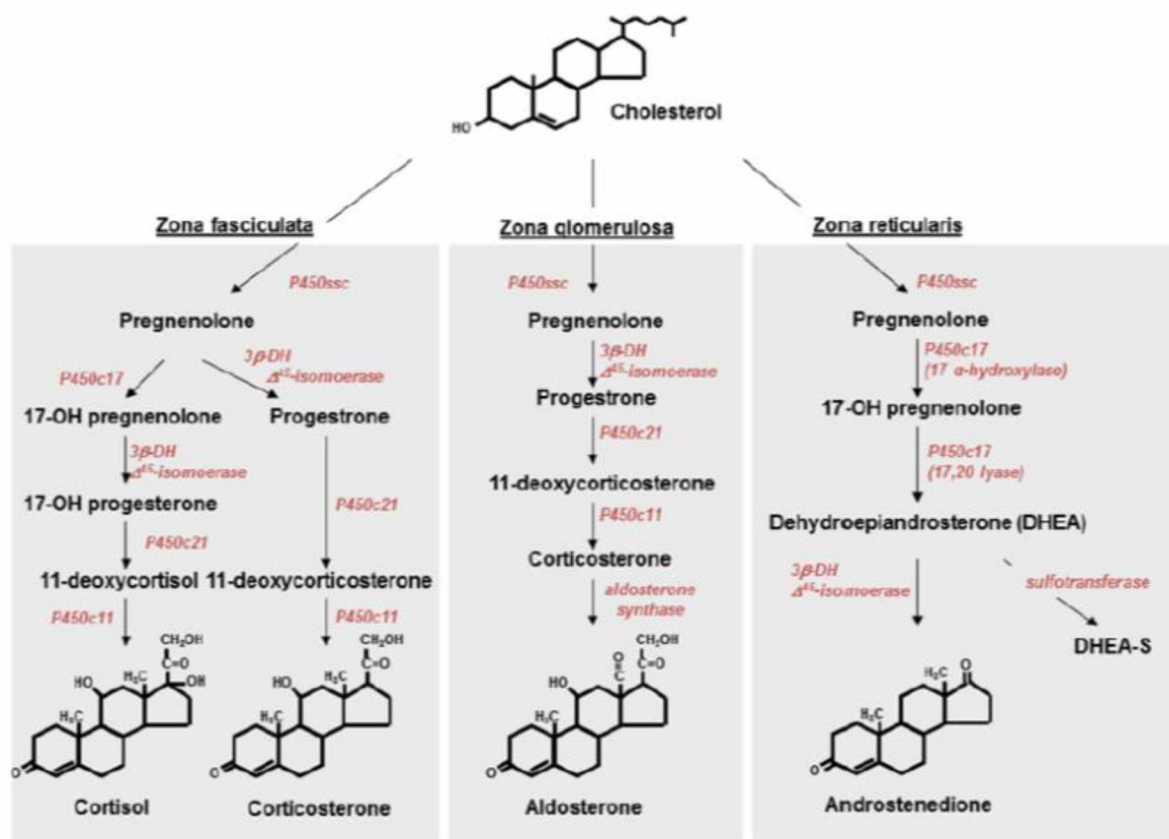
Glucocorticoids (GCs) are steroid hormones that exert their activity through the glucocorticoid receptor (GR). GR belongs to the superfamily of nuclear receptors and acts as a hormone-binding ligand-dependent transcription factor. GCs regulate many cellular functions such as cell growth, metabolism, immune response and apoptosis. Because of the strong anti-inflammatory action they have, GCs are widely used to treat various diseases such as rheumatoid arthritis, psoriasis, multiple sclerosis, inflammatory bowel diseases, asthma, allergic rhinitis and other skin allergies. Moreover, due to the apoptotic actions of glucocorticoids, they are widely used in medicine to treat many hematological cancers. However, chronic use of GCs causes undesirable and adverse side effects such as diabetes, osteoporosis, muscle weakness, growth retardation in children, redistribution of fat, hypertension, delayed wound healing and changes in disposal and suppression of the HPA axis. For these reasons, there has been a need to find selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs) that will retain the potent anti-inflammatory effects of GCs while reducing undesirable side effects. Also because of the main action of glucocorticoids to control glucose homeostasis, through the induction of gluconeogenic enzymes, upon activation of its cognate receptor, glucocorticoid receptor is used as a pharmaceutical target to treat dysregulations of hormone homeostasis, such as diabetes. In the present study we investigated whether triterpenoid compounds, such as  $\alpha$ -amyryns, having a similar structure to GCs, exert their activity through GR and therefore if they can be used as SEGRA. Preliminary results from immunohistochemistry analysis on HeLa cells, showed that  $\alpha$ -amyryns induce the translocation in the nucleus. Thus, we applied luciferase /  $\beta$ -galactosidase reporter assays, to check whether  $\alpha$ -amyryns affect the GR transcriptional activity. The results showed that  $\alpha$ -amyryns significantly reduce the DEX induced activation of GR transcriptional activity. Western blot analysis was then performed to evaluate the effect of  $\alpha$ -amyryns on GR targets, involved in gluconeogenesis and apoptosis. In particular, our results showed that protein levels of the Phosphoenol Pyruvate Carboxy Kinase (PEPCK), a gluconeogenic enzyme, are decreased in the presence of  $\alpha$ -amyryns. Also, preliminary studies indicate a potential negative effect of the amyryns derivatives examined, on the Bcl-2 anti-apoptotic protein levels, as well as on the pro-caspases -9 and -3 which constitute proteolytic enzymes. In conclusion, the results of this diploma project indicate that the  $\alpha$ -amyryns derivatives examined -are potential glucocorticoid receptor modulators with possible antidiabetic and apoptotic effects, of pharmaceutical importance. Further studies are required to prove this hypothesis.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Τα γλυκοκορτικοειδή.

### 1.1.1. Γενικές πληροφορίες.

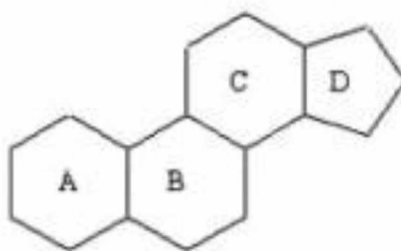
Τα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoids, GCs), ανήκουν στην οικογένεια των στεροειδών ορμονών που παράγονται από το φλοιό των επινεφριδίων σε κιρκαδικό ρυθμό ( Nora Sundhal, 2015 ) ως απάντηση σε καταστάσεις στρες. Οι κυριότερες ενδογενείς στεροειδείς ορμόνες που συντίθενται στο φλοιό των επινεφριδίων είναι η κορτιζόνη, η κορτικοστερόνη, η κορτιζόλη και η αλδοστερόνη, με πρόδρομο μόριό τους τη χοληστερόλη (Εικόνα 1.1). Η κύρια λειτουργία των GCs είναι η αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στον ορό του αίματος για να εφοδιάσουν άμεσα τον εγκέφαλο με ενέργεια, η οποία προέρχεται επιλεκτικά από τη γλυκόζη (Anna Kleiman, 2007). Ακόμη, τα GCs ρυθμίζουν πολλές φυσιολογικές διαδικασίες του οργανισμού όπως, το μεταβολισμό, την ανοσολογική απόκριση, την ανάπτυξη του σκελετού και τις καρδιαγγειακές λειτουργίες ( Oakley and Cidlowski, 2013 ). Έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς ελαττώνουν και εμποδίζουν την ανάπτυξη της φλεγμονής αλλά και παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Έτσι αυτό τα καθιστά να έχουν μεγάλη αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική δράση, για αυτό εξάλλου αποτελούν και τα πιο διαδεδομένα φάρμακα. Εκτός βέβαια, από τα ενδογενή GCs, υπάρχουν και συνθετικά με τα κυριότερα να είναι η δεξαμεθαζόνη και η πρεδνιζολόνη, τα οποία και αυτά ανήκουν στις στεροειδείς ορμόνες. Τα ενδογενή και συνθετικά GCs, χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία της φλεγμονής, για ανοσολογικές και αλλεργικές διαταραχές ( ρευματοειδής αρθρίτιδα, άσθμα, εγκεφαλικό οίδημα), για καρκίνο του αίματος όπως το πολλαπλό μυέλωμα και τη λευχαιμία (Oakley and Cidlowski, 2013). Ωστόσο, η χρόνια χρήση GCs, επιφέρει σημαντικές παρενέργειες στα άτομα που τα χορηγούνται, όπως οστεοπόρωση, παχυσαρκία και διαβήτη.



**Εικόνα 1.1.** Η σύνθεση των στεροειδών ορμονών γίνεται από τη χοληστερόλη, η οποία μέσω μίας σειράς ενζυμικών αντιδράσεων δίνει γένεση στα γλυκοκορτικοειδή, στα αλατοκορτικοειδή, οιστρογόνα και στα ανδρογόνα.

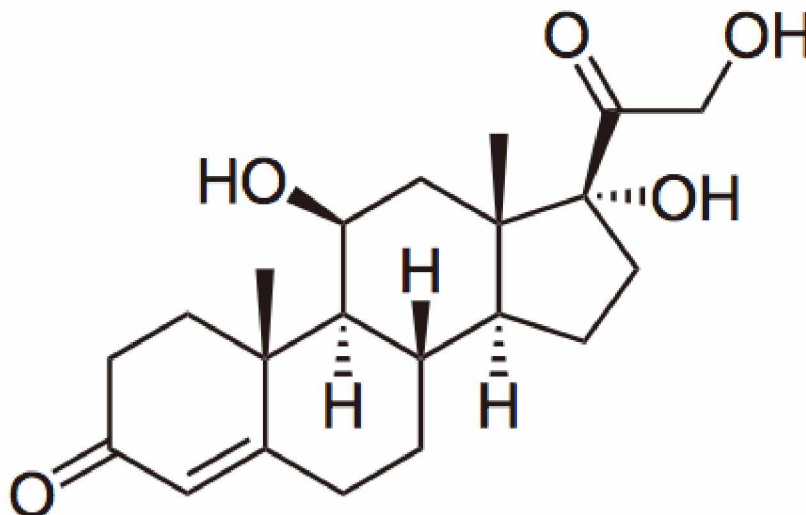
### 1.1.2. Η δομή των γλυκοκορτικοειδών ορμονών.

Η δομή των στεροειδών ορμονών και επομένως των γλυκοκορτικοειδών ορμονών, βασίζεται σε ένα τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων ( Εικόνα 1.2). Οι τέσσερις δακτύλιοι αρχίζουν την αρίθμησή τους από αριστερά προς τα δεξιά και αριθμούνται με Α,Β,С και D. Επίσης η αρίθμηση των ατόμων του άνθρακα ξεκινάει από τα αριστερά και το δακτύλιο Α προς τα δεξιά και το δακτύλιο D. Οι εξαμελείς δακτύλιοι Α,В και C, υιοθετούν διαμορφώσεις τύπου ανάκλιτρου. Λόγω της δύσκαμπτης αυτής γεωμετρικής διάταξης των δακτυλίων αυτών, οι στεροειδείς ορμόνες και επομένως και τα γλυκοκορτικοειδή, δεν υφίστανται τη συνηθισμένη αναστροφή των δακτυλίων των κυκλοεξανίων.



Εικόνα 1.2. Βασική δομή στεροειδών ορμονών

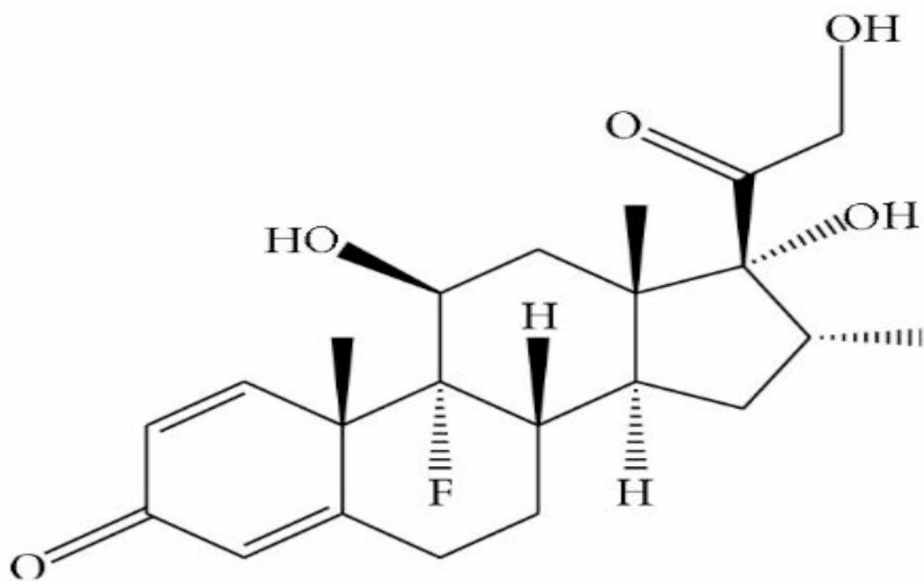
Η κορτιζόλη αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά και φυσικά γλυκοκορτικοειδή. Συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού όπως, τη φλεγμονώδη αντίδραση, τη ρύθμιση της πίεσης του αίματος, την έκκριση ινσουλίνης, το μεταβολισμό και την ομοιόσταση της γλυκόζης στο αίμα.



Εικόνα 1.3. Δομή της κορτιζόλης.



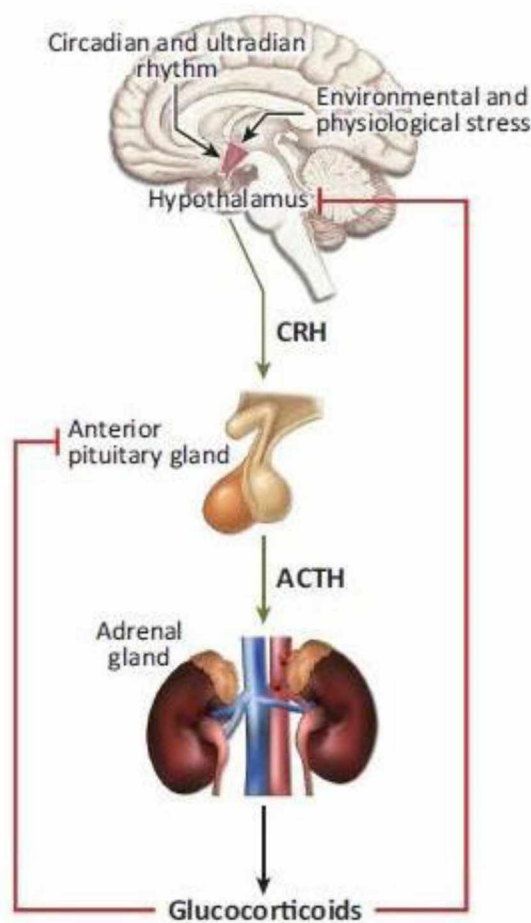
Ένα από τα πιο γνωστά συνθετικά γλυκοκορτικοειδή είναι η δεξαμεθαζόνη ( dexamethasone, DEX ). Αποτελεί μια πολύ δραστική ουσία με αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και έναν από τους πιο καλούς αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Η δομή της ακολουθεί τη βασική δομή των στεροειδών ορμονών και διαφέρει από την κορτιζόλη στην ύπαρξη ενός διπλού δεσμού, μιας α-μεθυλομάδας και μιας α-φθορομάδας.



Εικόνα 1.4. Βασική δομή δεξαμεθαζόνης.

### 1.1.3. Γλυκοκορτικοειδή και κιρκαδικός ρυθμός

Τα γλυκοκορτικοειδή συντίθενται και απελευθερώνονται από τη φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων με κιρκαδικό ρυθμό ως απάντηση σε καταστάσεις στρες. Η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών ρυθμίζεται από τον άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – επινεφρίδια ( hypothalamic – pituitary – adrenal axis, HPA ). Σήματα στρες που καταφθάνουν στον υποθάλαμο, διεγείρουν την έκκριση της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης( Corticotropin – releasing hormone, CRH ), η οποία δρα στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η CRH διεγείρει τη σύνθεση και την έκκριση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης ή επινεφριδιοφλοιοτρόπου ορμόνης ή κορτικοτροπίνης ( Adrenocorticotropin hormone, ACTH ). Η ACTH δρα με τη σειρά της στο φλοιό των επινεφριδίων όπου και ρυθμίζει την παραγωγή και την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών. Τα γλυκοκορτικοειδή και ο άξονας HPA υπόκεινται σε μια κλασική οδό αρνητικής ρύθμισης, όπου τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την έκκριση της CRH και της ACTH από τον υποθάλαμο και τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης αντίστοιχα. ( Εικόνα 1.5. ) ( Oakley and Cidlowski, 2013).



Εικόνα 1.5. Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA axis). Η σύνθεση και η απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών υπόκειται σε κιρκάδια ρύθμιση από τον υποθάλαμο. Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH), που εκκρίνεται από τον υποθάλαμο διεγείρει την απελευθέρωση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης ή κορτικοτροπίνης (ACTH) από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Με τη σειρά της, η ACTH επάγει την σύνθεση και έκκριση των γλυκοκορτικοειδών από το φλοιό των επινεφριδίων στο αίμα.

Τα γλυκοκορτικοειδή όπως αναφέρθηκε, εκκρίνονται με έναν κίρκαδικό ρυθμό. Αυτό σημαίνει ότι, όπως έχει παρατηρηθεί κατά τις πρώτες πρωινές ώρες η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών είναι η μέγιστη, ενώ ελαττώνεται κατά τα διάρκεια της ημέρας. Η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας έχει ως σκοπό τη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών διεργασιών του οργανισμού, όπως το μεταβολισμό, την ανοσολογική απόκριση, την ανάπτυξη του σκελετού, τις καρδιαγγειακές λειτουργίες. (Oakley and Cidlowski, 2013). Επίσης εφοδιάζουν τον εγκέφαλο με γλυκόζη η οποία είναι η κύρια πηγή ενέργειας του, καθώς ρυθμίζουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Ακόμη ρυθμίζουν στο ήπαρ τις αναβολικές διεργασίες προκαλώντας γλυκονεογένεση αλλά και σε περιφερικά όργανα ρυθμίζουν τις καταβολικές διεργασίες ενεργοποιώντας την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και την αύξηση της λιπόλυσης (Kleiman, 2007). Ωστόσο, η αδυναμία ρύθμισης των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών από τον οργανισμό, μπορεί να συνδεθεί με την εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων, όπως η νόσο Cushing και η νόσος Addison, όπου παρατηρείται χρόνια αύξηση των επιπέδων ή ανεπάρκεια των γλυκοκορτικοειδών αντίστοιχα.

## **1.2. Πυρηνικοί υποδοχείς**

Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι πρωτεΐνες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών που λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Βρίσκονται είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα των κυττάρων. Η ενεργοποίησή τους μπορεί να γίνει από άλλους προσδέτες που συνδέονται στον υποδοχέα ή από μετα-μεταφραστική τροποποίηση ( φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, αλληλεπίδραση με άλλους πυρηνικούς υποδοχείς ). Αφού ενεργοποιηθούν μπορούν να δράσουν είτε μόνοι τους είτε σε συνεργασία με άλλου συνενεργοποιητές ή συγκατοστολείς, ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας αντίστοιχα τη γονιδιακή έκφραση. Είναι απαραίτητοι και παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές λειτουργίες όπως, στην ανάπτυξη, στη διαφοροποίηση, στην αναπαραγωγή, στο μεταβολισμό και στην ομοιόσταση. Στους πυρηνικούς υποδοχείς ανήκουν πολλοί υποδοχείς, όπως ο υποδοχέας στεροειδών ορμονών, θυρεοειδών ορμονών και άλλων ορμονών. Στους πυρηνικούς υποδοχείς και συγκεκριμένα στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων των στεροειδών ορμονών ανήκει ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ( Evans, 2005).

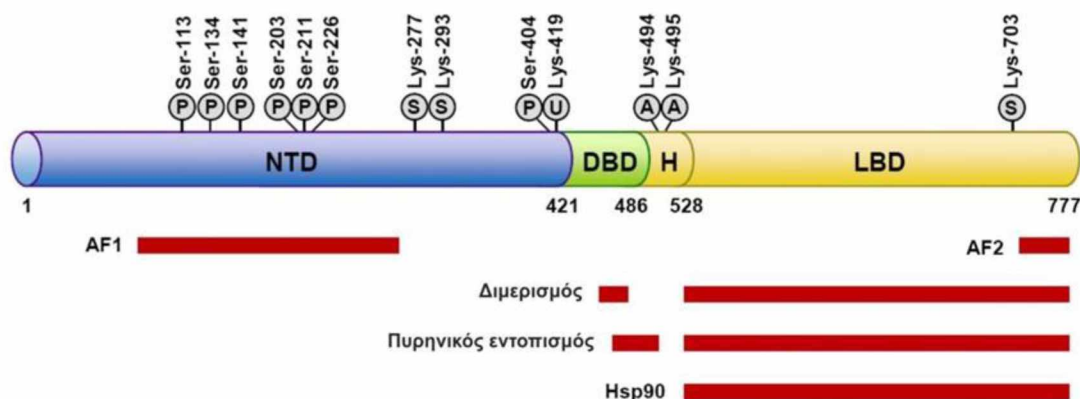
## **1.3. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ( Glucocorticoid receptor, GR )**

### **1.3.1. Γενικές πληροφορίες**

Τα γλυκοκορτικοειδή χορηγούνται σε ασθενείς για τη θεραπεία της φλεγμονής και άλλων ανοσολογικών και αλλεργικών διαταραχών. Η δράση των γλυκοκορτικοειδών επάγεται μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών ( Glucocorticoid Receptor, GR ). Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα στην αδέσμευτη μορφή του ( ανενεργός) ως ολιγομερές και μόλις συνδεθεί το γλυκοκορτικοειδές διμερίζεται και εισέρχεται στον πυρήνα. Ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων που ανιχνεύουν στεροειδείς ορμόνες και συμμετέχουν σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού. Μετά την ενεργοποίησή του μπορεί να δράσει με διαφορετικούς τρόπους. Αρχικά, μπορεί να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος ενεργοποιείται μετά από την πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών και προσδένεται σε πυρηνικό και μεταγραφικό DNA σε στοιχεία απόκρισης γλυκοκορτικοειδών ( Glucocorticoid responsive elements , GREs ) και ρυθμίζει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων. Επίσης μπορεί να δράσει σαν ρυθμιστής άλλων μεταγραφικών παραγόντων ( Orstater, 2012 ).

### 1.3.1.1. Η δομή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών είναι μια αρθρωτή πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές: την N-τελική δομική περιοχή trans ενεργοποίησης ( N-terminal transactivation domain, NTD ), την κεντρική δομική περιοχή πρόσδεσης στο DNA ( DNA binding domain, DBD ) και την C-τελική δομική περιοχή δέσμευσης του προσδέτη ( Ligand binding domain , LBD ). Ακόμη περιέχει και μια ευέλικτη περιοχή που ονομάζεται περιοχή άρθρωσης ( Hinge Region, HR ) η οποία διαχωρίζει τις πρωτεϊνικές επικράτειες DBD και LBD ( Εικόνα 1.6. ) ( Oakley and Cidlowski, 2013).



**Εικόνα 1.6.** Η δομή της πρωτεΐνης του ανθρώπινου GR και τα σημεία μετα-μεταφραστικής τροποποίησης.

Εμφανίζονται οι επικράτειες της πρωτεΐνης και οι περιοχές του υποδοχέα που εμπλέκονται στην trans-ενεργοποίηση ( AF-1 και AF-2 ), στο διμερισμό, στην πυρηνική μετατόπιση και στη σύνδεση με hsp90. Επίσης εμφανίζονται και τα κατάλοιπα των αμινοξέων τροποποιημένα με (P) φωσφορυλίωση, (S) σουμουλίωση, (U) ουβικιτινίωση και (A) ακετυλίωση. Οι αριθμοί είναι για τον ανθρώπινο GR. ( Oakley and Cidlowski, 2013).

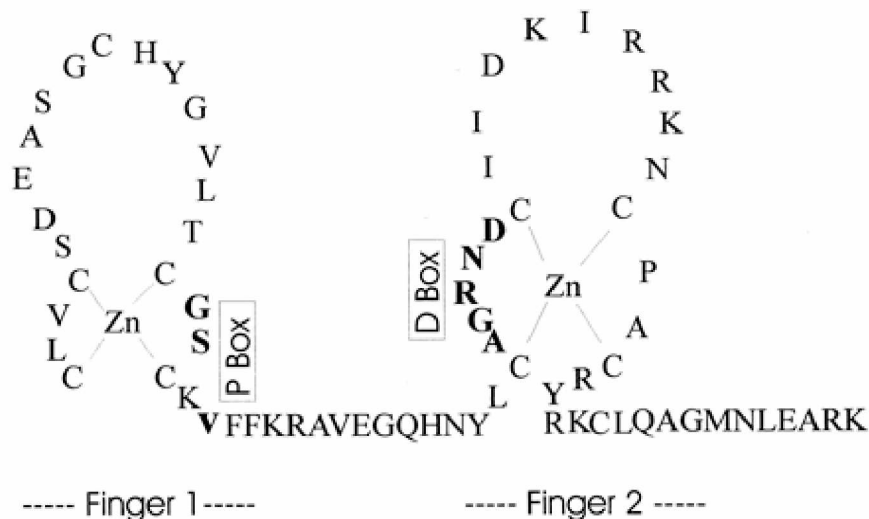
Η N-τελική δομική περιοχή trans ενεργοποίησης (NTD), περιέχει μια πανίσχυρη λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης ( Activation Function -1, AF-1 ) η οποία αλληλεπιδρά με συν-ρυθμιστές και το βασικό μηχανισμό μεταγραφής. Ακόμη περιέχει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης και αποτελεί στόχο πολλών κινασών που συμμετέχουν σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Αυτό την καθιστά την κύρια περιοχή για μετα-μεταφραστική τροποποίηση.

Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) βρίσκεται κεντρικά της πρωτεΐνης του υποδοχέα. Περιέχει δύο μοτίβα δακτυλίων ψευδαργύρου ( Zn finger ) που αναγνωρίζουν και συνδέουν DNA αλληλουχίες-στόχους που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης γλυκοκορτικοειδών ( Glucocorticoid Responsive Elements, GREs ). Αποτελεί την πιο καλά συντηρημένη περιοχή από όλους τους πυρηνικούς υποδοχείς. Καθένας δακτύλιος ψευδαργύρου αποτελείται από δύο πρωτεϊνικές θηλειές που συντονίζονται από ένα άτομο ψευδαργύρου ( Kleiman and Tuckerman, 2007 ). Κάθε δακτύλιος αποτελείται από ένα άτομο ψευδαργύρου ανάμεσα από τέσσερα κατάλοιπα κυστεΐνης. Ο δεύτερος δακτύλιος είναι απαραίτητος για το διμερισμό της πρωτεΐνης ( Εικόνα 1.7. ) ( Vandevyver and Tuckerman, 2013).

Ανάμεσα από την DBD περιοχή και την HR περιοχή βρίσκεται το πρώτο σήμα πυρηνικής τοποθέτησης ( Nuclear Localization signal 1, NL1), το οποίο επιτρέπει την πυρηνική μετατόπιση του υποδοχέα ( Vandevyver and Tuckerman, 2013).

Η περιοχή πρόσδεσης του προσδέτη (LBD) βρίσκεται στο τέλος της πρωτεΐνης και αποτελείται από δώδεκα α-έλικες και τέσσερα β-πτυχωτά φύλλα, τα οποία δημιουργούν ένα υδροφοβικό θυλάκιο για τα γλυκοκορτικοειδή. Επίσης περιέχει μια δεύτερη λειτουργία ενεργοποίησης ( Activation Function 2, AF-2 ) η οποία αλληλεπιδρά με συν-ρυθμιστές με έναν προσδετο-εξαρτώμενο τρόπο. Τέλος περιέχει το δεύτερο σήμα πυρηνικής τοποθέτησης του υποδοχέα ( Nuclear Localization signal 2, NL2).





**Εικόνα 1.7.** Η ακολουθία των καταλοίπων των αμινοξέων του ανθρώπινου υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών που δείχνει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου ( Zn finger). Τα τρία επισημασμένα αμινοξέα γύρω από τον πρώτο ψευδάργυρο, γνωστό και ως P-box, είναι εκείνα τα οποία είναι απαραίτητα για τη διάκριση μεταξύ GRE και ERE, ενώ τα επισημασμένα αμινοξέα γύρω από τον δεύτερο ψευδάργυρο, γνωστό και ως D-box, είναι σημαντικά για τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης - πρωτεΐνης στο διμερές σύμπλοκο DBD-GRE. (Kumar, 1999).

### 1.3.2. Το γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Ο ανθρώπινος υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (hGR) αποτελεί προϊόν ενός μόνο γονιδίου, του γονιδίου NR3C1 ( Nuclear Receptor 3, group C, member 1), το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 5 και πιο συγκεκριμένα στη χρωμοσωμική περιοχή 5q31-32 ( Sivapriya and Cidlowski, 2013). Ο hGR βρίσκεται υπό τον έλεγχο τριών κυρίως υποκινητών στους οποίους εντοπίζονται θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί μόνο ένα γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί τον ανθρώπινο GR. Η οργάνωση του γονιδίου της πρωτεΐνης έχει ως εξής και φαίνεται στην εικόνα 1.8.

Αποτελείται από 9 εξόνια καθένα από τα οποία έχει ένα σημαντικό και ξεχωριστό ρόλο στη δομή και στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί την 5' αμετάφραστη περιοχή ( 5'-UTR). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει, ότι υπάρχουν 9 εναλλακτικά πρώτα εξόνια ( 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1H, 1I, 1J ) που παράγονται από μια μοναδική χρήση του υποκινητή και πιθανόν χρησιμοποιούνται για την ιστοειδική έκφραση του GR ( Sivapriya and Cidlowski, 2013). Ακόμη στην 5'UTR φαίνεται ότι το γονίδιο στερείται ενός πλαισίου TATA και ενός μοτίβου CCAAT. Ωστόσο περιέχει θέσεις δέσμησης για πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως AP-1, AP-2, SP1, NF-kβ και CREB.

Τα εξόνια 2 έως και 9 είναι αυτά που κωδικοποιούν και την πρωτεΐνη του υποδοχέα και την 3' αμετάφραστη περιοχή ( 3' UTR ). Πιο συγκεκριμένα, το εξόνιο 2 κωδικοποιεί το μεγαλύτερο μέρος της N-τελικής δομικής περιοχής ( NTD ), μαζί με την πρώτη λειτουργία ενεργοποίησης ( AF-1 ). Τα εξόνια 3 και 4 κωδικοποιούν την περιοχή πρόσδεσης του DNA ( DBD ) και πιο συγκεκριμένα, το εξόνιο 3 κωδικοποιεί τον πρώτο δακτύλιο ψευδαργύρου ενώ το εξόνιο 4 τον δεύτερο. Τα εξόνια 5 έως και 9α και 9β είναι αυτά που κωδικοποιούν την περιοχή άρθρωσης ( HR ), την περιοχή σύνδεσης του προσδέτη ( LBD ), τη δεύτερη λειτουργία ενεργοποίησης ( AF-2 ) και την 3' αμετάφραστη περιοχή ( 3' UTR ).

## Glucocorticoid Receptor Gene



## Glucocorticoid Receptor Alpha



## Glucocorticoid Receptor Beta



**Εικόνα 1.8.** Γενική αναπαράσταση του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών ( hGR ) και η οργάνωση των εξονίων. Αναπαράσταση των γονιδίων για τις ισομορφές GRα και GRβ.

### 1.3.2.1. Οι ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Η δραστηριότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών ρυθμίζεται από το εναλλακτικό μάτισμα του αρχικού μεταγράφου, από τις μεταφραστικές τροποποιήσεις στην έναρξη του ώριμου mRNA και από τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις. Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, το γονίδιο του ανθρώπινου υποδοχέα ( hGR ), αποτελείται από 9 εξόνια, από τα οποία τα εξόνια 2 έως και 9 είναι αυτά που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη του υποδοχέα. Η πρωτεΐνη του υποδοχέα βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού, αλλά η πιο επικρατές δράσεις του λαμβάνουν χώρα στο ήπαρ, στο νευρικό σύστημα και στους μύες. Οι δύο κυριότερες ισομορφές του hGR και οι πιο καλά μελετημένες προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα του εξονίου 9 και είναι οι πρώτες που κλωνοποιήθηκαν το 1985.

Η ισομορφή GRα προκύπτει από το εναλλακτικό μάτισμα του τέλους του εξονίου 8 με την αρχή του εξονίου 9. Αποτελείται από 777 αμινοξέα από τα οποία τα 727 είναι ταυτόσημα με τα αμινοξέα της ισομορφής GRβ, με επιπλέον 50 αμινοξέα. Η GRα είναι η πιο καλά μελετημένη ισομορφή του hGR και η πιο δραστική. Βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή στο κυτταρόπλασμα και μόλις συνδεθούν σε αυτήν τα γλυκοκορτικοειδή μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου προκαλεί την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων.

Η ισομορφή GRβ προκύπτει και αυτή από εναλλακτικό μάτισμα του εξονίου 9 αλλά με διαφορετικές περιοχές από την GRα. Η GRβ προκύπτει από τη συναρμολόγηση του τέλους του εξονίου 8 με μια ακολουθία προς το τέλος του εξονίου 9. Αποτελείται από 742 αμινοξέα από τα οποία τα 727 είναι ταυτόσημα με τα αμινοξέα της GRα και περιέχει άλλα 15 μη ομόλογα αμινοξέα. Η GRβ είναι μεταγραφικά ανενεργή και δε προσδένεται με γλυκοκορτικοειδή. Ωστόσο, η GRβ ασκεί μια δράση αναστολέα, καθώς ανταγωνίζεται την GRα. Η δράση αυτή φαίνεται να επηρεάζει, όταν αυξάνονται τα επίπεδα της GRβ, την ανοχή στα γλυκοκορτικοειδή.

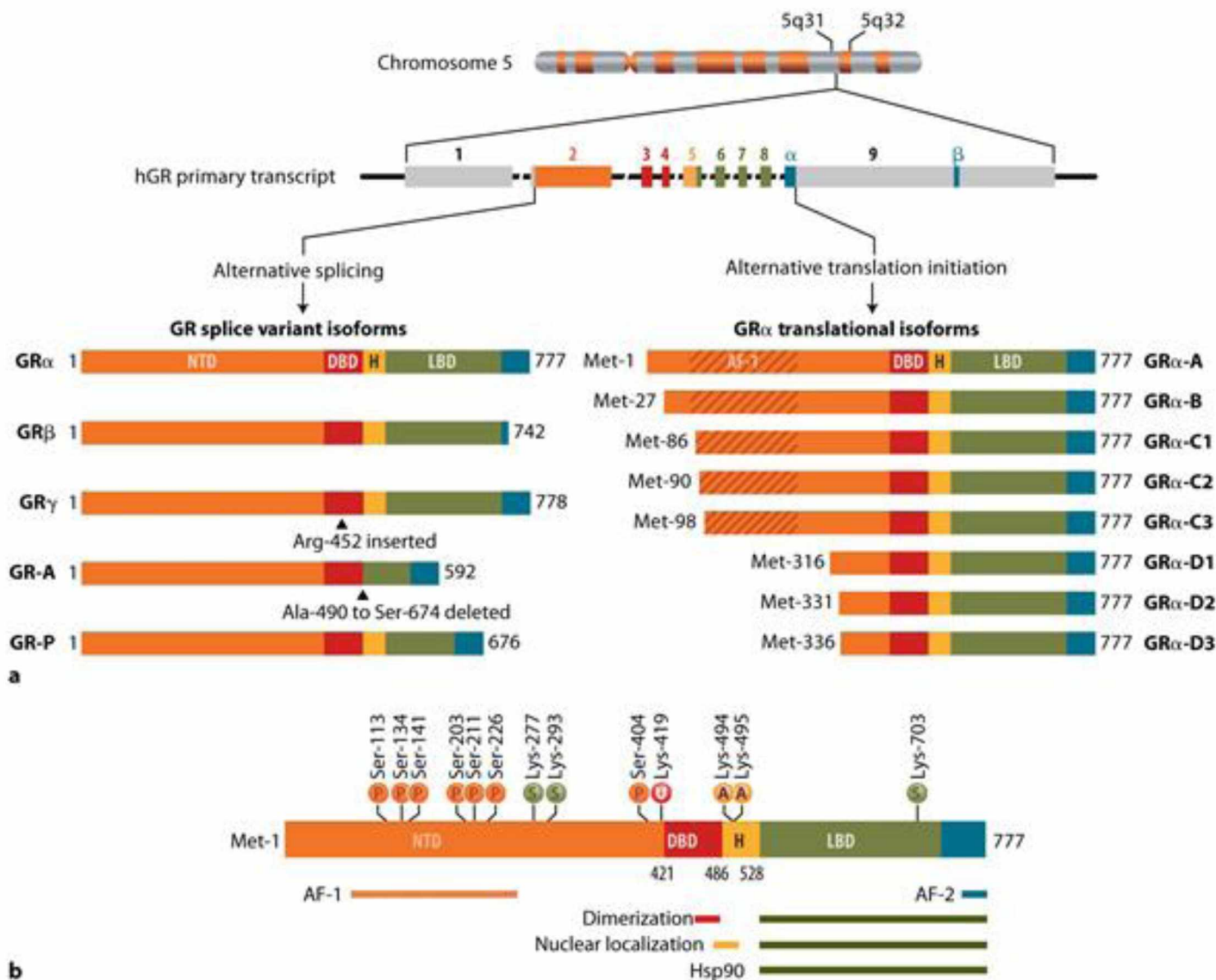
Εκτός όμως από τις ισομορφές GRα και GRβ, υπάρχουν και άλλες ισομορφές του hGR που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα. Εναλλακτικό μάτισμα στο ιντρόνιο που χωρίζει τα εξόνια 3 και 4 που βρίσκονται στην DBD περιοχή, έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση μιας πρωτεΐνης στην οποία έχει προστεθεί ένα κατάλοιπο αργινίνης (Arg) μεταξύ των δύο δακτυλίων ψευδαργύρου της DBD περιοχής. Αυτή η ισομορφή ονομάζεται GRγ και έχει παρόμοια δράση με την GRα. Η ισομορφή GRα προκύπτει από τη συναρμολόγηση του εξονίου

4 με το εξόνιο 8, με αποτέλεσμα την έλλειψη των εξονίων 5 έως 7 και επομένως την έλλειψη του N-τελικού μισού της LBD περιοχής. Η ισομορφή GRP προκύπτει από την αδυναμία συναρμολόγησης του εξονίου 7 με το εξόνιο 8, με αποτέλεσμα την έλλειψη των εξονίων 8 και 9 και επομένως του C-τελικού άκρου της LBD περιοχής. Σε καμία από τις ισομορφές αυτές δεν μπορούν να προσδεθούν γλυκοκορτικοειδή. (Εικόνα 1.9. α).

Εκτός όμως το εναλλακτικό μάτισμα, ο hGR μπορεί να υποστεί και μεταφραστικές τροποποιήσεις στην έναρξη του ώριμου mRNA της πρωτεΐνης. Στο εξόνιο 2 υπάρχουν 8 διαφορετικά καλά συντηρημένα κωδικόνια έναρξης AUG, από τα οποία προκύπτουν και οι διάφορες ισομορφές της hGRα. Η κύρια ισομορφή GRα ξεκινάει από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης. Οι υπόλοιπες ισομορφές της GRα έχουν όλες τις ίδιες DBD και LBD περιοχές όμως διαφέρουν στην N-τελική τους περιοχή λόγω των εναλλακτικών κωδικονίων έναρξης που εντοπίζονται σε αυτή. Οι ισομορφές αυτές που προκύπτουν από τα διαφορετικά κωδικόνια έναρξης είναι οι GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2, GRα-D3. Από αυτές οι GRα-A, GRα-B και GRα-C βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και έχουν παρόμοια δράση με την GRα. Η GRα-C3 είναι η πιο μεταγραφικά ενεργή ισομορφή, ενώ η GRα-D3 είναι οι πιο μεταγραφικά ανενεργές από τις οποίες, η GRα-D3 ισομορφή βρίσκεται στον πυρήνα και όχι στο κυτταρόπλασμα και μπορεί να συνδεθεί με συγκεκριμένα GREs χωρίς να χρειάζεται να προσδεθεί σε αυτή ορμόνη. (Εικόνα 1.9. α) (Oakley and Cidlowski, 2013) (Yudt and Cidlowski, 2002) (Sivapriya and Cidlowski, 2013).

Κάθε ισομορφή του hGR μπορεί να υποστεί και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε συγκεκριμένα σημεία. Οι ισομορφές GRβ, GRγ, GRα και GRP επειδή έχουν τον ίδιο σύνολο κωδικονίων έναρξης υφίστανται παρόμοιες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Αρχικά, μπορεί να φωσφορυλιωθεί(P) σε ειδικές θέσεις φωσφορυλίωσης που εντοπίζονται όλες στην N-τελική περιοχή (NTD) του hGRα και είναι καλά συντηρημένες. Η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται μέσω των κυριότερων κινασών που φωσφορυλιώνουν τον hGRα, όπως οι MAPKs, η κινάση της καζείνης 2, οι κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες και η κινάση 3 της συνθάσης του γλυκογόνου ( GSK-3 ), σε 7 καλά συντηρημένα κατάλοιπα σερίνης ( Ser-113, Ser-134, Ser-141, Ser-203, Ser-211, Ser-226, Ser-404 ). Επίσης μπορεί να υποστεί ουβικιτινίωση (U) σε ένα καλά συντηρημένο κατάλοιπο λυσίνης ( Lys-419 ) που βρίσκεται στο μοτίβο αποικοδόμησης PEST ( αλληλουχίες πλούσιες στα αμινοξέα Proline(P), Glutamic Acid(E), Serine(S), Threonine(T) ) στο τέλος της NTD περιοχής με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του υποδοχέα. Ακόμη, ο υποδοχέας μπορεί να υποστεί σουμολίωση (S) με τα πεπτίδια SUMO ( Small Ubiquitin-related Modifier), τα οποία προσδέονται ομοιοπολικά στον hGR σε κατάλοιπα λυσίνης ( Lys- 277, Lys-293, Lys-703). Τέλος μπορεί να ακετυλωθεί (A) σε κατάλοιπα λυσίνης ( Lys-494, Lys-495 ) τα οποία εντοπίζονται στην περιοχή άρθρωσης ( HR ). Οι περιοχές μετα-μεταφραστικής τροποποίησης φαίνονται στην Εικόνα 1.9.b με τα αντίστοιχα γράμματα





**Εικόνα 1.9.** α. Εναλλακτικό μάτισμα και εναλλακτική εκκίνηση της μετάφρασης του αρχικού μεταγράφου της hGR. Το γονίδιο NR3C1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5q31-32. Το αρχικό μετάγραφο κωδικοποιείται από 9 εξόνια. Η κλασική ισομορφή hGRα προκύπτει από τη συναρμολόγηση του εξονίου 8 με την αρχή του εξονίου 9, ενώ η ισομορφή GRβ προκύπτει από τη συναρμολόγηση του εξονίου 8 με μια κατώτερη ακολουθία του εξονίου 9 που κωδικοποιεί ένα μοναδικό C-τελικό άκρο 15 αμινοξέων (728-742). Η ισομορφή GRγ προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα στην ιντρονική αλληλουχία ανάμεσα στα εξόνια 3 και 4 με αποτέλεσμα την έκφραση μιας πρωτεΐνης με μια προσθήκη αργινίνης (Arg-452) μεταξύ των δύο δακτυλίων ψευδαργύρου της DBD περιοχής. Η ισομορφή GRA προκύπτει από το εναλλακτικό μάτισμα του εξονίου 4 με το εξόνιο 8, με αποτέλεσμα την έλλειψη των εξονίων 5 έως 7, ενώ η ισομορφή GRP προκύπτει από την αδυναμία συναρμολόγησης του εξονίου 7 με το εξόνιο 8 με αποτέλεσμα την έλλειψη των εξονίων 8 και 9. α. GRα μεταφραστικές ισομορφές. Οργάνωση των GRα μεταφραστικών ισομορφών. Η έναρξη της μετάφρασης από 8 διαφορετικά κωδικόνια έναρξης AUG σε ένα απλό mRNA του hGR δημιουργεί ισομορφές προοδευτικά μικρότερες στην NTD περιοχή. Αυτό δημιουργεί τις μεταφραστικές ισομορφές GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2, GRα-D3. b. Δομή του υποδοχέα και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του hGRα. Περιλαμβάνονται οι θέσεις φωσφορυλίωσης (P), σουμολίωσης (S), ουβικιτινίωσης (U) και ακετυλίωσης (A).



### 1.3.3. GR μηχανισμοί σηματοδότησης

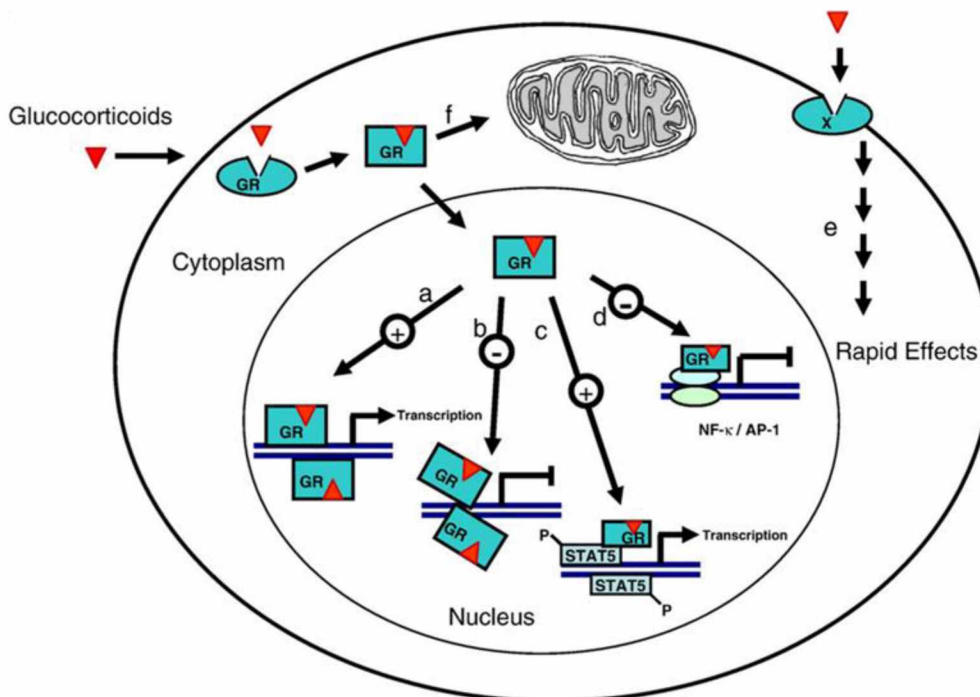
Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα αποτελώντας μέλος ενός μεγάλου πολύ-πρωτεϊνικού συμπλόκου, που περιλαμβάνει πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς ( heat-shock proteins, hsp ) hsp90, hsp70 και hsp40, ανοσοφιλίνες της οικογένειας FK506 ( FKBP51, FKBP52 ), την ανοσοφιλίνη Cyp40 και την πρωτεΐνη συν-μοριακό συνοδό p23. Αυτές διατηρούν τον υποδοχέα σε μια διαμόρφωση όπου είναι μεταγραφικά ανενεργή, όμως προσδίδει μεγαλύτερη συγγένεια στον υποδοχέα για την πρόσδεση γλυκοκορτικοειδών. Η κορτιζόλη που είναι το πιο άφθονο ενδογενές μεταφέρεται στο αίμα προσδεδεμένη σε μια πρωτεΐνη που ονομάζεται σφαιρίνη σύνδεσης κορτικοστεροειδών ( corticosteroid-binding globulin, CBG ). Η CBG διευκολύνει την κυκλοφορία της κορτιζόλης στο αίμα και επίσης συμμετέχει και στην απελευθέρωσή της στους ιστούς.

Η κορτιζόλη απουσία της CBG διαχέεται παθητικά μέσω της πλασματικής μεμβράνης. Ωστόσο η βιοδιαθεσιμότητά της στο κύτταρο εξαρτάται από δύο ένζυμα που λειτουργούν με αντίθετο τρόπο. Η 11β-υδροξυστεροειδή αφυδρογονάση τύπου 2 ( 11β-HSD2 ) που οξειδώνει την κορτιζόλη στον ανενεργό μεταβολίτη κορτιζόνη και η 11β-υδροξυστεροειδή αφυδρογονάση τύπου 1 ( 11β-HSD1 ) που μετατρέπει την κορτιζόνη σε κορτιζόλη. Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή δεν προσδέονται στην πρωτεΐνη CBG και δεν μεταβολίζονται από την 11β-HSD2. Η σύνδεση των γλυκοκορτικοειδών στον GR έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαμόρφωσης του υποδοχέα και την αποδέσμευσή του από τις πρωτεΐνες συνοδούς. Έτσι, έρχονται στην επιφάνεια τα δύο σήματα πυρηνικής τοποθέτησης ( NL1 και NL2 ), ο GR διμερίζεται και εισέρχεται στον πυρήνα μέσω των πυρηνικών πόρων ως ομοδιμερές πλέον και όχι ως μονομερές. Ο GR όταν εισέρχεται στον πυρήνα ασκεί τις δράσεις του είτε με άμεση σύνδεση με το DNA και την ενεργοποίηση ή καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων, ο οποίος μηχανισμός ονομάζεται γενωμικός και είναι ο κύριος τρόπος δράσης, είτε μπορεί να δράσει μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών σηματοδότησης μέσω αλληλεπίδρασης με κυτταροπλασματικό GR ή δεσμευμένο στην μεμβράνη GR, ο οποίος μηχανισμός ονομάζεται μη γενωμικός. Επίσης μπορεί μέσω αλληλεπίδρασης με το μιτοχονδριακό DNA να ρυθμίσει τη μεταγραφή άλλων γονιδίων. ( Psarra, 2007 ).

Στο γενωμικό μηχανισμό δράσης ο GR ενώνεται άμεσα στο DNA μέσω μιας παλινδρομικής αλληλουχία DNA, η οποία ονομάζεται στοιχεία απόκρισης γλυκοκορτικοειδών ( glucocorticoid responsive elements, GREs ), τα οποία έχουν χαρακτηριστική δομή GGAACAnnnTGTTCT. Ο GR προσδέεται σε αυτά τα GREs ως ομοδιμερές όπου κάθε υπομονάδα του GR καταλαμβάνει κάθε μισή περιοχή των GREs. Τα GREs βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή ή του ενισχυτή του συγκεκριμένου γονιδίου-στόχου ( Kadmiel and Cidlowski, 2013). Περιέχουν δύο μισές εξαμερείς περιοχές που διαχωρίζονται από τρία ζεύγη βάσεων. Μόνο το 1/3 αυτών των στοιχείων είναι καλά συντηρημένο. Τα υπόλοιπα 2/3 διαφέρουν από στοιχείο σε στοιχείο, το οποίο καθορίζει και τη διαφορετική μεταγραφική δραστηριότητα του GR ( Meijsing, 2009 ).

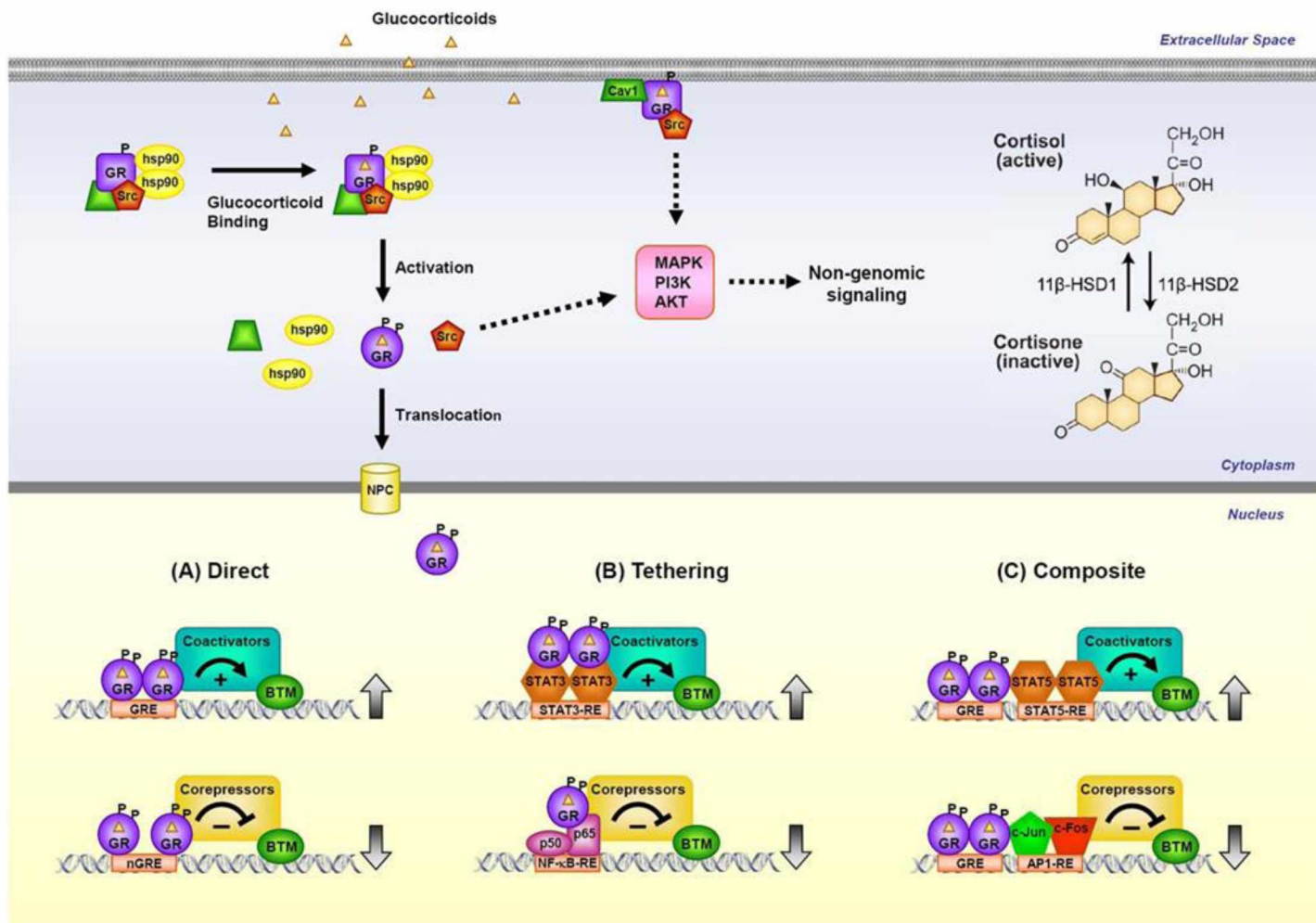
Ο GR στο γενωμικό μηχανισμό δράσης του, είτε ενεργοποιεί είτε καταστέλλει τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων. Στο μηχανισμό ενεργοποίησης της γονιδιακής έκφρασης, ο GR είτε συνδέεται άμεσα με τα GREs είτε αλληλεπιδρά με συμπαραγοντες που ενισχύουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων. Αρχικά, ο GR μπορεί να συνδεθεί άμεσα με τα GREs και να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή των γονιδίων. Επίσης μπορεί να συνδεθεί σε συμπαραγοντες ενεργοποίησης της μεταγραφής και να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή ή μπορεί να συνδεθεί άμεσα στα GREs και σε συνεργασία με συμπαραγοντες να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Τέτοιο συμπαραγοντες είναι οι πρωτεΐνες CBP/p300, η SRC-1, ο μεταγραφικός παράγοντας GRIP1/TIF2, οι πρωτεΐνες STAT-3 και STAT-5 ( πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος και ενεργοποιητές μεταγραφής, οι οποίοι ρυθμίζουν την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, το σύμπλοκο προ-έναρξης της μεταγραφής και τη λειτουργία του βασικού μηχανισμού μεταγραφής.

Στο μηχανισμό καταστολής της γονιδιακής έκφρασης, ο GR προσδένεται είτε άμεσα στο DNA είτε σε συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο NF-κB ( nuclear factor-κB), ο IRF-3 ( Interferon regulatory factor – 3) και ο AP-1 ( Activation protein-1 ). Οι παράγοντες N-CoR και SMRT προσδένονται άμεσα στον GR όταν προσδένεται στα nGREs και μπορούν να δράσουν ως συγκαταστολείς. Πιο συγκεκριμένα, ο GR στην περίπτωση του NF-κB προσδένεται στην p65 υπομονάδα του NF-κB, ενώ στον AP-1 προσδένεται σε nGREs και στην C-Jun υπομονάδα του AP-1 και όχι απευθείας σε αυτή, και καταστέλλει τη μεταγραφή του AP-1 ( Oakley and Cidlowski, 2013).



**Εικόνα 1.10.** Τα γλυκοκορτικοειδή προσδένονται στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και μέσω αλληλεπίδρασης με στοιχεία απόκρισης γλυκοκορτικοειδών (GREs) μπορούν (a) να ενεργοποιούν ή (b) να καταστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του. Με την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης - πρωτεΐνης του συμπλόκου ορμόνη-υποδοχέα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μπορεί (c) να ενεργοποιεί ή (d) καταστέλλει τη μεταγραφή άλλων γονιδίων. Επίσης μπορεί να οδηγήσει σε ταχείες μη γενωμικές επιδράσεις (e) μέσω κλασικών μορφών υποδοχέων, υποδοχέων συνδεδεμένων με G-πρωτεΐνη ή ακόμα και μη αναγνωρισμένα μόρια και μηχανισμούς δράσης. Στα μιτοχόνδρια (f), το σύμπλοκο ορμόνη-υποδοχέα, μέσω αλληλεπίδρασης με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μπορεί να ρυθμίσει τη μεταγραφή γονιδίων ( Psarra, 2007 ).

Εκτός όμως από το γενωμικό μηχανισμό δράσης, ο GR ασκεί και μη γενωμικό μηχανισμό δράσης. Σε αυτόν, ο GR δεν χρειάζεται να δράσει μέσω γονιδιωματικών μηχανισμών και μπορεί να προκαλέσει ταχείες κυτταρικές αποκρίσεις σε λίγα λεπτά ή δευτερόλεπτα χωρίς την ανάγκη αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων. Πολλοί μηχανισμοί φαίνεται να εμπλέκονται σε αυτά τα μονοπάτια σηματοδότησης, τα οποία επηρεάζουν τη δραστηριότητα διαφόρων κινασών όπως η MAPK, η PI3K και η AKT. Επίσης έχει βρεθεί ότι ο GR μπορεί να βρίσκεται προσδεδεμένος στην πλασματική μεμβράνη και όχι ελεύθερος στο κυτταρόπλασμα και να ενεργοποιεί τα ίδια σηματοδοτικά μονοπάτια. Η ύπαρξη μη γενωμικής σηματοδότησης των γλυκοκορτικοειδών προσθέτει μεγαλύτερη πολυπλοκότητα και ποικιλομορφία στις βιολογικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών.



**Εικόνα 1.11.** GR μονοπάτια σηματοδότησης. Ο ενεργοποιημένος από τα γλυκοκορτικοειδή GR ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων με τρεις κυρίως τρόπους, α) με απευθείας σύνδεση στο DNA β) προσδεδεμένος σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται απευθείας στο DNA και γ) με απευθείας σύνδεση στο DNA και αλληλεπιδρώντας με γειτονικούς παράγοντες. Ο GR μπορεί επίσης να σηματοδοτήσει μη γενωμικό μηχανισμό μέσω αλλαγών στη δραστηριότητα διαφόρων κινασών. (Oakley and Cidlowski, 2013).

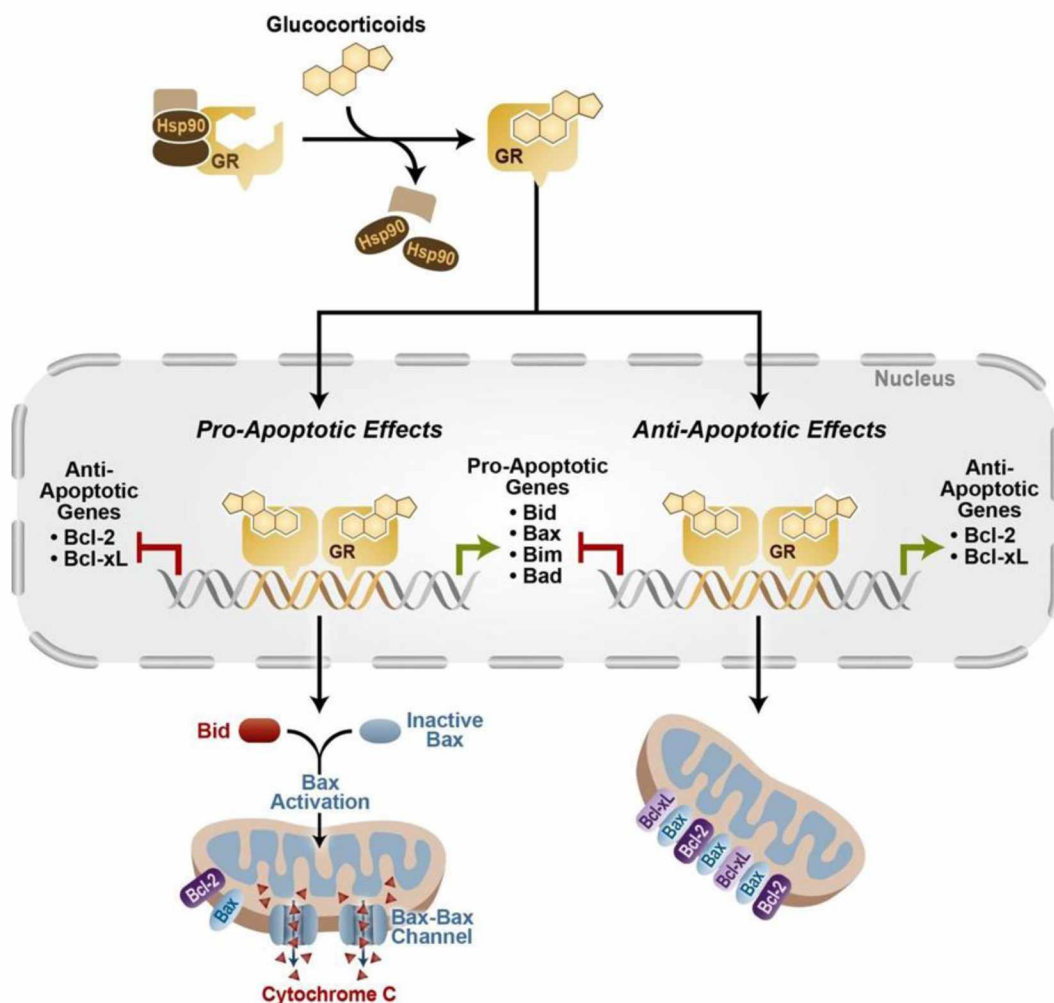


### 1.3.4. Ο ρόλος του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στην απόπτωση

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση διεξάγεται από ένα σύνολο πρωτεϊνών που ονομάζονται κασπάσες. Οι κασπάσες είναι ο τελικός στόχος σε ένα μονοπάτι που ονομάζεται καταρράκτης κασπασών. Οι κασπάσες ενεργοποιούνται από επαγωγείς κασπασών που ρυθμίζονται από ένα πολύπλοκο δίκτυο πρωτεϊνών σηματοδότησης. Μόλις ενεργοποιηθούν οι κασπάσες επάγουν την απόπτωση του κυττάρου, μέσω της μεσολάβησής τους στην πυρηνική διάσπαση και την κυτταρική υποβάθμιση (Sclossmacher, 2011). Γενικά υπάρχουν δύο κύριοι οδοί απόπτωσης:

α) η εξωγενής οδός, που εξαρτάται από τη σύνδεση ενός προσδέτη και την επακόλουθη ενεργοποίηση των προσδεδωμένων στη μεμβράνη υποδοχέων σήματος θανάτου, οι οποίοι ενεργοποιούν τον καταρράκτη κασπασών (Elmore, 2007).

β) η ενδογενής οδός, που ρυθμίζεται από τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 που περιλαμβάνει προ- και αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες. Καταστάσεις στρες οδηγούν στην αύξηση των επιπέδων των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών που επιτρέπουν στις προ-αποπτωτικές Bcl-2 πρωτεΐνες να ελευθερώσουν το CytC από τα μιτοχόνδρια και να ενεργοποιήσουν τον καταρράκτη κασπασών.



**Εικόνα 1.12.** Σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών μέσω GR που μεταβάλλουν προ- και αντι-αποπτωτικά γονίδια που είτε οδηγούν στην απόπτωση είτε στην επιβίωση του κυττάρου ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο ή ιστό.

Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν ενδογενή ερεθίσματα τα οποία ενεργοποιούν την ενδογενή αποπτωτική οδό, η οποία ποικίλει ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την έκφραση των προ-αποπτωτικών μελών της Bcl-2 όπως των πρωτεϊνών Bim, Bid και Bad και/ή την καταστολή των αντι-αποπτωτικών μελών της Bcl-2 όπως την Bcl-2 και Bcl-xL. Η ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών μελών της

Bcl-2 οδηγεί στην ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bax/Bak οι οποίες διαταράσσουν το δυναμικό ισορροπίας της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Έτσι ελευθερώνονται το CytC αλλά και άλλες αποπτωτικές πρωτεΐνες που ενεργοποιούν την Κασπάση 9, που ενεργοποιεί την Κασπάση 3 που επάγει την απόπτωση του κυττάρου.

### **1.3.5. Ο ρόλος του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στη γλυκονεογένεση**

Τα γλυκοκορτικοειδή προάγουν τη γλυκονεογένεση μέσω επαγωγής της μεταγραφής γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που συμμετέχουν στη γλυκονεογένεση, όπως η καρβοξυκινάση του φωσφοένολο πυροσταφυλικού οξέος ( phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK ), η φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης ( G-6-Pase) και η 6-φωσφο-φρουκτοκινάση. Ακόμη επάγουν την πρωτεϊνική αποικοδόμηση και τη λιπόλυση στους σκελετικούς μύες και στο λιπώδη ιστό αντίστοιχα. Με την πρωτεϊνική αποικοδόμηση στους σκελετικούς μύες, τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν την απελευθέρωση αμινοξέων που χρησιμοποιούνται στη γλυκονεογένεση και χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα στο ήπαρ. Με την επαγωγή της λιπόλυσης αυξάνεται η απελευθέρωση γλυκερόλης και λιπαρών οξέων. Η γλυκερόλη αποτελεί πρόδρομο μόριο γλυκονεογένεσης και τα λιπαρά οξέα είναι αυτά που παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για την προώθηση της γλυκονεογενετικής οδού. Ακόμη, τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν ενδοκυτταρικούς διαβιβαστές όπως το κυκλικό AMP ( cAMP ) τα οποία προάγουν τη δράση της γλυκαγόνης και της αδρεναλίνης στο ήπαρ με αποτέλεσμα την αύξηση της γλυκονεογένεσης και τη γλυκογονόλυση. Τέλος τα γλυκοκορτικοειδή ανταγωνίζονται τις ηπατικές δράσεις της ινσουλίνης, οι οποίες είναι κατασταλτικές για τη γλυκονεογένεση ( Wang, 2015 ). Τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν τη μεταγραφή της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος (PEPCK), ενός ενζύμου που συμμετέχει στη γλυκονεογένεση. Τα γονίδιο της PEPCK έχει στοιχεία απόκρισης γλυκοκορτικοειδών στην περιοχή του προαγωγέα. Αυτό καθιστά το γονίδιο της PEPCK ως γονίδιο-στόχο για τον GR. Όταν τα γλυκοκορτικοειδή προσδεθούν στον GR και προκαλέσουν τη μετατόπιση του GR στον πυρήνα, αυτός προσδένεται άμεσα στα GREs του γονιδίου της PEPCK και επάγει τη μεταγραφή του, αυξάνοντας έτσι τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Για το λόγο αυτό, η χρόνια χρήση των γλυκοκορτικοειδών έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου της PEPCK από τον GR και επομένως την αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα, οδηγώντας σε υπεργλυκαιμία και την εμφάνιση του διαβήτη, που αποτελεί και μια από τις πιο συνήθεις παρενέργειες της χρόνιας χρήσης των γλυκοκορτικοειδών [( Raalte, 2009), ( Tan, 2015 )].

### **1.3.6. Ο GR ως θεραπευτικός στόχος για την αντιμετώπιση του διαβήτη**

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα, η χρόνια χορήγηση γλυκοκορτικοειδών σε ασθενείς επάγει την εμφάνιση πολλών παρενεργειών, μία εξ αυτών ο διαβήτης. Ο διαβήτης χαρακτηρίζεται από χρόνια υπεργλυκαιμία που προκύπτει από διαταραχές στην έκκριση της ινσουλίνης, στη δράση της ινσουλίνης ή και στα δύο. Τα χαμηλά επίπεδα ινσουλίνης, η ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη στους σκελετικούς μύες, στο λιπώδη ιστό και στο ήπαρ στο επίπεδο του υποδοχέα ινσουλίνης, οι διαταραχές στα συστήματα μεταγωγής σήματος, οι διαταραχές στα ενεργά ένζυμα και γονίδια είναι τα κυριότερα αίτια εμφάνισης του διαβήτη. Η σοβαρότητα των συμπτωμάτων οφείλεται στον τύπο και τη διάρκεια του διαβήτη. Ο διαβήτης διακρίνεται σε τύπο 1, τύπο 2, κύησης και άλλων ειδών ( Kharroubi, 2015 ). Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 αποτελεί μια διαταραχή του μεταβολισμού των γλυκολιπιδίων που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα γλυκόζης και λιπιδίων στο αίμα στα πλαίσια της ανθεκτικότητας στην ινσουλίνη και στη σχετική ανεπάρκεια ινσουλίνης ( Tan, 2014 ). Για την αντιμετώπιση του διαβήτη μέσω του GR έχουν προταθεί διάφορες φαρμακευτικές ρυθμίσεις της δράσης των γλυκοκορτικοειδών. Αρχικά προτάθηκε η ανάπτυξη ενώσεων με μειωμένο προφίλ μεταβολικών παρενεργειών διατηρώντας παράλληλα τα αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα των γλυκοκορτικοειδών. Αυτές οι ενώσεις ονομάζονται ενεργοποιητές διαχωρισμού GR και βασίζονται στο ότι οι μηχανισμοί των γλυκοκορτικοειδών που ενισχύουν τη γονιδιακή μεταγραφή ( trans activation ) διαφέρουν



από τους μηχανισμούς που αναστέλλουν τη γονιδιακή μεταγραφή ( trans repression ). Αυτό γιατί οι μηχανισμοί trans activation εμπλέκονται στις παρενέργειες της χρόνια χορήγησης γλυκοκορτικοειδών ενώ οι μηχανισμοί trans repression εμπλέκονται στις αντιφλεγμονώδεις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Έτσι οι ενεργοποιητές διαχωρισμού GR στοχεύουν στους μηχανισμούς trans repression με παράλληλη καταστολή των μηχανισμών trans activation αυξάνοντας έτσι τον θεραπευτικό δείκτη ( Raalte, 2009 ). Ένας άλλος στόχος είναι η 11-β-HSD ( 11-β-υδροξυστεροειδή αφυδρογονάση) τύπου 1 όπου μετατρέπει την ανενεργή κορτιζόνη σε ενεργή κορτιζόλη στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό. Η αναστολή του ενζύμου 11-β-HSD τύπου 1 αποτελεί μια ελπιδοφόρα θεραπευτική στρατηγική για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου 2, της αντίστασης στην ινσουλίνη, της παχυσαρκίας, των λιπιδικών διαταραχών, του μεταβολικού συνδρόμου και άλλων ασθενειών που προκαλούνται από τη χρόνια χορήγηση των γλυκοκορτικοειδών. Η κορτιζόλη αυξάνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα οδηγώντας στην παραγωγή γλυκόζης στο ήπαρ εμποδίζοντας παράλληλα την πρόσληψη και την απόρριψη της γλυκόζης στους μύες και στο λιπώδη ιστό. Έτσι η κορτιζόλη δρα ως ανταγωνιστής της δράσης της ινσουλίνης και η παραγωγή κορτιζόλης μέσω του ενζύμου 11-β-HSD τύπου 1 συμβάλλει στην ανοχή στην ινσουλίνη, στο διαβήτη τύπου 2 και σε καρδιαγγειακές νόσους. Η επιλεκτική παρεμπόδιση τους ενζύμου αυτού αποτελεί μια ελπιδοφόρα προσέγγιση για τη μείωση της συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα, την ανοχή στην ινσουλίνη, τη δυσλιπιδαιμία, την παχυσαρκία και τον διαβήτη τύπου 2 ( Sena, 2010 ).

### **1.3.7. Βιολογικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών και χρήση τους ως θεραπευτικό μέσο**

Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία της φλεγμονής, για ανοσολογικές και αλλεργικές διαταραχές, για εγκεφαλικά οιδήματα και για καρκίνο του αίματος ( Sundhal, 2015). Αποτελούν τα πιο διαδεδομένα φάρμακα λόγω της αντιφλεγμονώδους και ανοσολογικής δράσης τους. Τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή βέβαια σε αντίθεση με τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή είναι αυτά που χρησιμοποιούνται λόγω των αντιφλεγμονωδών χαρακτηριστικών τους. Έχουν μεγαλύτερη ισχύ δράσης, μπορούν και μεταβολίζονται πιο εύκολα από τον οργανισμό και δεν ρυθμίζουν μόνα τους τα επίπεδά τους στον οργανισμό επειδή αδυνατούν να συνδεθούν με την κορτικοστεροειδή σφαιρίνη του πλάσματος ( Oakley and Cidlowski, 2013). Οι κύριες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών σε ότι αφορά τη φλεγμονή, εντοπίζονται κυρίως, στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, ελαττώνουν την κυκλοφορία των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή των αντισωμάτων και παράλληλα ελαττώνουν τη δραστηριότητα των Τ-βοηθητικών και Τ-κυτταροτοξικών κυττάρων. Εκτός βέβαια από την ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση που έχουν τα γλυκοκορτικοειδή, συμμετέχουν και ρυθμίζουν πολλές και φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού καθώς και μεταβολικά μονοπάτια ( Oakley and Cidlowski, 2013 ). Αρχικά, παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, αυξάνοντας τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Στο ήπαρ, η αύξηση της κορτιζόλης, αυξάνει τα επίπεδα της γλυκόζης, επάγοντας τη γλυκονεογένεση.( Kleiman, 2007). Στους σκελετικούς μύες όμως η κορτιζόλη κάνει αντίθετη δουλειά, μειώνει την πρόσληψη και τη χρήση της γλυκόζης μέσω παρεμβολής του μονοπατιού της ινσουλίνης καθώς ανταγωνίζεται τη δράση της. Ακόμη προκαλεί χάλαση των μυών αυξάνοντας τον καταβολισμό και μειώνοντας τον αναβολισμό των πρωτεϊνών. Τα γλυκοκορτικοειδή επομένως αποτελούν τα πιο διαδεδομένα φάρμακα στην αγορά για ασθένειες οι οποίες μπορεί να είναι χρόνιας όπως, το άσθμα, οι δερματικές και οι οφθαλμολογικές μολύνσεις και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τις αλλεργίες, τη σήση, την πολλαπλή σκλήρυνση και τις ανεπάρκειες των επινεφριδίων ( Cidlowski, 2013).

### **1.3.8. Παρενέργειες από τη θεραπευτική αγωγή με γλυκοκορτικοειδή.**

Τα γλυκοκορτικοειδή, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία πολλών και διαφόρων ασθενειών. Ωστόσο, η χρόνια χρήση των γλυκοκορτικοειδών για φαρμακευτικό σκοπό έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφόρων παρενεργειών στον οργανισμό του ασθενή. Οι παρενέργειες αυτές είναι συνδεδεμένες, τόσο με την μακροχρόνια και υψηλή δόση των γλυκοκορτικοειδών που χορηγούνται, όσο και με την εμφάνιση της αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή ( Sundahl, 2015). Οι παρενέργειες αυτές που προκύπτουν από τη χρόνια χορήγηση των γλυκοκορτικοειδών εμφανίζονται σε πολλούς και διαφορετικούς ιστούς και όργανα του οργανισμού. Αρχικά, στο δέρμα μπορούν να προκαλέσουν ατροφία, φλεγμονή του δέρματος, εύθραυστο δέρμα ( Kleiman,2007) και αδυναμία επούλωσης των πληγών ( Sundahl,2015). Στο σκελετό και τους μύες έχει εμφανίσει ασθένειες όπως, οστεοπόρωση, μυϊκή αδυναμία και καθυστέρηση της ανάπτυξης στα παιδιά ( Kleiman,2007). Ακόμη είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση υπέρτασης, γλαυκώματος, καταρράκτη, παχυσαρκίας, πεπτικών ελκών και γαστρεντερικών αιμορραγιών (Sundahl, 2015). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι στις παρενέργειες που εμφανίζονται από τη χρόνια χρήση των γλυκοκορτικοειδών, συγκαταλέγονται και ο εκφυλισμός των νευρικών κυττάρων και η καταστολή της γένεσης νευρικών κυττάρων του εγκεφάλου ( Kleiman, 2007). Ωστόσο από τα πιο κύρια προβλήματα της χρόνιας χορήγησης των γλυκοκορτικοειδών είναι η αντίσταση στην ινσουλίνη, η αντίσταση στα ίδια τα γλυκοκορτικοειδή και η αύξηση της γλυκόζης στο αίμα, επάγοντας την εμφάνιση υπεργλυκαιμίας. Η χορήγηση των γλυκοκορτικοειδών αυξάνει την ηπατική γλυκονογένεση με πολλούς και διαφορετικούς μηχανισμούς και επηρεάζει σημαντικά άλλες ορμόνες που επάγουν τη γλυκονογένεση. Τα δύο αυτά προβλήματα καταλήγουν στο μείζον πρόβλημα της χρόνιας χορήγησης των γλυκοκορτικοειδών, που είναι η εμφάνιση διαβήτη ( Sundahl, 2015). Η σοβαρότητα λοιπόν, και η εμφάνιση των παρενεργειών αυτό εξαρτάται από συγκεκριμένους παράγοντες. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς είναι, ο χρόνος, η ποσότητα, η δοσολογία, τα ειδικά γλυκοκορτικοειδή που χορηγούνται και ο τρόπος εφαρμογής των γλυκοκορτικοειδών σε κάθε ασθενή ( Sundahl, 2015).

### **1.4. SEGRAs: Επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.**

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα, τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν τα πιο διαδεδομένα φάρμακα που χορηγούνται σε ασθενείς για τη θεραπεία της φλεγμονής και για την αντιμετώπιση πολλών και διαφορετικών ασθενειών. Η χρόνια όμως χρήση των γλυκοκορτικοειδών ως φάρμακο, έχει δείξει ότι οδηγεί σε εμφάνιση πολλών παρενεργειών όπως διαβήτη, οστεοπόρωση. Έτσι τα τελευταία χρόνια γίνονται πειράματα για την εύρεση προσδετών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που θα ενισχύσουν τις αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δράσεις τους αλλά παράλληλα θα μειώνουν και την εμφάνιση των παρενεργειών που προκαλεί η χρόνια χρήση των γλυκοκορτικοειδών. Επομένως, η ανάγκη για τη βελτιστοποίηση των προσδετών αυτών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με απώτερο σκοπό τη ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με πολύ ειδικό τρόπο, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών ( Selective glucocorticoid receptor agonists, SEGRAs ) και επιλεκτικών ρυθμιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών ( Selective glucocorticoid receptor modulators, SEGRMs ) ( Sundahl, 2015). Τα SEGRAs αλλάζουν τη διαμόρφωση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρά περισσότερο με πρωτεΐνες και όχι με DNA, ενεργοποιώντας έτσι διαδικασίες που μεσολαβούν σε πολλά επιθυμητά αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτικά μονοπάτια μέσω αρνητικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης των προ φλεγμονωδών γονιδίων. Παράλληλα, η ενεργοποίηση συγκεκριμένων μονοπατιών που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση των παρενεργειών ελαττώνονται αισθητά (Schacke, 2007). Όπως φαίνεται, τα τελευταία χρόνια, η χρήση των SEGRAs σε πειράματα έχει αυξηθεί, γεγονός ευχάριστο, καθώς η χρήση επιλεκτικών προσδετών και ρυθμιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών για την αντιμετώπιση της φλεγμονής θα αυξήσει τα επιθυμητά αποτελέσματα και παράλληλα θα μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης παρενεργειών.

## 1.5. Τα τριτερπένια: Γενικές πληροφορίες και εν δυνάμει αντικαρκινικοί παράγοντες

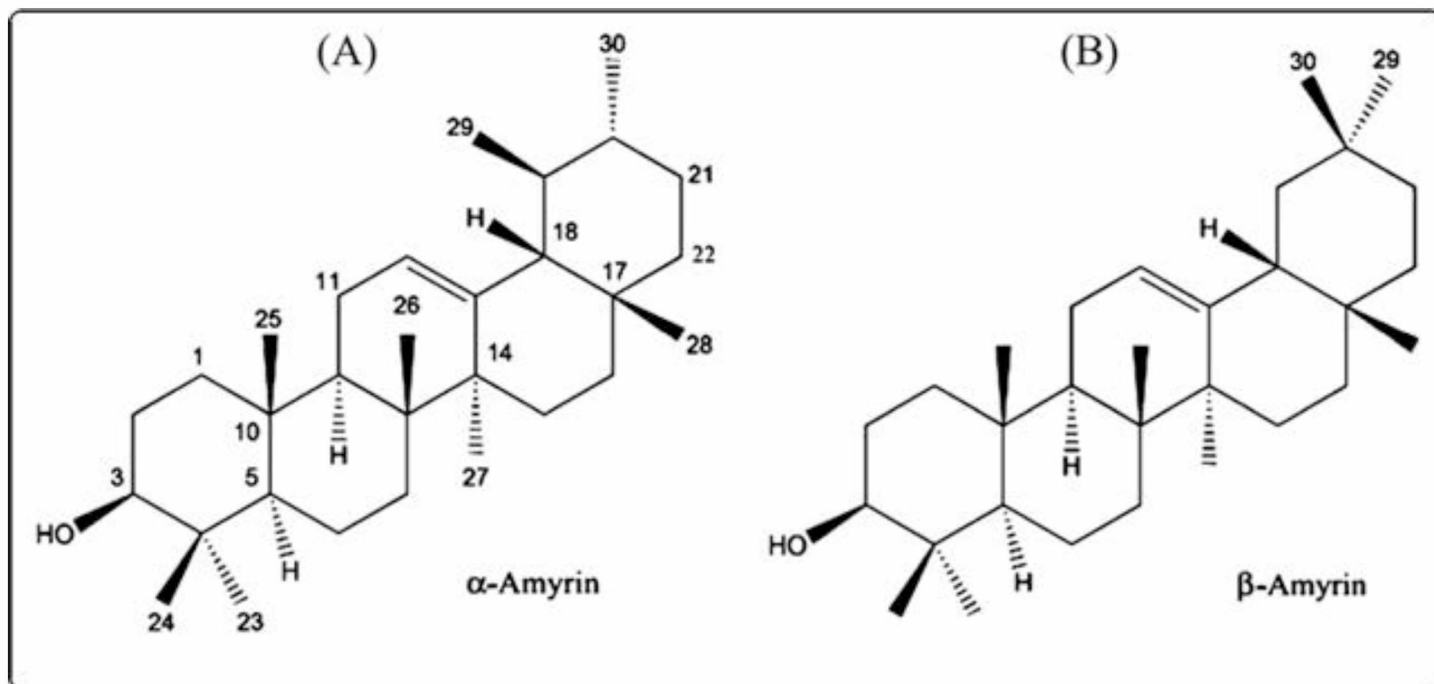
Τα τριτερπενοειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και μπορούν να βρεθούν σε μύκητες, σε φτέρες, σε μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά, σε ζώα και σε θαλάσσιους οργανισμούς. Περιλαμβάνουν μια μεγάλη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών με περισσότερους από 100 σκελετούς ανά άνθρακα. Το απλούστερο τριτερπένιο, βάση αυτού σχηματίζονται τα υπόλοιπα τριτερπενοειδή, είναι το σκουαλένιο ( C<sub>30</sub> ). Μια σημαντική υπομονάδα των τερπενίων είναι τα τριτερπένια. Τα τριτερπένια στα φυτά αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των κυτταρικών μεμβρανών και των στεροειδών ορμονών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, τα απλά τριτερπένια α- και β-αμυρίνη, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι είναι βασικά συστατικά κατά την αύξηση και την ανάπτυξη των σπορίων των φυτών. Επιπλέον, τα τριτερπένια παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών από παθογόνες καταστάσεις. Πολλά τριτερπενοειδή, όπως το ουρσολικό οξύ, το ολεανολικό οξύ, το βετουλινικό οξύ, η κελαστερόλη και η λουπεόλη, έχουν εξαιρετικές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιδιαβητικές ιδιότητες και έχουν προταθεί και ως δυνητικά αντικαρκινικά φάρμακα. Η αντικαρκινική τους δράση μετράτε με την ικανότητά τους να εμποδίζουν την ενεργοποίηση του NF-κΒ, να επάγουν την απόπτωση, να αναστέλλουν τους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, να αναστέλλουν την αγγειογένεση, να προκαλούν μιτοχονδριακές και να ρυθμίζουν την έκφραση των MDR γονιδίων και πρωτεϊνών. Στην επαγωγή της απόπτωσης από τα τριτερπενοειδή εμπλέκονται διάφοροι μηχανισμοί, με σημαντικότερο όμως αυτόν της καταστολής της έκφρασης του Bcl-2 γονιδίου και την επαγωγή της κασπάσης 3. Επίσης μπορούν να επάγουν την απόπτωση μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού ή μέσω της ενίσχυσης του παράγοντα νέκρωσης όγκων ( Tumor necrosis factor, TNF ), Υπό εξέταση, επίσης, βρίσκεται και τα τελευταία χρόνια ένα νέο μονοπάτι επαγωγής απόπτωσης που βασίζεται στην καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της τελομεράσης hTERT και επομένως την αναστολή της δράσης της αντίστοιχης τρανσφεράσης των τελομερών. Εκτός από αντικαρκινικές δράσεις στα τριτερπένια έχουν αποδοθεί αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αναλγητικές, αντι - ικές, αντιμυκητιακές, ανοσορυθμιστικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες. Ωστόσο, η αιμολυτική και κυτταροστατική δράση πολλών τερπενίων έχει περιορίσει δραματικά τη φαρμακευτική τους χρήση και έχει στρέψει το ενδιαφέρον στην τροποποίησή τους με τη βοήθεια χημικών και βιοτεχνολογικών τεχνικών. Τέλος, αποτελούν ικρίωμα για τη σύνθεση πολλών νέων χημικών σκευασμάτων, γεγονός που αποδίδεται στον ομοιογενή ανθρακικό τους σκελετό ( Yan, 2014).

### 1.5.1. Οι αμυρίνες: Δομή-Βιοσύνθεση και βιολογική δράση

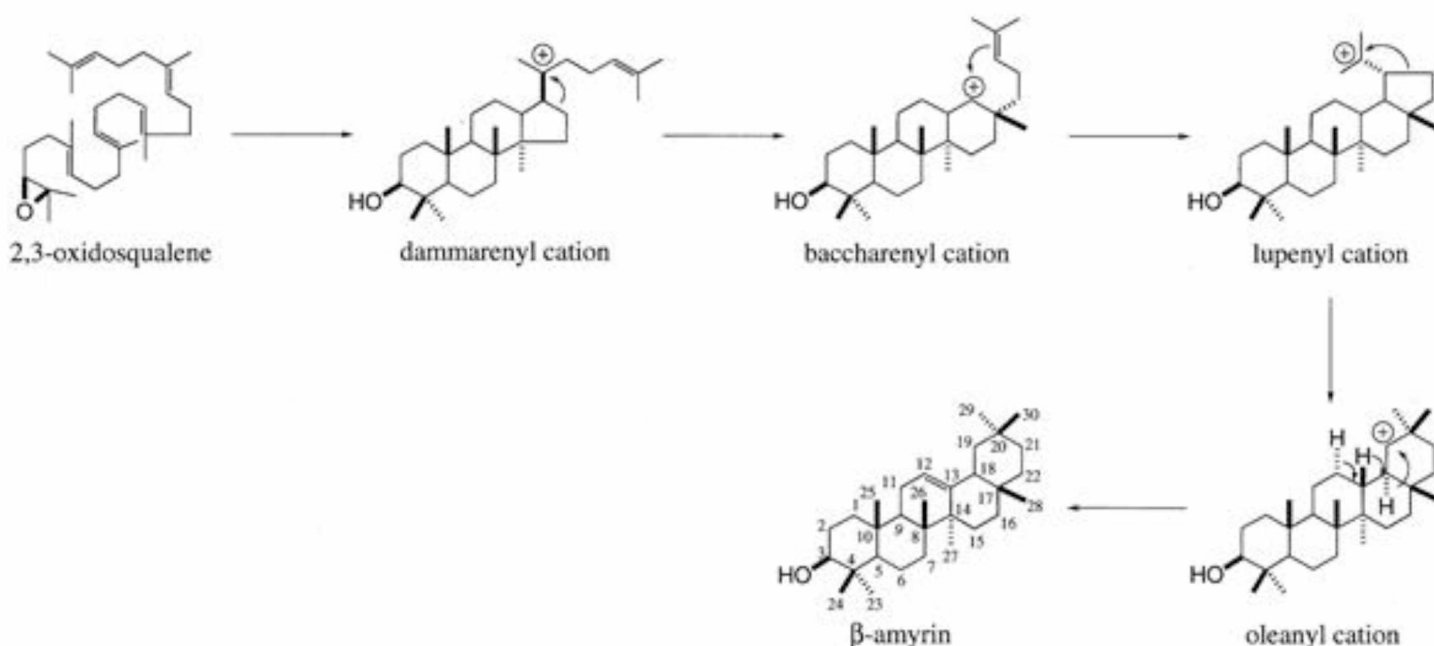
Χημικές έρευνες έχουν δείξει την παρουσία ενός πεντακυκλικού τριτερπενίου, των α- και β-αμυρινών, ως κύριο συστατικό της ρητίνης. Φαρμακευτικές μελέτες έχουν δείξει επίσης, τις αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιπυρετικές, γαστροπροστατευτικές και ηπατοπροστατευτικές επιδράσεις των αμυρινών σε μη τοξικές δόσεις που κυμαίνονται από 10-100 mg/kg ( Santos, 2012). Οι α- και β-αμυρίνες αποτελούνται από τριτερπένια που ανήκουν στην ομάδα της ουρσάλης και της ολεανάνης αντίστοιχα. Η β-αμυρίνη σχηματίζεται από το σκουαλένιο με εξάλειψη ενός πρωτονίου από τον άνθρακα 12 ( C<sub>12</sub>) και με ταυτόχρονη μεταφορά ιόντων υδροδίου από τον άνθρακα 13 ( C<sub>13</sub>) στον άνθρακα 18 ( C<sub>18</sub>) και από τον άνθρακα 18 ( C<sub>18</sub>) στον άνθρακα 19 ( C<sub>19</sub>) ( Rees, 1966). Θεωρείται ότι, η β-αμυρίνη δρα ως ένα πρόδρομο μόριο για το ολεανολικό οξύ και συνδέεται με την παραγωγή της ολεανόλης. Συντίθεται εντός της ισοπρενοειδούς οδού με την κυκλοποίηση του 2-3-οξειδοσκουαλενίου, καταλύομενη από τη συνθετάση της β-αμυρίνης ( οξειδοσκουαλενική κυκλάση, OSC ) ( Shibuya, 2009). Τα φυτά μετατρέπουν το 2-3-οξειδοσκουαλένιο σε προϊόντα κυκλοποίησης που μοιάζουν με στερόλες όπως το τριτερπένιο β-αμυρίνη. Η λειτουργία της β-αμυρίνης είναι ακόμα άγνωστη ωστόσο γνωρίζουμε ότι χρησιμεύει ως ενδιάμεσο στη σύνθεση πιο σύνθετων τριτερπενικών γλυκοζιτών που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών ( Kemen, 2014 ). Η α- και β-αμυρίνη που ανήκουν στην ομάδα της ουρσάλης και της ολεανάνης, έχουν χημική δομή παρόμοια με τη δομή μια στεροειδούς ορμόνης και είναι εξαιρετικά χρήσιμες στην πρόληψη ή και στη θεραπεία πολλών ασθενειών σε

πειραματόζωα, ειδικά σε αυτές που το οξειδωτικό και φλεγμονώδες στρες παίζουν βασικό ρόλο στην παθολόγηση ( Santos, 2012 ).

Η α-αμυρίνη είναι πεντακυκλικό τριτερπένιο με χημική δομή 3β-υδροξυ-ουρσ-12-εν-3-ολη και χημικό τύπο C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O. Απομονώνεται από διάφορες πηγές και κυρίως από φυτικές ρητίνες. Σημαντικές ποσότητες της α-αμυρίνης ( έως και g/kg ) είναι διαθέσιμες από τις ρητίνες των ειδών *Bursera* και *Protium* της οικογένειας Burseraceae. Άλλες γνωστές πηγές είναι το Μεξικάνικο κοπάδι ( 5 g/kg ), το *Cassia obtusifolia* ( 140 mg/kg ) και το *Commiphora holtziana* ( 200 mg/kg ) ( Vasquez, 2012 ). Η α-αμυρίνη προέρχεται από την μετατροπή του 2-3-οξυδοσκουαλενίου μέσω του εποξειδίου, όπως στη β-αμυρίνη αλλά σε αυτήν την περίπτωση έχουμε μετανάστευση ενός μεθυλενίου. ( Nes, 1968 ). Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η α-αμυρίνη παρουσιάζει συστηματικές αντιφλεγμονώδεις, αντιπυρετικές, γαστροπροστατευτικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες. Οι μηχανισμοί δράσης της α-αμυρίνης πραγματοποιούνται μέσω αναστολής των εξαρτώμενων από πρωτεϊνική κινάση A, από cAMP κινάση και από πρωτεϊνική κινάση C μονοπατιών ( Medeiros, 2007)



**Εικόνα 1.13.** Χημικές δομές των (Α) α-αμυρίνης και (Β) β-αμυρίνης.



**Εικόνα 1.14.** Ο μηχανισμός κυκλοποίησης του 2-3-οξειδοσκουαλενίου σε β-αμυρίνη. (Kushiro, 1998).



## 2. Σκοπός

Τα γλυκοκορτικοειδή όπως έχει αναφερθεί, ασκούν τις βιολογικές τους δράσεις μέσω πρόσδεσής τους στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως για τη ρύθμιση των επιπέδων τη γλυκόζης και για τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις τους. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί πως η χρόνια χορήγηση γλυκοκορτικοειδών εμφανίζει πολλές παρενέργειες στους ασθενείς. Η ανάγκη της αύξησης της αντιφλεγμονώδης δράσης με παράλληλη μείωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών, είχε ως αποτέλεσμα την εύρεση εκλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ( SEGRAs ). Τα SEGRAs δρουν παρόμοια με τα γλυκοκορτικοειδή ελαττώνοντας όμως τις ανεπιθύμητες παρενέργειες. Σκοπός της παρούσας διπλωματική εργασίας ήταν η διερεύνηση της στεροειδικής δράσης των α-αμυρινών στην πυρηνική μετατόπιση του GR αλλά και σε σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται από τον GR. Πιο συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η επαγωγή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τις α-αμυρίνες αλλά και η επίδραση αυτών στη γλυκονεογένεση, μέσω του γλυκονεογενετικού ενζύμου PEPCK και στην επαγόμενη από τον GR απόπτωση, μέσω των γονιδίων για το προ-αποπτωτικό μόριο BAX, για το αντι-αποπτωτικό μόριο Bcl-2 και για τα πρωτεολυτικά ένζυμα προ-κασπάση 9 και προ-κασπάση 3, με Western blot ανάλυση. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά HeLa.

### 3. Υλικά και μέθοδοι

#### 3.1. Υλικά

Παρακάτω, αναφέρονται τα υλικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας, καθώς και οι εταιρίες αυτών από τις οποίες προέρχονται. Τα αντιδραστήρια που βρίσκονται με αστερίσκο (\*) χρησιμοποιήθηκαν στις διαδικασίες των κυτταροκαλλιιεργειών.

#### 3.1.1. Αντιδραστήρια

##### 3.1.1.1. Χημικά αντιδραστήρια

- ✚ Ammonium Persulfate (APS) (Sigma)
- ✚ Bradford protein assay (Bio-rad)
- ✚ Bovine Serum Albumin (BSA) (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)
- ✚ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)
- ✚ L-Glutamine (Life Technologies - Invitrogen) \*
- ✚ Lipofectamine® 2000 (Life Technologies - Invitrogen) \*
- ✚ MitoTracker® Red CMXRos (CMX) (Molecular Probes Inc)
- ✚ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)
- ✚ NaCl (Panreac)
- ✚ NaHCO<sub>3</sub> (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 )
- ✚ Γλυκίνη ( AppliChem )
- ✚ Ισοπροπανόλη ( Scharlau )
- ✚ Κυανούν της βρωμοφαινόλης ( Research Organics )
- ✚ Μάρτυρας μοριακών μεγεθών ( ThermoScientific Fermentas )
- ✚ Μεθανόλη ( Merck )
- ✚ Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Whatman ( Protan )
- ✚ Πενικιλίνη – Στρεπτομυκίνη ( Invitrogen )
- ✚ Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων 5x ή Lysis Buffer 5x ( Promega ) \*

### 3.1.1.2. Θρεπτικά υλικά

- ✚ Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® (Life Technologies - Invitrogen) \*

### 3.1.2. Αντισώματα

#### 3.1.2.1. Πρωτογενή αντισώματα

- ✚ Αντίσωμα β-ακτίνης από ποντικό ( Sigma )
- ✚ Αντίσωμα PEPCK H-300 από κόνικλο ( Santa Cruz ), με τον επίτοπο να αναγνωρίζει την ελαφριά αλυσίδα
- ✚ Αντίσωμα κασπάσης 9 από ποντικό ( Cell Signaling )
- ✚ Αντίσωμα Bcl-2 από κόνικλο ( Cell Signaling )
- ✚ Αντίσωμα κασπάσης 3 από κόνικλο ( Abcam )
- ✚ Αντίσωμα α-tubulin από κόνικλο
- ✚ Αντίσωμα BAX από κόνικλο
- ✚ Αντίσωμα GR H-300 από κόνικλο

#### 3.1.2.2. Δευτερογενή αντισώματα

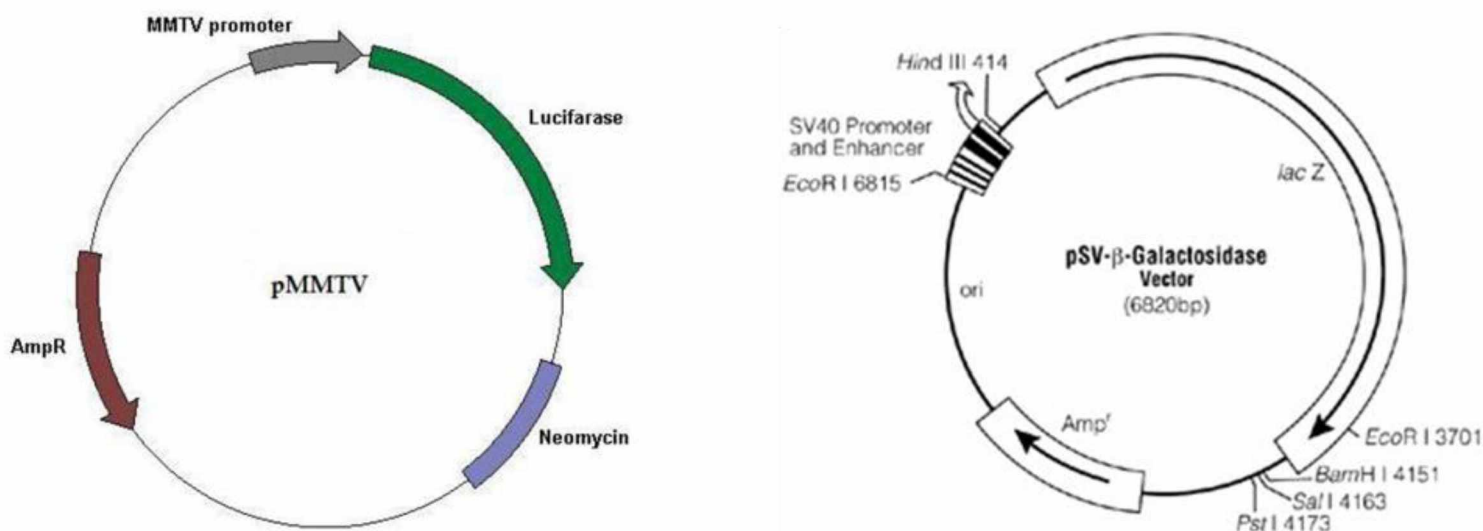
- ✚ Αντίσωμα για mouse IgG-HRP
- ✚ Αντίσωμα για rabbit IgG-HRP

### 3.1.3. Βακτηριακά στελέχη

Χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια *Escherichia Coli* στελέχους DH5α™ (Life Technologies - Invitrogen), ο γονότυπος των οποίων περιγράφεται στους Sambrook et al ( 1989 ).

### 3.1.4. Πλασμιδιακοί φορείς

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



**Εικόνα 3.1.** Μοριακές κατασκευές των πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία της διαμόλυνσης των καρκινικών κυτταρικών σειρών HeLa. (α) πλασμιδιακός φορέας pMMTV-GRE-Luc και (β) πλασμιδιακός φορέας pSV40-β-Gal με το γονίδιο β-Gal.

### 3.1.5. Διαλύματα

#### ✚ Dexamethasone ( Dex ) :

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

#### ✚ PMSF 200mM :

Για την παρασκευή 2ml PMSF 200mM, διαλύονται 0,07gr PMSF σε 2 ml ισοπροπανόλης. Γίνεται ο διαμοιρασμός τους σε αλιμωts των 200μl και αποθηκεύονται στους -20°C. Με αραιώση 10% σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20mM.

#### ✚ Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων ( Sonication Buffer ) :

Αποτελείται από 20mM Tris pH 7.5, 0.5% Triton-X-100, 250mM NaCl και 3mM EDTA και αποθηκεύεται στους 4 °C. Σε 1ml από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 0,5μL PMSF 20mM ( 20 °C ) και 2μl DTT 1M ( 20 °C ). Η DTT χρησιμεύει ως αναγωγικός παράγοντας.

#### ✚ Διάλυμα Bradford :

Stock 5x. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1x αραιωμένο με ddH<sub>2</sub>O. Η αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford είναι 1:1000.

#### ✚ Sample Buffer 4x :

Αποτελείται από 1M Tris pH 6.8, 10% γλυκερόλη , 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% Κυανούν της βρωμοφαινόλης και αποθηκεύεται στους -20°C. Η β-μερκαπτοαιθανόλη αναγάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και καταργεί την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών.

#### ✚ Tris 20mM pH 7.5 :

Σε πλαστικό σωληνάριο τύπου Eppendorf ( 1,5ml ) αναμειγνύονται 20μl stock διαλύματος Tris 1M pH 7.5 ( 4 °C ) με 980 μl ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

#### ✚ Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 :

Για την παρασκευή 0,2L διαλύματος ζυγίζονται 36,342gr Tris, τα οποία διαλύονται σε dH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 12M και συμπληρώνεται ο όγκος με dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.

#### ✚ TEMED :

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

#### ✚ APS 10 % :

Παρασκευάζεται διαλύοντας 100mg APS σε 1ml ddH<sub>2</sub>O. 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 170kDa και διαθέτει προσημασμένη με κόκκινο χρώμα τη ζώνη των 70kDa και με πράσινο χρώμα τη ζώνη των 10kDa. Οι πρωτεΐνες βρίσκονται σεσημασμένες σε διάλυμα που αποτελείται από 62,5mM Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ( pH 7.5 στους 25°C ), 1mM EDTA, 2% SDS, 10% mM DTT, 1mM NaN<sub>3</sub> και 33% γλυκερόλη. [ThermoFisher Scientific Inc., 2013].

#### ✚ Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ( Running Buffer) 10x :

Ζυγίζονται 30gr Tris base και 144gr γλυκίνης, τα οποία διαλύονται σε όγκο 1L ddH<sub>2</sub>O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. [Ornstein, 1964; Davis, 1964].



- ✚ Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ( Running Buffer ) 1x :  
Για την παρασκευή του Running Buffer 1x αραιώνονται 100ml Running Buffer 10x σε 900ml dH<sub>2</sub>O ( αναλογία 1:9 ). Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε αναλογία 0,1% [Laemmli, 1970]. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✚ Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς ( Transfer Buffer ) 10x :  
Αποτελείται από 10% Running Buffer 10x, 20% MetOH και 0.05% SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φόρτωσης αποθηκεύεται στους 4°C.
- ✚ Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς ( Transfer Buffer ) 1x :  
Για την παρασκευή 1L Transfer Buffer 1x χρειάζονται 695ml dH<sub>2</sub>O, 200ml MetOH, 100ml Running Buffer 10x και 5ml SDS 10%.
- ✚ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ( PBS ) 10x :  
Αποτελείται 2gr KCl, 80gr NaCl, 17.8gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και 2,4gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> και συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 900ml. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✚ Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1x :  
Το stock buffer PBS 10x αραιώνεται σε κατάλληλο όγκο dH<sub>2</sub>O ή ddH<sub>2</sub>O και προστίθεται Tween-20 σε αναλογία 1%.( 450ml dH<sub>2</sub>O, 50ml PBS 10x, 0,5-1ml Tween-20 ). Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✚ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου ( Sodium Phosphate buffer solution ) :  
Παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0,1M pH 7.5 με ανάμειξη κατάλληλων όγκων από τα stock διαλύματα μονοβασικού NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2M και διβασικού Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2M. Τα stock διαλύματα παρασκευάζονται με διαλύτη το H<sub>2</sub>O, κάνοντας τους κατάλληλους υπολογισμούς για τη μάζα της χημικής ένωσης που απαιτείται.
- ✚ Διάλυμα για εμφάνιση σήματος :  
Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα της Kodak. Αποτελείται από ένα διάλυμα ανάπτυξης σήματος ( Developer solution ) και ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος ( Fixer solution ). Το εκάστοτε διάλυμα παρασκευάζεται με ανάμειξη 1:3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα ( Developer ή Fixer ) σε dH<sub>2</sub>O. ( 45ml Developer/Fixer, 127.5ml dH<sub>2</sub>O ).

### 3.1.6. Οργανολογία

Τα όργανα και τα μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαθέσιμα στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας καθώς και στο δωμάτιο κυτταροκαλλιέργειών του τμήματος. Τα βασικότερα ήταν τα εξής :

- + Ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού ( LEICA DM 200 ), το οποίο φέρει ειδική ψηφιακή κάμερα ( DFC420C-234422307 ) συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή και πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας ( Leica Application Suite )
- + Αυτόματοι πιπεταδόροι τύπου Gilson ( 0.2μl – 2μl, 2μl – 20μl, 20μl – 200μl, 100μl – 1000μl )
- + Επωαστικός κλίβανος CO<sub>2</sub> (Galaxy 170S, New Brunswick)
- + Θάλαμος καθέτου νηματικής ροής ( Laminar flow hood ) μικροβιολογικής ασφάλειας επιπέδου II (TELSTAR AV-30/70)
- + Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας (Nuova, Thermolyne)
- + Θερμαντική πλάκα heat-block (Thermoleader)
- + Κάθετος αναδευτήρας (SB3 stuart®)
- + Κυκλομείκτες ( vortex )
- + Ξηρός κλίβανος (WTB binder)
- + Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad)
- + Συσκευή υπερήχων (water bath sonicator)
- + Υδατόλουτρο
- + Φυγόκεντροι (Centrifiger-BL II, Eppendorf Centrifuge 5810 Eppendorf microcentrifuge 5415 D)
- + Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους φωτός (U-1500 UV/Vis Spectrophotometer, Hitachi)

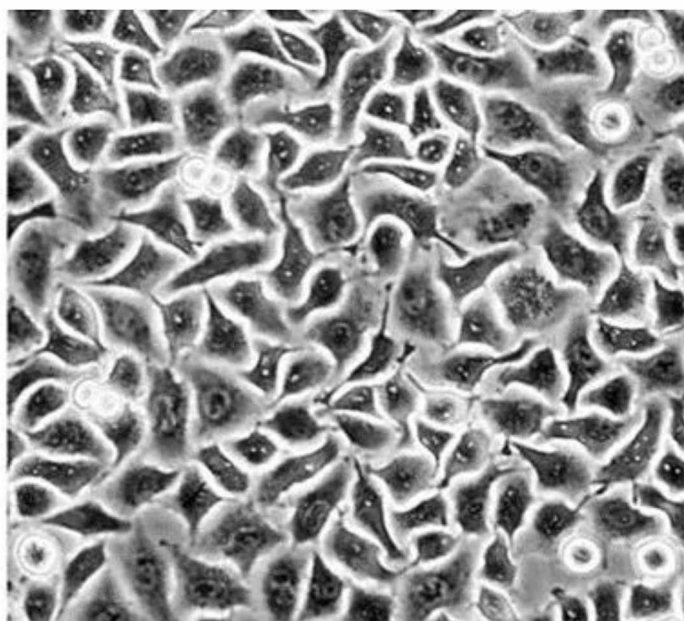
### 3.1.7. Αναλώσιμα

- + Σωληνάρια για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη ( cryovials ή cryotubes )
- + Ειδικές φιάλες για ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων ( Flasks ) ( μεγέθη T25, T75 )
- + Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι ( falcons ) ( 15ml, 50ml )
- + Πλαστικά σωληνάρια τύπου Eppendorf ( 1,5ml, 2ml )
- + Πιπέττες Serological ( 2, 5, 10, 25 ml )
- + Ρύγχι ( tips ) ( 0.2μl – 2μl, 2μl – 20μl, 20μl – 200μl, 100μl – 1000μl )
- + Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας ( well-plates ) με 6x και 24x wells
- + Καλυπτρίδες coverslips
- + Καλυπτρίδες φασματοφωτόμετρου
- + Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου

## 3.2. Μέθοδοι

### 3.2.1.Καρκινική κυτταρική σειρά HeLa

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην ανθρώπινη καρκινική σειρά HeLa. Η σειρά αυτή απομονώθηκε το 1951 από κύτταρα του τραχήλου της μήτρας, από μια ασθενή η οποία πέθανε από καρκίνο στον τράχηλο της μήτρας. Το όνομα της καρκινικής κυτταρικής σειράς HeLa, προέρχεται από τα αρχικά της ασθενούς από την οποία απομονώθηκαν τα κύτταρα, η οποία ονομαζόταν Henrietta Lacks. Πρώτη παρατήρηση αυτών των κυττάρων έγινε από τον ερευνητή George Gey, ο οποίος παρατήρησε ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα, σε αντίθεση με καλλιέργειες άλλων καρκινικών κυττάρων που πέθαιναν, παρέμεναν ζωντανά και συνέχιζαν να μεγαλώνουν με πολύ γρήγορους ρυθμούς. Για το λόγο αυτό, ο Gey, απομόνωσε ένα μόνο κύτταρο από το οποίο προέκυψε ολόκληρη κυτταρική σειρά. Η κυτταρική σειρά HeLa, αποτελεί την πρώτη ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά που απομονώθηκε και την πιο χρησιμοποιούμενη καθώς χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα για τη διεξαγωγή πολλών πειραμάτων. (Εικόνα 3.2.) [ ( Carson SD, 2013 ); ( Callaway, 2013 ); ( Callaway, 2013b ); ( O'Brien SJ, 2001 )].



**Εικόνα 3.2.** Ηλεκτρονική μικροσκόπηση καρκινικών κυττάρων HeLa. ( Carson SD,2013).

#### 3.2.1.1. Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα βρίσκονται αποθηκευμένα στους  $-80^{\circ}\text{C}$  ή σε υγρό άζωτο, μέσα σε ειδικά φιαλίδια τα οποία λέγονται cryonials ή cryotubes. Η απόψυξη των κυττάρων ξεκινάει στο υδατόλουτρο, το οποίο είναι ρυθμισμένο στους  $-37^{\circ}\text{C}$ . Όταν ξεπαγώσει το εσωτερικό του cryonial, το cryonial εισάγεται στον απαγωγό καθέτου νηματικής ροής. Το εσωτερικό του cryonial, δηλαδή το κυτταρικό εναιώρημα, μεταφέρεται πολύ γρήγορα σε έναν πλαστικό σωλήνα τύπου Falcon ( 15 ml), μαζί με 9 ml θρεπτικού και φυγοκεντρείται για 5min στα 1000rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Μόλις τελειώσει η φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται και το ίζημα που μένει επαναδιαλυτοποιείται με θρεπτικό DMEM παρουσία ερυθρού της φαινόλης ( Phenol Red ), υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη ( 4,5 mg/ml ) στο οποίο έχουν προστεθεί 1% v/v 200mM L-γλουταμίνη ( L-Glut ), 1% v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη ( P/S ) και 10% v/v FBS. Για την επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος, η ποσότητα του θρεπτικού DMEM που χρησιμοποιείται εξαρτάται από τη φλάσκα που θα χρησιμοποιήσουμε. Για την T25 φλάσκα ( φλάσκα επιφάνειας  $25\text{cm}^2$  ) χρησιμοποιούμε 5ml θρεπτικού DMEM ενώ για την T75 φλάσκα ( φλάσκα επιφάνειας  $75\text{cm}^2$  ) χρησιμοποιούνται 15ml θρεπτικού DMEM. Τέλος, τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστήρα, στους  $37^{\circ}\text{C}$  και υγρασία 5%  $\text{CO}_2$  και αφήνονται εκεί μέχρι να αναπτυχθούν σε ποσοστό 80-85% της επιφάνειας της φλάσκας ( confluency ). Το



χρονικό διάστημα που απαιτείται για να φτάσουν τα κύτταρα στο 80-85% της επιφάνειας της φλάσκας διαφέρει μεταξύ των κυτταρικών σειρών. Η ανάπτυξη των κυττάρων και η προσκόλλησή τους στον πάτο της φλάσκας απαιτεί περισσότερες από 24h. Σε περίπτωση που δεν έχει παρατηρηθεί το επιθυμητό confluency εντός 48h, τότε συνίσταται η άμεση αλλαγή του θρεπτικού μέσου.

### **3.2.1.2. Θρυψινοποίηση των κυττάρων**

Όταν το ποσοστό πληρότητας της επιφάνειας της φλάσκας φτάσει στο 80-85%, τότε πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των κυττάρων με χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων. Αρχικά αφαιρείται όλη η ποσότητα του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας ( DMEM ) και προστίθεται ποσότητα διαλύματος θρυψίνης-EDTA 0,25%. Τα κύτταρα με τη θρυψίνη επιστρέφονται πίσω στον επωαστήρα μέχρι να δράσει η θρυψίνη. Η ποσότητα της θρυψίνης που προστίθεται εξαρτάται από το μέγεθος της φλάσκας και το χρονικό διάστημα που αφήνεται να δράσει η θρυψίνη εξαρτάται από το πόσο γρήγορα θα παρατηρηθεί η αποκόλληση των κυττάρων από τον πάτο της φλάσκας. Μόλις παρατηρηθεί η αποκόλληση των κυττάρων, ακολουθεί η αδρανοποίηση της θρυψίνης με προσθήκη θρεπτικού με αναλογία όγκου θρεπτικού μέσου προς διάλυμα θρυψίνης 5:1. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε Falcon και φυγοκεντρείται για 5min στα 1000rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο διάλυμα απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με προσθήκη θρεπτικού μέσου καλλιέργειας DMEM. Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων που επιστρέφεται στη φλάσκα είναι 1/20 για τη φλάσκα T25 και 1/10 για τη φλάσκα T75. Η φλάσκα επιστρέφεται στον επωαστήρα και αφήνεται για να επωαστούν τα κύτταρα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται περίπου δυο φορές την εβδομάδα ανάλογα με το χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων. Μετά από κάθε θρυψινοποίηση, ο αριθμός του περάσματος ( passage ) των κυττάρων αυξάνεται κατά ένα. Το passage και η ημερομηνία που πραγματοποιήθηκε η θρυψινοποίηση αναγράφονται στην επιφάνεια της φλάσκας.

### **3.2.1.3. Πάγωμα των κυττάρων**

Το πάγωμα των κυττάρων πραγματοποιείται μετά τις πρώτες θρυψινοποιήσεις, έτσι ώστε να υπάρχουν διαθέσιμα stock στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Μετά τη θρυψινοποίηση, το ίζημα των κυττάρων που μένει επαναδιαλυτοποιείται σε κατάλληλο όγκο FBS. Σε κάθε cryovial προστίθεται τόσος όγκος FBS με κύτταρα και DMSO ώστε η αναλογία του όγκου του FBS με τα κύτταρα και του DMSO να είναι 9:1. Έτσι σύμφωνα με αυτήν την αναλογία, προστίθεται 0,9ml FBS με κύτταρα και 0,1ml DMSO. Το DMSO χρησιμοποιείται ως κυτταροπροστατευτικός παράγοντας και αμέσως μόλις προστεθεί στο cryovial, το ανακινούμε καλά και συνεχόμενα και το μεταφέρουμε και το αποθηκεύουμε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.1.4. Μέτρηση και στρώσιμο των κυττάρων**

Το μέτρηση των κυττάρων γίνεται στο μικροσκόπιο με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου ( πλάκα Neubauer ). Η διαδικασία του μετρήματος των κυττάρων ξεκινάει με τη θρυψινοποίηση των κυττάρων σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρθηκε πιο πάνω. Μόλις επαναδιαλυτοποιηθεί το ίζημα με κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου, μια πολύ μικρή ποσότητα των κυττάρων μεταφέρεται σε ένα Eppendorf. Με μια πιπέττα, γίνεται η λήψη 10μl του κυτταρικού εναιωρήματος και μεταφορά των κυττάρων στην πλάκα Neubauer για το μέτρηση. Το μέτρηση γίνεται με τη μέτρηση στο μικροσκόπιο των ζωντανών κυττάρων στα τέσσερα τεταρτημόρια και υπολογίζεται ο μέσος όρος του αριθμού των ζωντανών κυττάρων στα τέσσερα αυτά τεταρτημόρια. Ο αριθμός που προκύπτει αντιστοιχεί στα 10μl επομένως γίνεται αναγωγή του αριθμού των ζωντανών κυττάρων ανά mL. Έτσι με βάση τον αριθμό των wells που χρειάζονται για το πείραμα, γίνεται ο υπολογισμός του όγκου του κυτταρικού εναιωρήματος που θα χρησιμοποιηθεί. Ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων που είναι διαθέσιμα στην καλλιέργεια, διαιρείται με τον αριθμό των κυττάρων που χρειάζονται για



το πείραμα, δίνοντας έτσι την ποσότητα της αρχικής καλλιέργειας που απαιτείται για το πείραμα. Η ποσότητα αυτή φυγοκεντρείται για 5min στα 1000rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα που μένει επαναδιαλυτοποιείται με κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου, στο οποίο θα αναπτυχθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια ακολουθεί ένα παράδειγμα που συνοψίζει όσα περιγράφηκαν σε αυτήν την ενότητα.

Έστω σε ένα 24 wells/plate θέλουμε να στρώσουμε 50.000 κύτταρα σε 24 wells. Τα ζωντανά κύτταρα στα τέσσερα τεταρτημόρια βρέθηκαν πως είναι :  $99+71+83+85 = 338$ . Άρα ο μέσος όρος ισούται με  $338/4 = 84,5$  cells/10μl. Άρα για 1ml ισχύει :  $84,5 \times 10.000 = 845.000$  cells. Εμείς θέλουμε για το πείραμα  $50.000 \text{ cells} \times 24 \text{ well} = 1.200.000$  cells. Άρα φυγοκεντρούμε  $1.200.000/845.000 = 1,42$  ml αρχικής καλλιέργειας. Το ίζημα που θα προκύψει επαναδιαλυτοποιείται με  $0,5\text{ml} \times 24 \text{ well} = 12$  ml κατάλληλου θρεπτικού μέσου.

### **3.2.1.5. Ανοσοιστοχημεία**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση βιολογικών μορίων μέσα σε μια κυτταρική καλλιέργεια. Βασίζεται στη χημική συγγένεια και σύνδεση του αντιγόνου με το αντίστοιχο αντίσωμα και στην ανάπτυξη μεθόδων ανίχνευσης του αντισώματος. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για να διαπιστωθεί κατά πόσο τα παράγωγα των αμυρινών μπορούν να επάγουν τη μετατόπιση του GR στον πυρήνα.

Αρχικά σε ένα 24x well/plate τοποθετήθηκαν 5 καλυπτρίδες ( coverslips ) σε 5 wells ( ένα coverslip/well ). Ακολούθησαν 2 πλύσεις των 5 wells με 70% EtOH και έκθεσή τους σε UV ακτινοβολία για 30min έτσι ώστε να αποστειρωθούν οι καλυπτρίδες. Αφού πέρασαν τα 30min, το plate τοποθετήθηκε στον κλίβανο μέχρι να το χρησιμοποιήσουμε.

Τριτερπένια
TFC1038
TFC1039
TFC1040

**Πίνακας 1.** Τριτερπένια που χρησιμοποιήθηκαν

#### **Πειραματική διαδικασία:**

##### **Ημέρα 0:**

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση και μετά μέτρηση των κυττάρων. Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν 10.000cells/well. Άρα  $10.000\text{cells} \times 5\text{wells} = 50.000\text{cells}$ . Το ίζημα που προέκυψε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε DMEM-cis ( 0,5ml/well ) και ακολούθησε ισόποση κατανομή του διαλύματος με τα κύτταρα στα wells που είχαν προστεθεί οι καλυπτρίδες. Το plate τοποθετήθηκε πίσω στον κλίβανο για επώαση

##### **Ημέρα 3:**

Πραγματοποιήθηκε προσθήκη ουσιών στις καλυπτρίδες. Αρχικά παρασκευάστηκαν τα παρακάτω δείγματα.

Mix:  $0.25 \times 5 = 1.25$  DMEM-cis + 0.8μl CMX 200nM (1:5.000)

Control: 250μl Mix + 0.25μl 100% EtOH + 0.25μl DMSO

DEX: 250μl Mix + 0.25μl DEX  $10^{-3}$  + 0.25μl DMSO

Δείγματα με τριτερπένια: 250μl Mix + 0,25μl 100% EtOH + 0,25μl υπό εξέταση τριτερπένιο.

Στη συνέχεια απομακρύνεται το θρεπτικό που υπήρχε μέσα στα wells και προστίθεται 250μl κάθε δείγματος σε κάθε well αντίστοιχα. Το plate τοποθετείται στον κλίβανο και τα κύτταρα επωάζονται για 2h με τις ουσίες.



Εικόνα 3.3. 24well/plate μετά την προσθήκη των δειγμάτων

Εδώ αξίζει να δώσουμε κάποιες διευκρινίσεις για τη σύσταση των δειγμάτων. Αρχικά, το DEX είναι το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη, το οποίο προσδένεται στον GR και προκαλεί την μετατόπισή του στον πυρήνα, επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων των γλυκοκορτικοειδών. Η DEX αποθηκεύεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , διαλυμένη σε 100% EtOH σε συγκέντρωση 1mM. Στα πειράματα η τελική συγκέντρωση είναι 1μM. Στη συνέχεια, οι ουσίες όπως είπαμε είναι διαλυμένες σε DMSO και αποθηκεύονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  σε συγκέντρωση 10mM και χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 10μM. Το CMXR0S ( CMX ) αποτελεί μια ζωτική χρωστική, η οποία έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται μόνο στα βιολογικά ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων. Το CMX αποθηκεύεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  σε συγκέντρωση 1mM και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 200nM.

Μετά τις 2h το plate μεταφέρθηκε στον πάγκο του εργαστηρίου, έτσι ώστε να εφαρμοστεί το πρωτόκολλο μονιμοποίησης των κυττάρων. Αρχικά, αφαιρούνται οι ουσίες από τα πηγαδάκια και γίνονται δυο πλύσεις με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS 1x ( 450ml ddH<sub>2</sub>O + 50ml PBS 10x ). Μετά τις πλύσεις προστίθεται μεθανόλη και το plate αφήνεται για 20min στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Μετά τα 20min, η μεθανόλη αφαιρείται και προστίθεται ακετόνη και το plate αφήνεται για 2min στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Μετά τα 2min, αφαιρείται η ακετόνη και προστίθεται παγωμένο και αποστειρωμένο PBS 1x και το plate αφήνεται για 1h στους  $4^{\circ}\text{C}$ . Μετά από 1h το PBS αφαιρείται και ακολουθούν δύο πλύσεις με PBS 1x. Οι πλύσεις αυτές έχουν ως στόχο την όσο το δυνατόν πιο καλή αφαίρεση της ακετόνης γιατί η ακετόνη προκαλεί διάβρωση του plate και δυσκολεύει την αποκόλληση των καλυπτρίδων. Μετά την τελευταία πλύση με PBS 1x οι καλυπτρίδες απομακρύνονται από τα wells και τοποθετούνται στο δικτυωτό. Στο σημείο αυτό, προστίθεται το πρώτο αντίσωμα, το οποίο είναι αντίσωμα έναντι του GR. Έγινε χρήση του GR-H300 σε αραιώση 1/50 ( GR-H300/PBST ). Στην επιφάνεια κάθε καλυπτρίδας γίνεται απόχυση 25-30μl αντισώματος και επωάζεται για 1h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη 1h, κάθε καλυπτρίδα ξεπλένεται με PBS 1x για να απομακρυνθεί η περίσσεια αντισώματος και ακουμπάμε την άκρη κάθε καλυπτρίδας με ένα χαρτί. Στη συνέχεια γίνεται η προσθήκη του δεύτερου αντισώματος που αποτελείται από 500μl PBST, 1μl Hoechst 33342 10mg/ml σε αραιώση 1/1000 ( χρωστική για χρώση των πυρήνων ) και 1 μl αντισώματος ( anti-Rabbit alexa488 ) σε αραιώση 1/500. Η χρωστική αυτή δίνει την πράσινη φθορίζουσα κατά την παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Η επώαση με το δεύτερο αντίσωμα γίνεται για 1h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη 1h, κάθε καλυπτρίδα ξεπλένεται με PBS 1x. Στη συνέχεια προστίθεται το διάλυμα PVA πάνω στις αντικειμενοφόρους πλάκες και



οι καλυπτρίδες μονιμοποιούνται πάνω στο PVA. Η φύλαξή τους γίνεται σε ειδικές κασετίνες, στους 4°C στο σκοτάδι. Μόλις στεγνώσει το PVA ( περίπου μια μέρα μετά ), τα δείγματα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο φθορισμού με δυνατότητα λήψης φωτογραφιών. Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το DM2000 της εταιρίας Leica και είναι εξοπλισμένο με Qimaging ορτίMOS κάμερα. Εδώ να τονίσουμε πως από τις ουσίες που μελετήσαμε, μόνο η TFC1039 και TFC1040 έδειξαν μετατόπιση του GR στον πυρήνα.

### **3.2.2. Western Blot Analysis**

#### **3.2.2.1. Προετοιμασία δειγμάτων**

**Ημέρα 0 :**

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση και μετά μέτρημα και στρώσιμο των κυττάρων σε δύο 6x well/plates. Σε κάθε well προστίθενται 150.000 cells διαλυτοποιημένα σε 2ml/well DMEM-cis και αφήνονται για επώαση στον κλίβανο για 2 ημέρες.

**Ημέρα 2 :**

Αφαιρείται το θρεπτικό από τα wells και προστίθενται οι υπό εξέταση ουσίες. Αρχικά, φτιάχνονται τα δύο mix από τα οποία θα προκύψουν οι συστάσεις των ουσιών μας.

Falcon I	Falcon II
9 ml DMEM-cis	9 ml DMEM-cis
9 μl DEX	9 μl EtOH

**Πίνακας 2:** Mix από τα οποία προκύπτουν οι συστάσεις των ουσιών

Η σύσταση των ουσιών θα είναι ως εξής :

<b>DEX</b>	<b>2ml Falcon I + 2μl DMSO</b>	<b>Control</b>	<b>2ml Falcon II + 2 μl DMSO</b>
<b>TFC1038 + DEX</b>	<b>2ml Falcon I + 2μl TFC1038</b>	<b>TFC1038 – DEX</b>	<b>2ml Falcon II + 2 μl TFC1038</b>
<b>TFC1039 + DEX</b>	<b>2ml Falcon I + 2μl TFC1039</b>	<b>TFC1039 – DEX</b>	<b>2ml Falcon II + 2 μl TFC1039</b>
<b>TFC1040 + DEX</b>	<b>2ml Falcon I + 2μl TFC1040</b>	<b>TFC1040 – DEX</b>	<b>2ml Falcon II + 2 μl TFC1040</b>

**Πίνακας 3:** Σύσταση των ουσιών



**Εικόνα 3.4.** 6x well/plate με τις ουσίες για την ανάλυση Western

### **3.2.2.2. Συλλογή των κυττάρων**

Μετά τις 48h, πραγματοποιείται η συλλογή των κυττάρων στους 4°C. Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό και γίνεται έκπλυση με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS 1x ( 1ml/well ). Στη συνέχεια απομακρύνεται το PBS 1x και προστίθεται η ίδια ποσότητα πάλι από PBS 1x. Με χρήση ειδικού scraper πραγματοποιείται η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων από τα wells και το κάθε δείγμα μεταφέρεται σε Falcon ( 15ml ) ή σε σωληνάρια τύπου Eppendorf ( 1,5ml ), τα οποία διατηρούνται στον πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία για όλα τα δείγματα. Στη συνέχεια προστίθενται επιπλέον 250μl PBS 1x σε κάθε well και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία ώστε να έχουμε τη συλλογή όλων των κυττάρων από τα wells. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των εναιωρημάτων για 5min, στα 1000rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80°C.

### **3.2.2.3. Λύση των κυττάρων**

Το ίζημα που αποθηκεύτηκε στους -80°C επαναδιαλυτοποιείται σε Lysis Buffer ( LB ) που αποτελείται από 20mM Tris pH 7.5, 0,5% Triton X-100, 250mM NaCl και 3ml EDTA. Αυτά αποτελούν το πρώτο buffer το οποίο φυλάσσεται στους 4°C. Σε 1ml αυτού του διαλύματος προστίθενται 10μl Protease Inhibitors 1/100, 2μl DTT 1M ( ως αναγωγικός παράγοντας ) και 0,5μl PMSF 20mM. Η ποσότητα Lysis Buffer που θα προστεθεί σε κάθε δείγμα εξαρτάται από την ποσότητα του ιζήματος των δειγμάτων. Συνήθως προστίθεται 50-70μl. Τα κύτταρα επωάζονται για 40min με το Lysis Buffer και όχι παραπάνω λόγω του PMSF.

### **3.2.2.4. Ομογενοποίηση των κυττάρων ( Sonication )**

Στο βήμα αυτό τα δείγματα υπόκεινται στη λύση των κυττάρων με εφαρμογή υπέρηχων με τη συσκευή υπέρηχων ( Sonicator ). Πραγματοποιούνται 3-4 επαναλήψεις διάρκειας 1sec με ενδιάμεσα διαλείμματα 45sec. Τα δείγματα διατηρούνται στον πάγο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.

### **3.2.2.5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford**

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford protein assay της Bio-Raid. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δείγματα στα οποία η πρωτεϊνική συγκέντρωση κυμαίνεται από 1μg/ml έως 1500μg/ml. Η μέθοδος Bradford είναι χρωματική μέθοδος που στηρίζεται στο εύρος των απορροφήσεων της χρωστικής Coomassie® Brilliant Blue G-250. Σε όξινες συνθήκες, η χρωστική αυτή αντιδρά με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών και δημιουργεί ένα σταθερό χρωμοφόρο σύμπλοκο πρωτεΐνης-χρωστικής. Η δέσμευση της χρωστικής στην πρωτεΐνη, σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής και το σύμπλοκο που δημιουργείται εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 595nm. Αύξηση της απορρόφησης στα 595nm υποδεικνύει αύξηση του ποσού της συνδεδεμένης χρωστικής και επομένως αύξηση στην περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνη. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, αρχικά κατασκευάζεται μια καμπύλη με την οποία γίνεται η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Για την κατασκευή της καμπύλης αυτής, χρησιμοποιείται μια σειρά πρότυπων διαλυμάτων πρωτεΐνης αλβουμίνης βόειου ορού ( Bovine Serum Albumin , BSA ) γνωστής συγκέντρωσης. Σε όγκο 20μl από το εκάστοτε δείγμα προστίθενται 980μl αντιδραστηρίου Bradford 1x. Τα διαλύματα αυτά αναδεύτηκαν καλά με vortex και επώστηκαν για 30min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου ( χρόνος επώσης 5-60min, χρονικό όριο ανάπτυξης χρώματος ). Μετά τα 30min τα διαλύματα αναδεύτηκαν καλά με vortex και φασματοφωτομετρήθηκαν στα 595nm. Στον πίνακα 3 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης BSA.



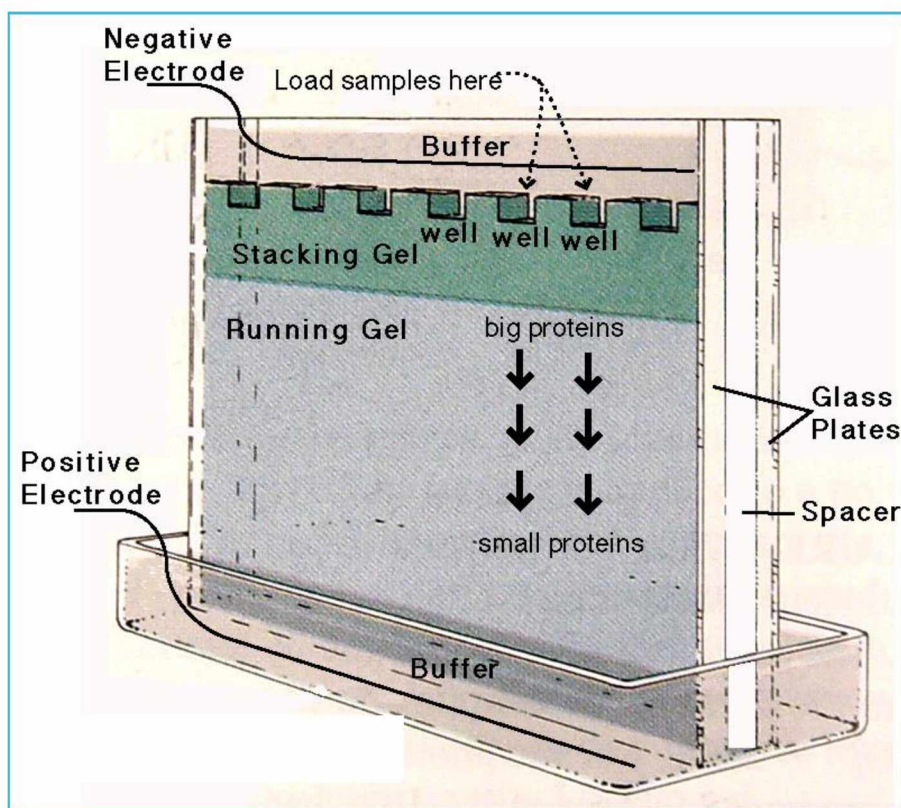
BSA 1mg/ml (μl)	Tris 10mM pH7,4 (μl)	Αντιδραστήριο Brandford 1x (μl)	BSA (μg)	BSA (μg/ml)
0	20	980	0	0
1	19	980	1	1
5	15	980	5	5
10	10	980	10	10
15	5	980	15	15
20	0	980	20	20

**Πίνακας 4.** Συγκεντρώσεις των δειγμάτων για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης BSA 1mg/ml

### 3.2.2.6. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες(SDS-PAGE)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μεθόδου Brandford προετοιμάζονται τα διαλύματα φόρτωσης. Σε Eppendorfs των 1,5ml προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα των κυττάρων, το Tris 20mM pH 7.5 και τέλος 20μl Sample Buffer 4x ώστε η τελική συγκέντρωση στο διάλυμα φόρτωσης του κάθε δείγματος να είναι 1x. Τα διαλύματα φόρτωσης φυλάσσονται στους -20°C λόγω του Sample Buffer ενώ τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα στους -80°C. Για να μπορέσουμε να ταυτοποιήσουμε τις πρωτεΐνες των βιολογικών εκχυλισμάτων των κυττάρων που έχουμε πραγματοποιείται η μέθοδος της ανοσοαποτύπωσης Western. Πρώτο και απαραίτητο βήμα αυτής της μεθόδου είναι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου, παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα SDS. Το SDS φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες και προσδίδει έναν σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα, καταργώντας έτσι τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις τους με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών να γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος ( MW ) καθώς μετακινούνται κατά μήκος ενός φορτιζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Πρωτεΐνες με μεγάλο μοριακό βάρος έχουν ελαττωμένη κινητικότητα. Αρχικά, φτιάχνεται η πήκτη της ηλεκτροφόρησης η οποία αποτελείται από δύο διαδοχικά πηκτώματα : το πηκτώμα επιστοίβαξης ( stacking gel ) και το πηκτώμα διαχωρισμού ( separating gel ). Το πηκτώμα επιστοίβαξης συμπυκνώνει τις πρωτεΐνες σε μια μικρή ζώνη ώστε κατά την ηλεκτροφόρηση να φτάσουν ταυτόχρονα στο πηκτώμα διαχωρισμού. Η πήκτη σχηματίζεται με τον πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου και MBA ( Bis-Acrylamide ) σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτήν την αντίδραση βοηθούν οι πολυμεριστικοί παράγοντες APS και TEMED. Το TEMED καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών θείου και προκύπτουν από το APS και έτσι δρα ως επιταχυντής της αντίδρασης πολυμερισμού. Οι τιμές της απορρόφησης χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Σε καρτεσιανό επίπεδο συντεταγμένων, στον οριζόντιο άξονα χ'χ τοποθετούνται οι τιμές των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών και στον κατακόρυφο άξονα y'y τοποθετούνται οι τιμές των απορροφήσεων των δειγμάτων. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση κάθε δείγματος εκφρασμένη σε μg/ml υπολογίζεται από τον τύπο  $OD_{595nm} = f(C)$  που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Για κάθε δείγμα που είχαμε ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία : Σε ένα Eppendorf προστίθεται 1μl του δείγματος και 1ml του αντιδραστήριου Brandford 1x. Τα δείγματα αναδεύονται καλά και επωάζονται για 20min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Φασματοφωτομετρούνται στα 595nm και προσδιορίζεται η συγκέντρωση του κάθε δείγματος που θα ηλεκτροφορηθεί.

Η πήκτη ηλεκτροφόρησης κατασκευάζεται μεταξύ μιας επίπεδης διάταξης δυο τζαμιών ( επίπεδη ηλεκτροφόρηση ) που απέχουν μεταξύ τους 1mm. Οι θέσεις υποδοχής ( slots ή wells ) δημιουργούνται με την τοποθέτηση ειδικής χτένας στο πήκτωμα συσσώρευσης όσο είναι ακόμα σε υγρή μορφή.



**Εικόνα 3.5.** Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης με τα δύο διαφορετικά πηκτώματα επιστοιίβαξης και διαχωρισμού

Όταν ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός του πηκτώματος, αυτό τοποθετείται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ( Running Buffer 1x ) τόσο στο επάνω όσο και το κάτω μέρος της συσκευής έτσι ώστε να γίνεται άμεση επαφή με την πήκτη. Τα προς φόρτωση δείγματα αφού αποχυθούν, θερμαίνονται για 5min στους 95°C σε θερμαντική πλάκα ( heat-block ) για την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών και του DNA. Αμέσως μετά τη θέρμανση, φυγοκεντρώνονται ελάχιστα και φορτώνονται στα wells ενώ παράλληλα σε ένα από τα well φορτώνεται ποσότητα από μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με τροφοδοτικό δημιουργώντας κλειστό σύστημα στο οποίο διαβιβάζεται ρεύμα έντασης ίσης με 0,02A. Στην ανοσοαποτύπωση κατά Western το πήκτωμα διαχωρισμού ήταν πυκνότητας 12%. Η πυκνότητα 12% χρησιμοποιείται για διαχωρισμό πρωτεϊνών μεγέθους 10-55kDa. Οι ποσότητες που φορτώθηκαν ήταν 16μl loading sample/well και 2μl από το μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών ( marker ).

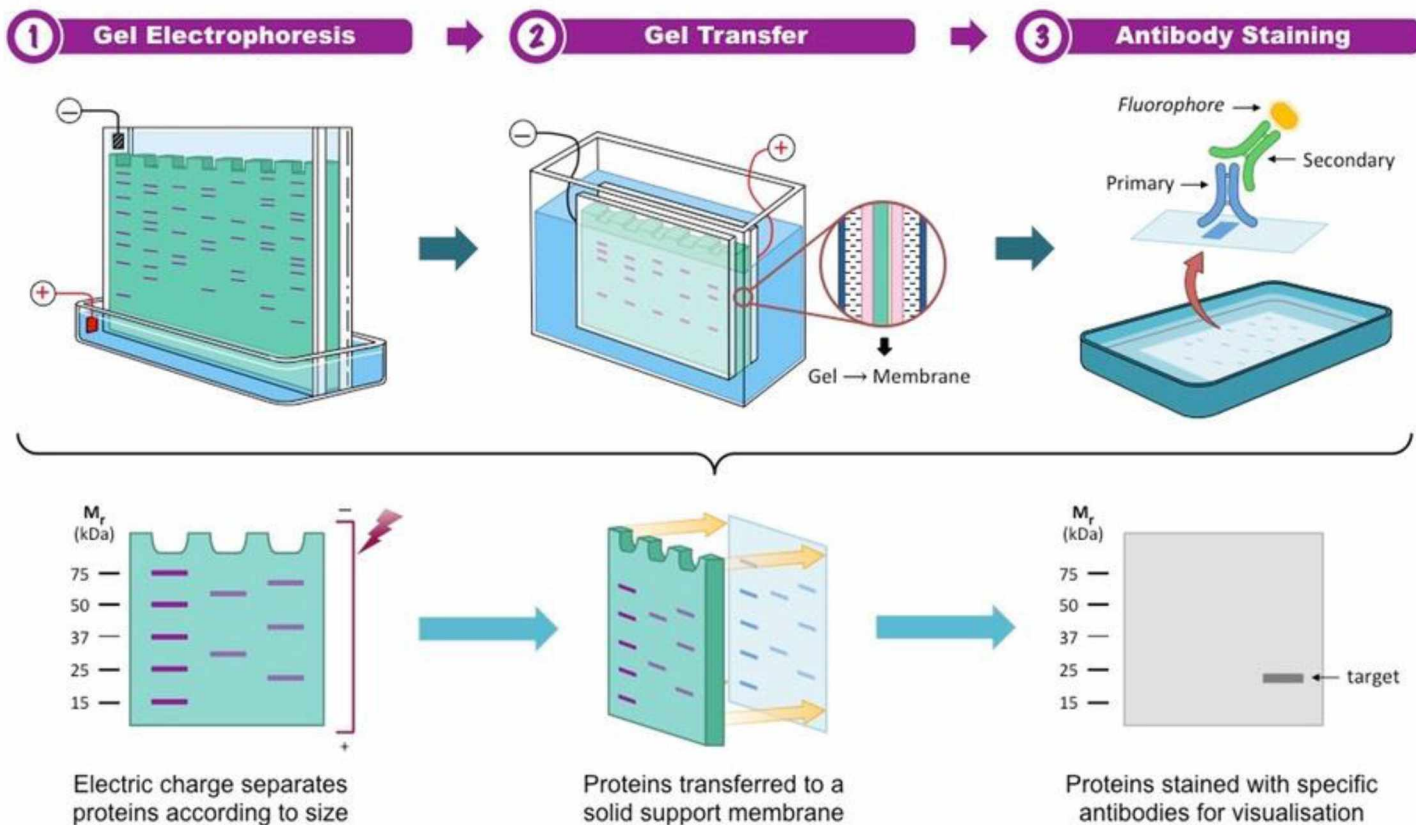
Διαλύματα	Πήκτωμα επιστοιίβαξης	Πήκτωμα διαχωρισμού 12%
ddH <sub>2</sub> O	2,025ml	2,175ml
Tris HCL 1,5M pH 6.8	0,21ml	-
Tris HCl 1,5M pH 8.8	-	1,25ml
SDS 10%	25μl	50μl
Bis/Acrylamide 40%	0,25ml	1,5ml
TEMED	2,5μl	2,5μl
APS 10%	12,5μl	25μl

**Πίνακας 6:** Συστάσεις των πηκτωμάτων επιστοιίβαξης και διαχωρισμού



### 3.2.2.7. Ανοσοαποτύπωση κατά Western ( Western Blotting )

Αμέσως μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών, το πήκτωμα διαχωρισμού εξισορροπείται σε παγωμένο ( 4°C ) διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς ή Transfer Buffer ( mild use ). Επίσης σε ένα άλλο παγωμένο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς ή Transfer Buffer ( new ) τοποθετούνται 4 χαρτιά νιτροκυτταρίνης Whatman ( W.B filter papers ), μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κατάλληλων διαστάσεων και δύο απορροφητικά σφουγγαράκια ίδιων διαστάσεων. Τα δύο αυτά διαλύματα με το πήκτωμα και τη μεμβράνη αφήνονται να επωαστούν για 15min. Αφού το πήκτωμα εξισορροπηθεί ετοιμάζεται η ειδική κασέτα με τα ενδιάμεσα υλικά να τοποθετούνται με μορφή σαν sandwich. Πρώτα τοποθετείται το πρώτο σφουγγαράκι, μετά δυο χαρτιά Whatman, το πήκτωμα, η μεμβράνη, τα άλλα δύο χαρτιά Whatman και τέλος το δεύτερο σφουγγαράκι. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και το πήκτωμα τοποθετούνται σε άμεση επαφή μεταξύ τους. Τυχόν φυσαλίδες ανάμεσα από αυτά τα δύο αφαιρούνται ώστε να μην επηρεαστεί η διέλευση των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Για να γίνει αυτή η μετακίνηση των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη, θα πρέπει η κασέτα να τοποθετηθεί με κατάλληλο προσανατολισμό εντός της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς η οποία, τοποθετείται σε μια θήκη από πολυστερένιο και η όλη συσκευή περιβάλλεται από παγοκύστες για την αποφυγή αύξησης της θερμοκρασίας κατά την ηλεκτρομεταφορά. Σε σταθερή ένταση ρεύματος 0,35A για 70min πραγματοποιείται η μεταφορά παρουσία εντός της συσκευής του διαλύματος Transfer Buffer ( new ). Μόλις περάσουν τα 70min, η μεμβράνη ξεπλένεται με PBST 1x ( ddH<sub>2</sub>O ) και σημειώνονται με μολύβι οι θέσεις των ζωνών του μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών. Μετά η μεμβράνη επωάζεται με διάλυμα αποβουτυρωμένου γάλακτος 10% σε PBST 1x ( ddH<sub>2</sub>O ) για 1h υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για να αποκλειστούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμησης ( blocking ). Μετά τη 1h η μεμβράνη εκπλένεται στιγμιαία με PBST 1x ( ddH<sub>2</sub>O ) και επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα της υπό μελέτη πρωτεΐνης στους 4°C με ανάδευση για 12-16h. Μετά τις 12-16h, εκπλένεται 5 φορές για 5min τη φορά με PBST (dH<sub>2</sub>O) και επωάζεται για 1h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση με το δεύτερο αντίσωμα σε 2%αποβουτυρωμένο γάλα. Το δεύτερο αντίσωμα είναι χημικά προσδεδεμένο με κατάλληλο προσδέτη (HRP) το οποίο αναγνωρίζει ειδικά έναντι σταθερών επιτόπων IgG του πρώτου αντισώματος. Έπειτα, ακολουθούν 2 εκπλύσεις των 5min και μία των 8min σε PBST (dH<sub>2</sub>O). Για την αντίδραση εμφάνισης σήματος χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα ECLA και ECLB σε αναλογία 1:1. Αφού αναμειχθούν αυτά τα δύο, η μεμβράνη επωάζεται για 3min στο σκοτάδι. Μετά τα 3min, η μεμβράνη τοποθετείται σε μια πλαστική διαφανή μεμβράνη σε μια ειδική κασετίνα που δεν επιτρέπει τη διέλευση του φωτός καθώς τα διαλύματα ECL είναι φωτοευαίσθητα. Για την εμφάνιση του σήματος σε φιλμ χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit της Kodak. Η εμφάνιση του σήματος γίνεται σε σκοτεινό δωμάτιο. Ένα κομμάτι φιλμ έρχεται σε επαφή με τη μεμβράνη για όσο χρόνο χρειαστεί και στη συνέχεια το φιλμ επωάζεται για 1min στο διάλυμα Developer και για 1min στο διάλυμα μονιμοποίησης ( Fixer ) με μια ενδιάμεση έκπλυση του φιλμ των 10sec και μια τελική έκπλυσή του στο νερό. Μόλις τελειώσει η εμφάνιση και το φιλμ με το σήμα κατάλληλης έντασης, η μεμβράνη εκπλένεται για λίγο σε PBST (dH<sub>2</sub>O) για να απομακρυνθεί η περίσσεια του ECL. Η μεμβράνη στη συνέχεια μπορεί είτε να επωαστεί με ένα άλλο πρώτο αντίσωμα με την ίδια διαδικασία όπως πριν είτε μπορεί να αποθηκευτεί σε πλαστική διαφανή μεμβράνη για να μην ξεραθεί στους -20°C.



**Εικόνα 3.6.** Αναπαράσταση της διαδικασίας της ανοσοαποτύπωσης Western.

### 3.2.3. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων ( Transfection )

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, τα κύτταρα HeLa υπέστησαν παροδική διαμόλυνση με τη μέθοδο των λιποσωμάτων. Στη μέθοδο αυτή, το εξωγενές γενετικό υλικό βρίσκεται στο εσωτερικό του λιποσώματος και εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου λόγω της λιπιδικής φύσης της μεμβράνης. Για το συγκεκριμένο πείραμα, η μέθοδος των λιποσωμάτων έγινε με τη χρήση του εμπορικού αντιδραστηρίου λιποφεκταμίνη® 2000 με αναλογία εξωγενούς DNA/λιποφεκταμίνη να είναι 1/1. Τα πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων χωρίζονται σε 3 κατηγορίες, με βάση τα χρησιμοποιούμενα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά και βέβαια το σκοπό της εκτέλεσης κάθε πειράματος.

#### 3.2.3.1. Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40-β-Gal και pMMTV-GRE-Luc

Σε αυτό το πείραμα παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pSV40-β-Gal και pMMTV-GRE-Luc με συγκεντρώσεις 470ng/μl και 790ng/μl αντίστοιχα. Σκοπός αυτού ήταν να εξετάσουμε αν οι αμυρίνες μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR μετά από πρόσδεσή του στα GREs που εντοπίζονται στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου της λουσιφεράσης. Το συγκεκριμένο πείραμα έγινε παρουσία και απουσία δεξαμεθαζόνης ( DEX ). Έτσι συγκρίνοντας τη δράση των ουσιών μας με αυτήν της δεξαμεθαζόνης μπορούμε να δούμε αν αυτές δρουν συνεργικά ή ανταγωνιστικά παρουσία της δεξαμεθαζόνης.



## Πειραματική διαδικασία :

### Ημέρα 0:

Θρυψινοποίηση των κυττάρων, μέτρηση και στρώσιμο των κυττάρων σε 24x well/plate ( 24 wells ). Σε κάθε well στρώθηκαν 50.000 cells επαναδιαλυτοποιημένα σε 0,5ml DMEM-cis. Το plate επωάζεται στον κλίβανο για 37°C.

### Ημέρα 1:

Transfection των κυττάρων με τα πλασμίδια pSV40-β-Gal και pMMTV-GRE-Luc σε συγκεντρώσεις 0,15μg/well και στα δύο. Αρχικά, σε κάθε well αφαιρείται το θρεπτικό των κυττάρων και προστίθενται 200μl OPTIMEM ( θρεπτικό της διαμόλυνσης ) στο οποίο δεν έχει γίνει εισαγωγή αντιβιοτικού. Στη συνέχεια το plate τοποθετήθηκε πίσω στον επωαστήρα μέχρι να γίνει η διαμόλυνση με τα πλασμίδια. Η διαμόλυνση γίνεται με χρήση λιποφεκταμίνης® 2000 σε αναλογία εξωγενούς DNA/ λιποφεκταμίνης 1/1. Συνολικά γίνεται εισαγωγή 0,3μg DNA/well ( 0,15μg από κάθε πλασμίδιο ) οπότε με βάση την αναλογία αυτή προστίθεται κατάλληλη ποσότητα λιποφεκταμίνης. Για το πείραμα φτιάχνονται τα mix:

Mix I	Mix II
650μl OPTIMEM + 8,3μl β-Gal + 4,9μl GRE-Luc	650μl OPTIMEM + 7,8μl Lipof

**Πίνακας 7:** Mix για τη διαμόλυνση με τα πλασμίδια

- Διάλυμα OPTIMEM : 25μl x 26wells = 650μl
- B-Gal : 0,15μg x 26wells = 3,9μg = 3900 ng  
Άρα 3900ng/470ng/μl = 8,3μl
- GRE-Luc : 0,15μg x 26wells = 3,9μg = 3900 ng  
Άρα 3900ng/790ng/μl = 4,9μl
- Lipofectamine : 0,3μl x 26wells = 7,8μl

Αφού φτιάξουμε τα δυο mix τα αφήνουμε να επωαστούν για 5min. Μόλις περάσουν τα 5min γίνεται ανάμειξη των δυο MIX με μεταφορά του mix II στο mix I και αφήνουμε το νέο master mix να επωαστεί για 7min. Μόλις περάσουν τα 7min εισάγουμε 50μl από το master mix σε κάθε well πολύ αργά και σταγόνα-σταγόνα ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε well να είναι 250μl και αφήνουμε το plate στον κλίβανο να επωαστεί για 4h. Μετά τις 4h το θρεπτικό αφαιρείται και προστίθενται 0,5ml από το θρεπτικό DMEM-cis σε κάθε well και το plate επιστρέφεται στον κλίβανο όπου και επωάζεται για 48h.

### Ημέρα 3 :

Γίνεται προσθήκη των ουσιών στο 24 well/plate όπως φαίνεται στην εικόνα 3.7. Αρχικά φτιάχνουμε τα δυο mix ανάλογα με το αν περιέχουν ή όχι δεξαμεθαζόνη.

Mix I	Mix II
3250μl DMEM-cis + 3,25μl Dex 10 <sup>-3</sup> M	3250μl DMEM-cis + 3,25μl 100% EtOH

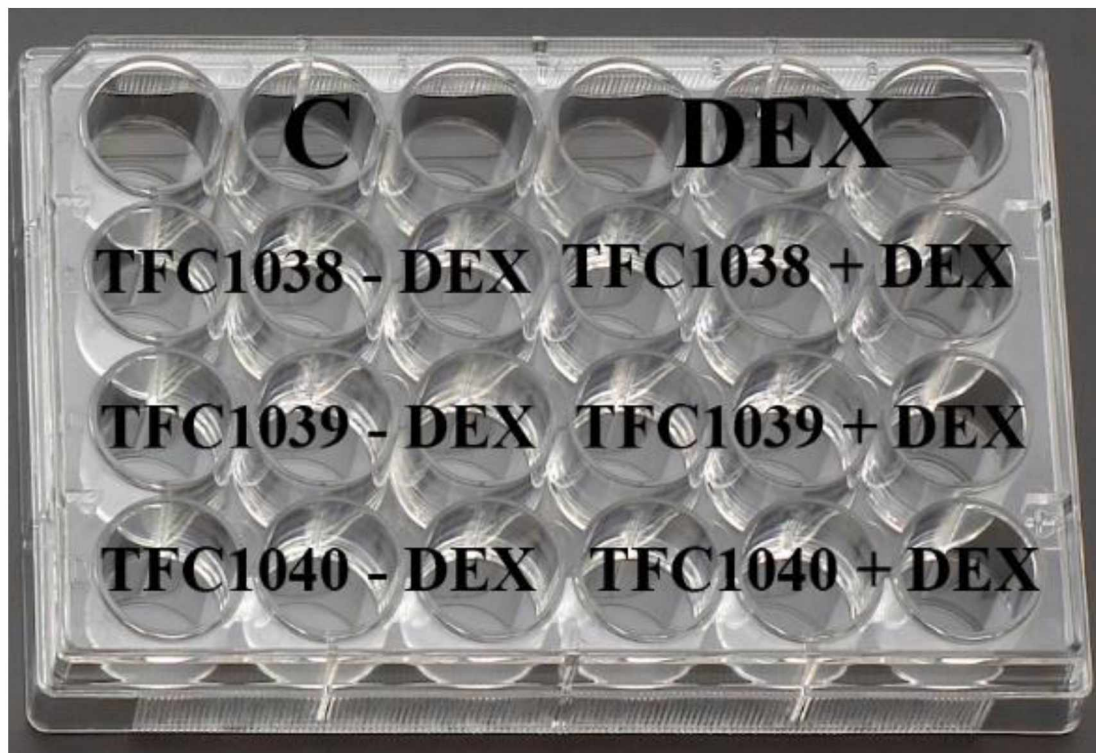
**Πίνακας 8:** Mix από τα οποία θα προκύψουν οι συστάσεις των ουσιών

Σύμφωνα με αυτά τα mix φτιάχνονται και οι συστάσεις των ουσιών όπως φαίνεται στον πίνακα 9 :

<b>DEX</b>	<b>750μl mix I + 0,75μl DMSO</b>	<b>Control</b>	<b>750μl mix II + 0,75μl DMSO</b>
<b>TFC1038 + DEX</b>	<b>750μl mix I + 0,75μl TFC1038</b>	<b>TFC1038 – DEX</b>	<b>750μl mix II + 0,75μl TFC1038</b>
<b>TFC1039 + DEX</b>	<b>750μl mix I + 0,75μl TFC1039</b>	<b>TFC1039 – DEX</b>	<b>750μl mix II + 0,75μl TFC1039</b>
<b>TFC1040 + DEX</b>	<b>750μl mix I + 0,75μl TFC1040</b>	<b>TFC1040 - DEX</b>	<b>750μl mix II + 0,75μl TFC1040</b>

**Πίνακας 9:** Συστάσεις των ουσιών

Σε κάθε well γίνεται εισαγωγή 250μl του αντίστοιχου δείγματος και το plate επιστρέφεται στον κλίβανο για επώαση 6h. Τα δείγματα εξετάζονται ανά τριπλέτες.



**Εικόνα 3.7.** 24x well/plate με τις ουσίες.

Μετά τις 6h γίνεται η λύση των κυττάρων. Αρχικά απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από τα wells και γίνονται δυο εκπλύσεις με παγωμένο και αποστειρωμένο PBS 1x. Μετά τις εκπλύσεις προστίθενται 70μl σε κάθε well από παγωμένο Lysis Buffer 1x ( σε stock συγκέντρωσης 5x ). Ο υπολογισμός του Lysis Buffer γίνεται ως εξής:  $26\text{wells} \times 70\mu\text{l} = 1820\mu\text{l} / 5 = 364 \mu\text{l}$  Lysis Buffer και  $1820 - 364 = 1456\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O. Μετά την προσθήκη του Lysis Buffer το plate επωάζεται για 30min με shake στους 4°C. Μετά τα 30min ακολουθεί η αποκόλληση των κυττάρων από τα wells μέσω απόξεσης με tip και τοποθέτηση του περιεχομένου τους σε σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5ml. Τα Eppendorfs φυγοκεντρώνονται για 30min, στα 13000rpm στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέα Eppendorfs των 1,5ml και αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι την εκτέλεση του πρωτοκόλλου λουσιφεράσης κα γαλακτοσιδάσης.

### 3.2.4. Πρωτόκολλο λουσιφεράσης/ β-γαλακτοσιδάσης

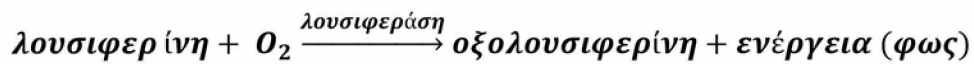
Συνίσταται από δύο ξεχωριστές δοκιμασίες :

(α) τη δοκιμασία μέτρησης της ενεργότητας της λουσιφεράσης

(β) τη δοκιμασία μέτρησης της β-γαλακτοσιδάσης

#### 3.2.4.1. Δοκιμασία λουσιφεράσης

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη λουσιφεράση υπόκειται σε μεταγραφικό έλεγχο από τον GR και βρίσκεται καθοδικά ενός υποκινητή που φέρει επαναλαμβανόμενες GRE αλληλουχίες. Για αυτό το γονίδιο της λουσιφεράσης χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς, δίνοντας τις πληροφορίες που αφορούν τη μεταγραφική ενεργότητα των κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί με τη συγκεκριμένη μοριακή κατασκευή. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ανίχνευση φωτός που παράγεται από την οξείδωση της χρωστικής λουσιφερίνης, σύμφωνα με την αντίδραση χημειοφωταύγειας.



#### Εικόνα 3.8. Αντίδραση χημειοφωταύγειας

Η παραπάνω αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο λουσιφεράση και γίνεται σε δύο στάδια παρουσία συμπαραγόντων όπως το ATP ή τα  $\text{Ca}^{2+}$ . Η ενεργότητα της λουσιφεράσης προσδιορίζεται με μέτρηση του παραγόμενου φωτός σε λουμινόμετρο και εκφράζεται σε μονάδες RLU.

#### Πειραματική διαδικασία :

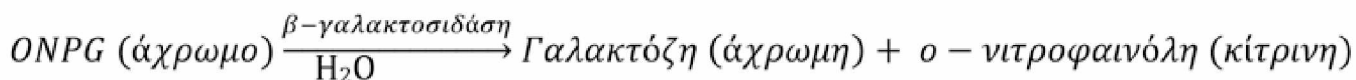
Αρχικά τα δείγματα ξεπαγώνουν από τους  $-80^{\circ}\text{C}$  στον πάγο. Στη συνέχεια γίνεται ανάμειξη 10μl του δείγματος των κυττάρων με 100μl διαλύματος υποστρώματος λουσιφεράσης. Το διάλυμα αυτό είναι φωτοευαίσθητο και αποτελείται από :

- ✚ 470μM λουσιφερίνη
- ✚ 530μM ATP
- ✚ 270μM συνένζυμο-A ( Co-A )
- ✚ 20mM Tris pH 8
- ✚ 2,67mM  $\text{MgSO}_4$
- ✚ 0,1mM EDTA
- ✚ 33,3mM DTT
- ✚ ddH<sub>2</sub>O μέχρι τη συμπλήρωση του απαιτούμενου όγκου



### 3.2.4.2. Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης

Σε αντίθεση με τη λουσιφεράση, η έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης δεν υπόκειται σε μεταγραφικό έλεγχο από τον GR. Ο προσδιορισμός, ωστόσο, της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης είναι απαραίτητος για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την έκφραση του γονιδίου της GRE-λουσιφεράσης. Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης προσδιορίζεται με μελέτη της υδρόλυσης του χρωμογόνου υποστρώματος 2-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside ( ONPG ) σύμφωνα με την αντίδραση :



#### Εικόνα 3.9. Αντίδραση β-γαλακτοσιδάσης

Η αντίδραση αυτή σταματάει με την προσθήκη διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M το οποίο διαμορφώνει την τιμή του pH της αντίδρασης στο 11. Σε αυτήν την τιμή pH η β-γαλακτοσιδάση καθίσταται ανενεργή και η ο-νιτροφαινόλη, σταθεροποιείται στην ανιονική της μορφή, κίτρινου χρώματος. Το έγχρωμο προϊόν που παράγεται μπορεί να προσδιοριστεί με φωτομέτρηση στα 420nm.

#### Πειραματική διαδικασία :

Σε Eppendorfs των 1,5ml προστίθενται 20μl από τα υπό εξέταση δείγματα. Σε αυτά προστίθενται 3μl διαλύματος ιόντων Mg<sup>2+</sup> 100x και 201μl διαλύματος sodium phosphate. Το διάλυμα ιόντων Mg<sup>2+</sup> αποτελείται από 31,5 % v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 10% v/v MgCl<sub>2</sub> και 58,5 % v/v ddH<sub>2</sub>O. Στο τέλος προστίθενται 66μl υποστρώματος της αντίδρασης ( ONPG ). Τα δείγματα αναδεύονται καλά με vortex και επωάζονται στους 37°C μέχρι την ανάπτυξη επαρκούς έντασης κίτρινου χρώματος. Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 500μl διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M σε κάθε δείγμα και τα δείγματα φωτομετρούνται στα 420nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται το διάλυμα που αντί 20μl δείγματος έχουν προστεθεί 20μl από το Lysis Buffer.



## 4. Αποτελέσματα

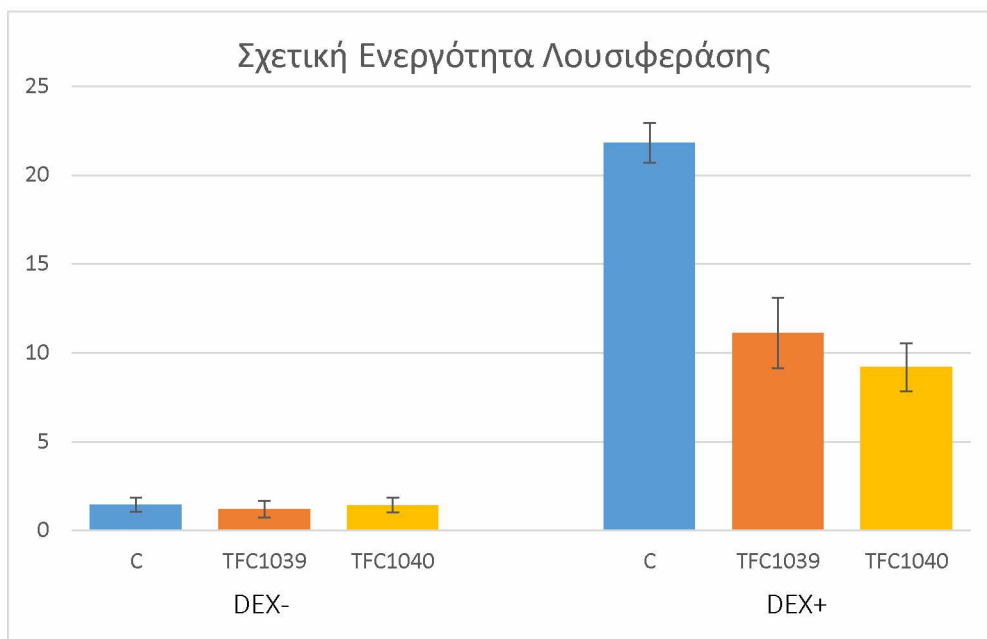
### 4.1. Οι αμυρίνες επάγουν την μετατόπιση του GR στον πυρήνα

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, τα πειράματα ξεκίνησαν με το πείραμα της ανοσοιστοχημείας που αποσκοπούσε στη μελέτη της ικανότητας των υπό εξέταση αμυρινών να προκαλέσουν την πυρηνική μετατόπιση του GR. Τα πειράματα ανοσοιστοχημείας έγιναν στην ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά HeLa. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν με το θρεπτικό DMEM-cis ( απουσία ορμονών ), παρουσία ή απουσία δεξαμεθαζόνης 1μM ( DEX ) αραιωμένη σε διάλυμα 100% EtOH ή παρουσία 10μM των υπό εξέταση ουσιών αραιωμένων σε DMSO. Η επώαση έγινε στους 37°C και σε υγρασία 5% για 2h. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν και ειδικά αντισώματα έναντι του GR προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των αμυρινών να επάγουν τη μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Τέλος, έγινε λήψη των εικόνων φθορισμού με την κάμερα Qimaging optiMOS. Σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα ανοσοιστοχημείας για τις υπό μελέτη α-αμυρίνες, παρατηρήθηκε πως μόλις προσδεθούν στον GR, προκαλούν τη μερική μετατόπιση του GR στον πυρήνα και τη μετέπειτα επαγωγή των γονιδίων-στόχων του. Με βάση λοιπόν τα πειράματα αυτά προχωρήσαμε στη διερεύνηση της επίδρασης των α-αμυρινών στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR.

### 4.2. Επίδραση των αμυρινών στην GR μεταγραφική δραστηριότητα

Υπενθυμίζεται πως ο σκοπός του πρώτου πειράματος διαμόλυνσης των κυττάρων HeLa με τα πλασμίδια pSV40-β-Gal και pMMTV-GRE-Luc, ήταν ο έλεγχος της επίδρασης των αμυρινών στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR μέσω άμεσης πρόσδεσης του συμπλόκου αμυρίνη – υποδοχέα στα στοιχεία απόκρισης γλυκοκορτικοειδών ( GREs ) που εντοπίζονται στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου της λουσιφεράσης και επομένως ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης. Η όλη πειραματική διαδικασία, έγινε παρουσία ή απουσία δεξαμεθαζόνης ( DEX ) η οποία είναι ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές το οποίο αποδεδειγμένα προσδέεται στον GR και προκαλεί την μετατόπισή του στον πυρήνα και την έναρξη της μεταγραφής γονιδίων. Σύμφωνα με το διάγραμμα 4.1. παρουσία δεξαμεθαζόνης ( DEX ) επάγεται αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR η οποία αύξηση ήταν αναμενόμενη. Απουσία δεξαμεθαζόνης και παρουσία των ουσιών TFC1039 και TFC1040 δεν υπάρχει καμία αλλαγή στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR. Δηλαδή οι ουσίες TFC1039 και TFC1040 δεν μπορούν να ασκήσουν τη δράση τους μέσω άμεσης ενεργοποίησης του υποδοχέα που επέρχεται από την αναγνώρισή του και την πρόσδεσή του στα GREs. Όσον αφορά όμως παρουσία δεξαμεθαζόνης αλλά και των ουσιών, αυτό που φαίνεται στο διάγραμμα 4.1. είναι πως, οι ουσίες TFC1039 και TFC1040 μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR η οποία μείωση είναι στατιστικά σημαντική. Αυτό σημαίνει πως οι ουσίες TFC1039 και TFC1040 ανταγωνίζονται τη δράση της δεξαμεθαζόνης. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η δοκιμασία λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης έγινε για τις ουσίες TFC1039 και TFC1040 καθώς η ουσία TFC1038 δεν είχε κάποια σημαντική επίδραση στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR σε σχέση με τις άλλες δυο ουσίες.

Επίσης, οι παρατηρήσεις αυτές αποτελούν γενικό συμπέρασμα αρκετών επαναλήψεων που έλαβαν χώρα για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος.

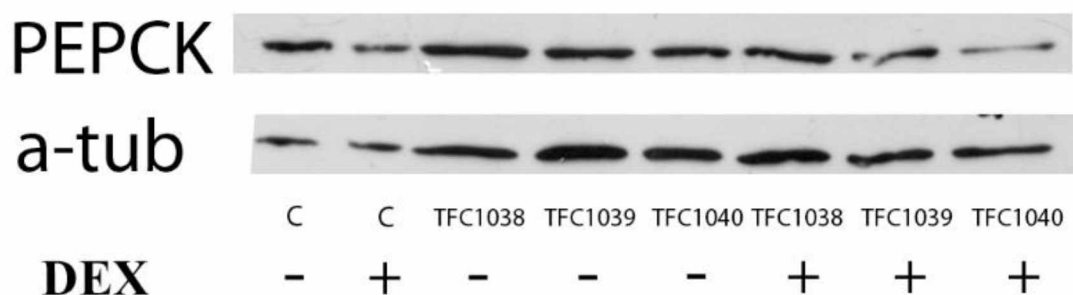


**Διάγραμμα 4.1.** Επίδραση των ουσιών TFC1039 και TFC1040 στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR

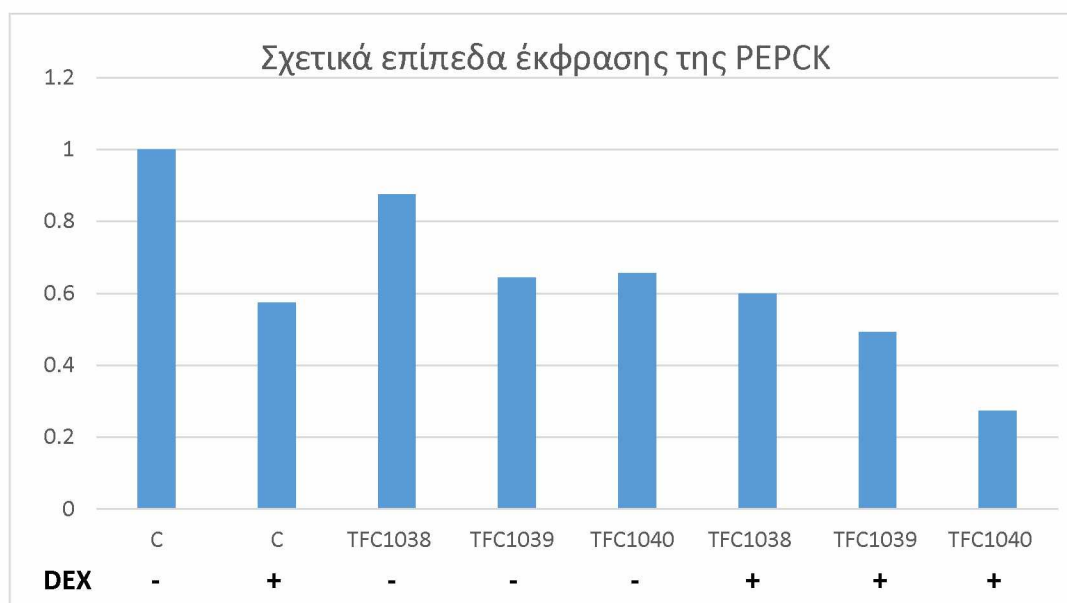
#### 4.3. Επίδραση των αμυρινών στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK

Για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα από τη δοκιμασία λουσιφεράσης/ $\beta$ -γαλακτοσιδάσης πως οι ουσίες δεν ενεργοποιούν τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR απουσία δεξαμεθαζόνης και μειώνουν αισθητά τη μεταγραφική του δραστηριότητα παρουσία δεξαμεθαζόνης (DEX), έγινε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του γλυκονεογενετικού ενζύμου καρβοξυκινάση του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) εφαρμόζοντας Western Blot ανάλυση. Είναι γνωστό ότι τα επίπεδα του ενζύμου αυξάνονται παρουσία φυσικών γλυκοκορτικοειδών και δεξαμεθαζόνης (DEX) μιας και το γονίδιο που κωδικοποιεί την έκφραση της PEPCK αποτελεί γονίδιο-στόχο του GR. [(Hwang SL, 2012); (Sengupta S, 2001); (Hall RK, 2007)]. Από τα αποτελέσματα που φαίνονται στην εικόνα 4.2 φαίνεται ότι, παρουσία της δεξαμεθαζόνης και των ουσιών TFC1039 και TFC1040 υπάρχει μια μείωση των επιπέδων έκφρασης της PEPCK. Μάλιστα η μείωση των επιπέδων έκφρασης της PEPCK γίνεται πιο αισθητή, παρουσία συνδυασμού δεξαμεθαζόνης και της ουσίας TFC1040 όπως φαίνεται από την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας ως μόριο κανονικοποίησης την  $\alpha$ -τουμπουλίνη ( $\alpha$ -tubulin). Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα από τη μελέτη της επίδρασης των ουσιών στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η TFC1040 πιθανόν να επηρεάζει αρνητικά την έκφραση της PEPCK και να δρα ανταγωνιστικά στην DEX, μειώνοντας έτσι τα επίπεδα έκφρασης της PEPCK και επομένως μη ευνοώντας τη γλυκονεογενετική πορεία.

(A)



(B)

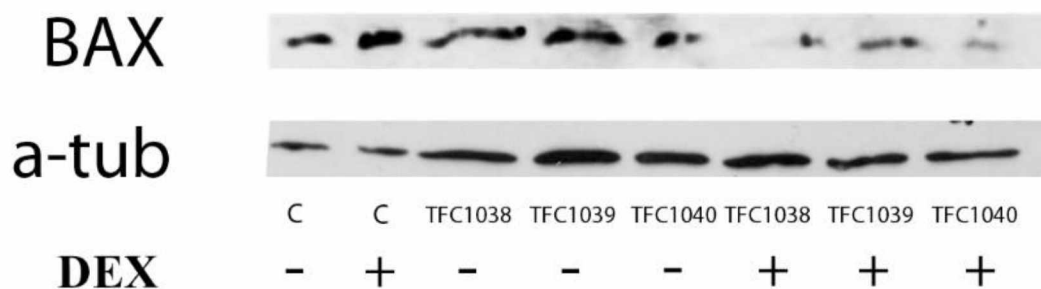


**Εικόνα 4.2.** Επίδραση των αμυρινών στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK. (A) Western Blot ανάλυση (B) Γραφική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης της PEPCK μετά από κανονικοποιήσεις ως προς τα επίπεδα έκφρασης της a-tub στα κύτταρα HeLa.

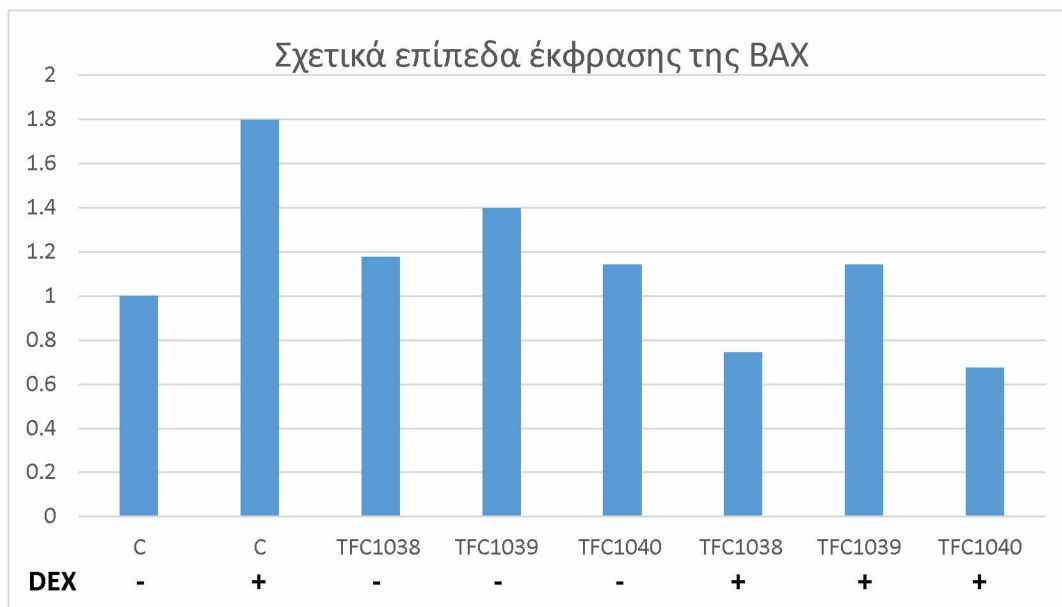
#### 4.4. Επίδραση των αμυρινών στην επαγωγή της απόπτωσης

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, ένας από τους μηχανισμούς δράσης των γλυκοκορτικοειδών όταν προσδένονται στον GR, είναι η επαγωγή της ενδογενούς οδού απόπτωσης. Στην ενδογενή οδό απόπτωσης, ο GR προκαλεί την αύξηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bim, Bid και BAX και τη μείωση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και Bcl-xL, επάγοντας την ενεργοποίηση των κασπασών 9 και 3 στη συνέχεια, με τελικό στόχο την επαγωγή της απόπτωσης του κυττάρου. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία ερευνήσαμε την επίδραση των αμυρινών στο ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον GR μελετώντας τα επίπεδα έκφρασης του αντι-αποπτωτικού μορίου Bcl-2 και του προ-αποπτωτικού μορίου BAX με Western Blot ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, για το προ-αποπτωτικό μόριο BAX τα επίπεδα έκφρασης του παρουσιάζονται μετά από την κανονικοποίησή τους ως προς τα επίπεδα έκφρασης της α-τουμπουλίνης (α-tubulin). Από τη μελέτη αυτή δεν προέκυψαν αξιόπιστα αποτελέσματα, όσον αφορά την επίδραση των ουσιών στα επίπεδα έκφρασης της BAX πρωτεΐνης, επαληθεύεται όμως η έκφραση των επιπέδων BAX παρουσία DEX. Στην εικόνα 4.3 παρουσιάζονται τα σήματα από τη Western Blot ανάλυση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης μετά από κανονικοποίηση με τα επίπεδα έκφρασης της α-tubulin.

(A)



(B)

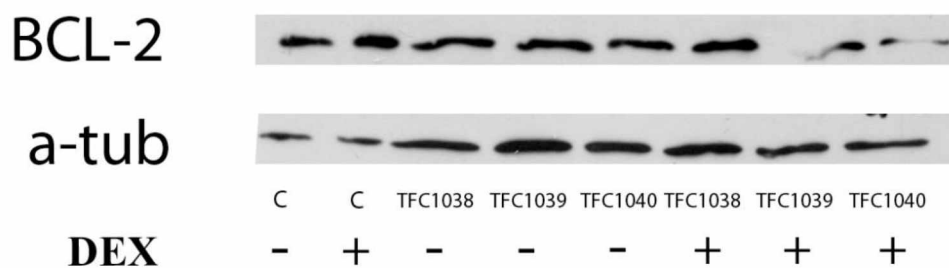


**Εικόνα 4.3.** (A) Western Blot ανάλυση (B) Γραφική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του προ-αποπτωτικού μορίου BAX μετά από κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα της a-tubulin.

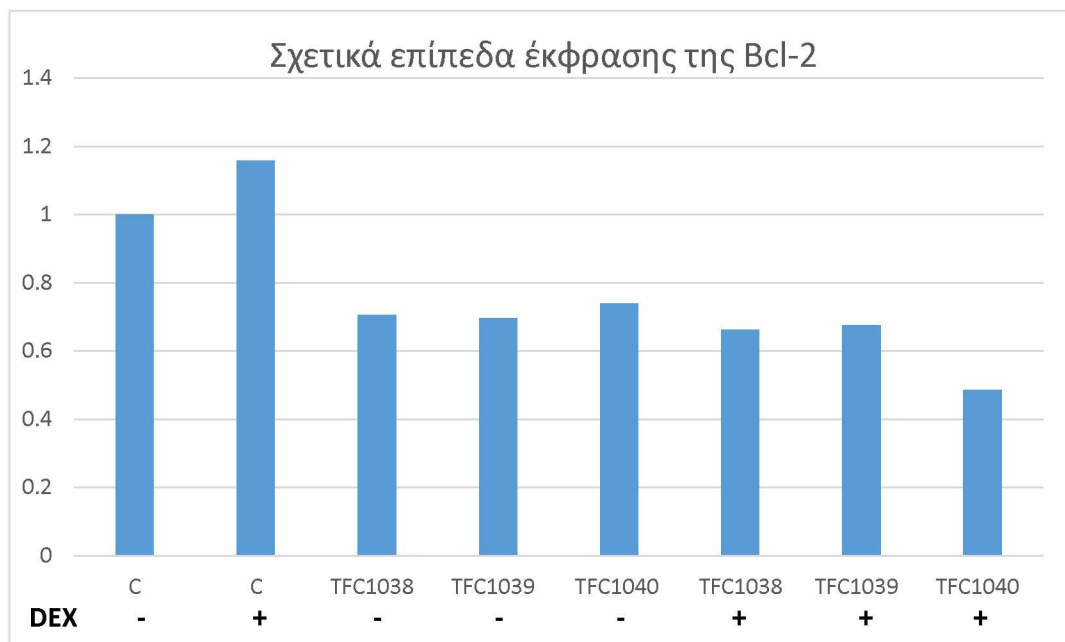
Στη συνέχεια ερευνήσαμε τα επίπεδα έκφρασης του αντι-αποπτωτικού μορίου Bcl-2. Κατά την επαγωγή της απόπτωσης από τα γλυκοκορτικοειδή όπως αναφέρεται, η μεταγραφή του γονιδίου του αντι-αποπτωτικού μορίου Bcl-2 αναμένεται να καταστέλλεται, γεγονός που επαληθεύεται και από τα αποτελέσματα τη Western Blot ανάλυσης. Στην εικόνα 4.4. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη Western Blot ανάλυση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης της Bcl-2 μετά από κανονικοποίηση με τα επίπεδα έκφρασης της a-tubulin. Στην εικόνα φαίνεται ότι, παρουσία της DEX και των υπό εξέταση ουσιών, τα επίπεδα έκφρασης της Bcl-2 μειώνονται, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι προς εξέταση ουσίες μας δρουν συνεργατικά με τη DEX για την επαγωγή της απόπτωσης.



(A)



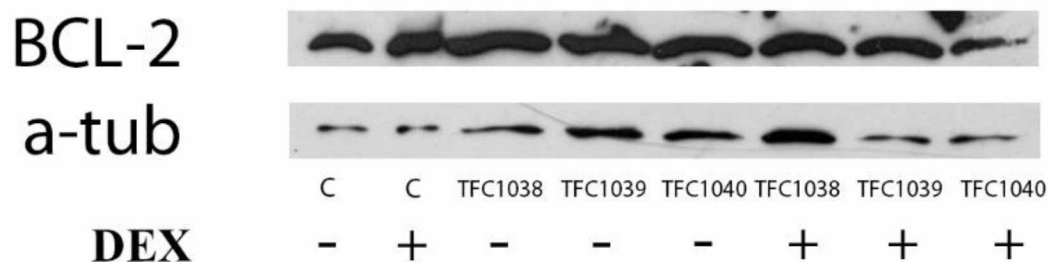
(B)



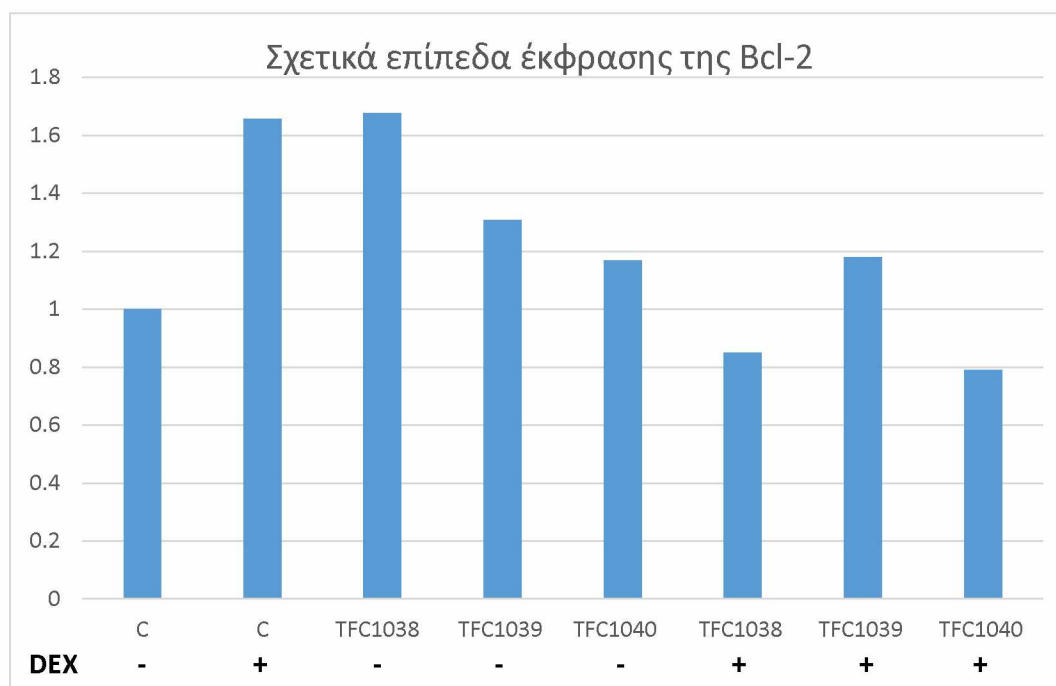
**Εικόνα 4.4.** (A) Western Blot ανάλυση (B) Γραφική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του αντι-αποπτωτικού μορίου Bcl-2 μετά από κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα της a-tubulin.

Για την επαλήθευση αυτών των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε και άλλη Western Blot ανάλυση. Τα αποτελέσματα της Western Blot ανάλυσης και ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης παρουσιάζονται στην εικόνα 4.5. Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύουν την αρχική διαπίστωση της συνεργατικής δράσης των υπό εξέταση ουσιών μας με την DEX στην επαγωγή της απόπτωσης.

(A)



(B)

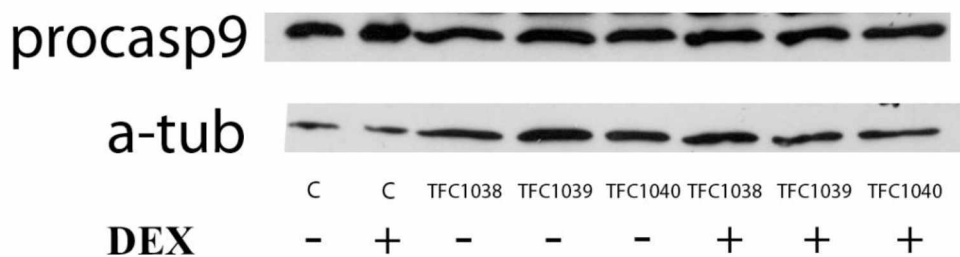


**Εικόνα 4.5.** (A) Western Blot ανάλυση (B) Γραφική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του αντι-αποπτωτικού μορίου Bcl-2 μετά από κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα της a-tubulin.

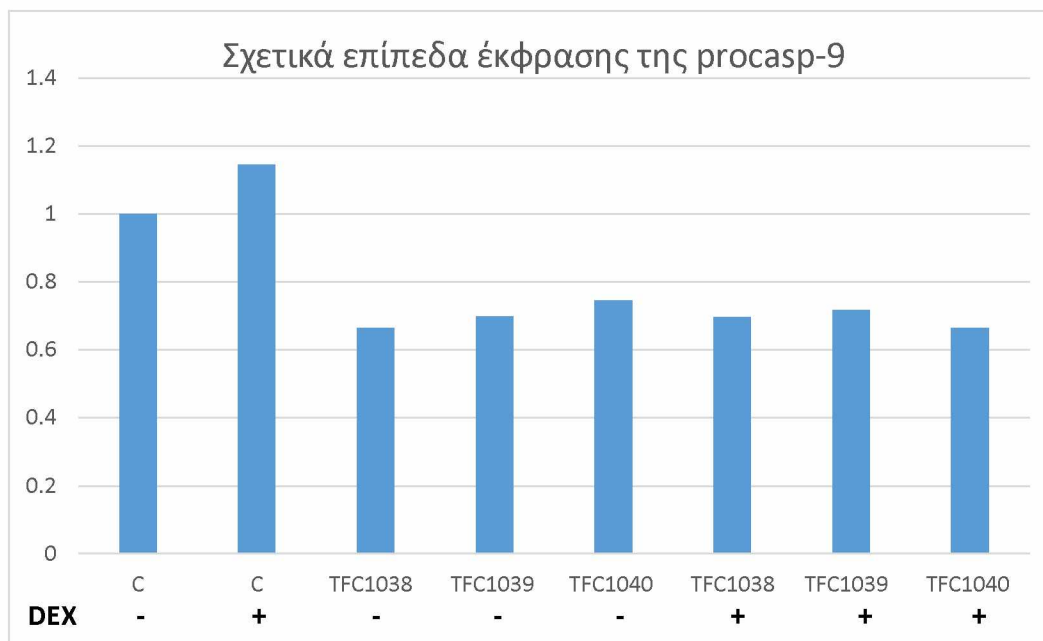
#### 4.5. Επίδραση των αμυρινών στα πρωτεολυτικά ένζυμα προ-κασπάση 9 και προ-κασπάση 3

Συνεχίζοντας τη διερεύνηση της αποπτωτικής δράσης των υπό εξέταση ουσιών μας, εξετάσαμε τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεολυτικών ενζύμων προ-κασπάση 9 και προ-κασπάση 3. Όταν τα γλυκοκορτικοειδή προσδεθούν στον GR, ο GR μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου επάγει τη μεταγραφή των προ-αποπτωτικών γονιδίων Bim, Bad και BAX και την καταστολή της μεταγραφής των αντι-αποπτωτικών γονιδίων Bcl-2 και Bcl-xL. Η ενεργοποίηση του προ-αποπτωτικού γονιδίου BAX έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή του δυναμικού ισορροπίας της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την επακόλουθη απελευθέρωση του Cyt C και άλλων αποπτωτικών πρωτεϊνών, που ενεργοποιούν την κασπάση 9, η οποία ενεργοποιεί την κασπάση 3 επάγοντας την απόπτωση του κυττάρου. Στην εικόνα 4.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την Western Blot ανάλυση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης της προ-κασπάσης 9 μετά από κανονικοποίηση με τα επίπεδα έκφρασης της α-tubulin. Παρατηρούμε ότι, παρουσία της DEX και των υπό εξέταση ουσιών, προκαλείται μείωση των επιπέδων της προ-κασπάσης 9 άρα και επαγωγή της μιτοχονδριακής επαγόμενης απόπτωσης.

(A)



(B)

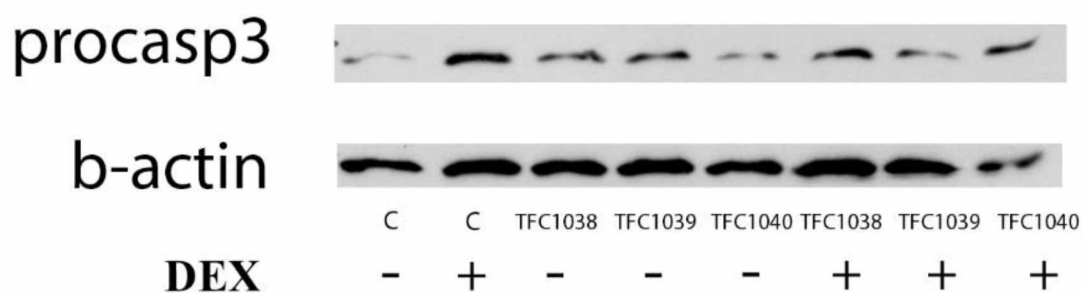


**Εικόνα 4.6.** (A) Western Blot ανάλυση (B) Γραφική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης της προ-κασπάσης 9 μετά από κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα της a-tubulin.

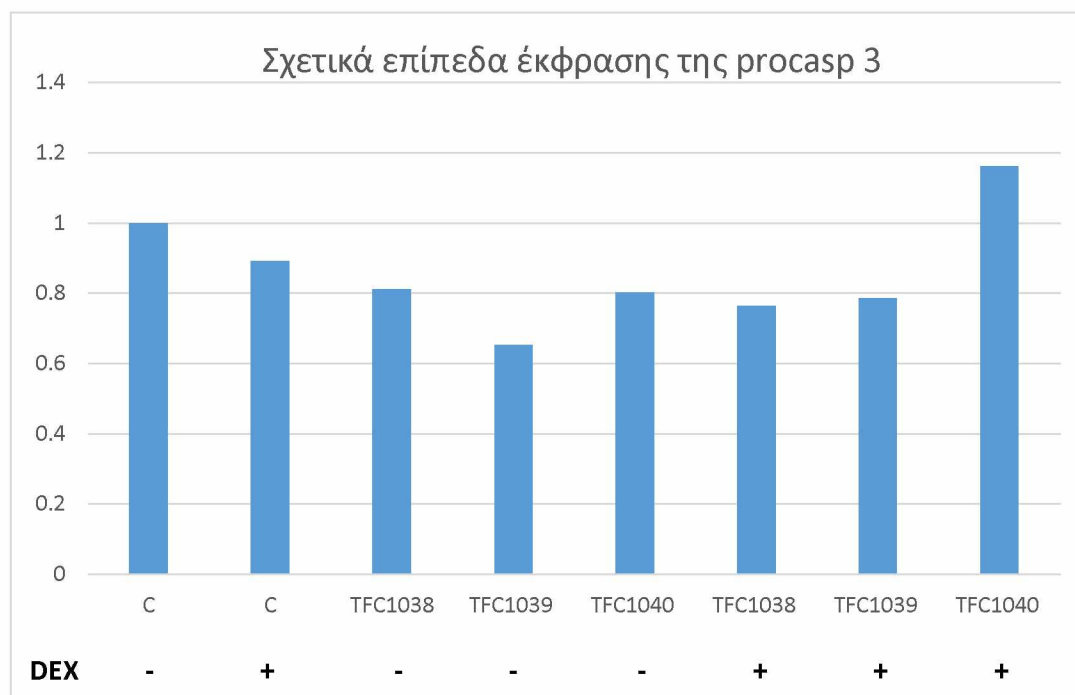
Τα παραπάνω αποτελέσματα θελήσαμε να τα επαληθεύσουμε μελετώντας και τα επίπεδα έκφρασης της προ-κασπάσης 3. Στην εικόνα 4.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη Western Blot ανάλυση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης της προ-κασπάσης 3 μετά από κανονικοποίηση με τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης. Τα αποτελέσματα ωστόσο δεν είναι τόσο ξεκάθαρα. Παρατηρούμε μια μικρή μείωση των επιπέδων έκφρασης της προ-κασπάσης 3, παρουσία των ουσιών, υποδηλώνοντας την πιθανή επίδρασή τους στην επαγωγή απόπτωσης. Για την εξαγωγή ασφαλών στατιστικών σημαντικών αποτελεσμάτων απαιτείται περαιτέρω μελέτη και επανάληψη των προαναφερθέντων δοκιμασιών.



(A)



(B)



**Εικόνα 4.7.** (A) Western Blot ανάλυση (B) Γραφική απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης της προ-κασπάσης 3 μετά από κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα της  $\alpha$ -tubulin.

## 5. Συζήτηση

Σύμφωνα με τα πειράματα ανοσοιστοχημείας, τη δοκιμασία λουσιφεράσης/ $\beta$ -γαλακτοσιδάσης αλλά και τη Western blot ανάλυση, μπορούμε να βγάλουμε κάποια συμπεράσματα για τις δράσεις των  $\alpha$ -αμυρινών. Συγκεκριμένα, οι  $\alpha$ -αμυρίνες επάγουν μερική μετατόπιση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) στον πυρήνα, καταστέλλοντας ωστόσο τη DEX επαγόμενη μεταγραφική του δραστηριότητα, χωρίς οι ίδιες να ενεργοποιούν τη μεταγραφική δραστηριότητα του υποδοχέα. Τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν ότι οι υπό εξέταση ουσίες πιθανόν να μπορούν να συνδέονται στο μόριο του υποδοχέα, προσδίδοντας τέτοια διαμόρφωση στο μόριο του υποδοχέα, η οποία δεν ευνοεί την ενεργοποίηση της δραστηριότητας του υποδοχέα και παράλληλα να ασκούν ανταγωνιστική δράση έναντι των φυσικών γλυκοκορτικοειδών καταλαμβάνοντας θέσεις πρόσδεσής τους στο μόριο του υποδοχέα αναστέλλοντας τη δράση του στην έκφραση γλυκονεογενετικών ενζύμων, ασκώντας επομένως πιθανή αντιδιαβητική δράση. Αυτό προκύπτει από τα αποτελέσματα ανάλυσης της επίδρασης των ουσιών στα επίπεδα έκφρασης του γλυκονεογενετικού ενζύμου PEPCK, σε συνδυασμό με την ανταγωνιστική τους δράση στην από DEX επαγόμενη ενεργοποίηση της δραστηριότητας του υποδοχέα. Τα αποτελέσματα της μελέτης της επίδρασης των ουσιών στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK, εφαρμόζοντας Western blot ανάλυση, υποδεικνύουν ότι παρουσία των  $\alpha$ -αμυρινών, τα επίπεδα της PEPCK ελαττώνονται σημαντικά, περιορίζοντας έτσι πιθανόν και τη σύνθεση της γλυκόζης υποκυτταρικά. Αναδεικνύοντας έτσι μια πιθανή υπογλυκαιμική δράση των ουσιών, η οποία πιθανόν να μπορεί να αξιοποιηθεί σε καταστάσεις πρόληψης και αντιμετώπισης του σακχαρώδους διαβήτη, που είναι μια πολύ συχνή και ανεπιθύμητη παρενέργεια της χρόνιας χρήσης των γλυκοκορτικοειδών [ ( Sundhal, 2015 ), ( Wang, 2015 )]. Τα αποτελέσματα της Western blot ανάλυσης για τα γονίδια-στόχους του GR που σχετίζονται με την επαγωγή της απόπτωσης, υποδεικνύουν ότι οι ουσίες και ιδιαίτερα η TFC1040 πιθανόν να ασκούν αποπτωτική δράση, όπως αποδεικνύεται από τη μείωση των επιπέδων του αντι-αποπτωτικού μορίου Bcl-2, και τη μείωση των επιπέδων των προ-κασπασών 9 και 3, υπό την επίδραση αυτών. Η μείωση των επιπέδων της προ-κασπάσης 9 και της Bcl-2, υποδεικνύει και πιθανή εμπλοκή των μιτοχονδρίων σε αυτή τη διεργασία. Δεδομένου ότι οι παρατηρήσεις αυτές προκύπτουν από προκαταρκτικά πειράματα, απαιτείται περαιτέρω μελέτη και επανάληψη των προαναφερθέντων δοκιμασιών για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών διαφορών και ασφαλών συμπερασμάτων. Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας, που υποστηρίζουν πιθανή αντιφλεγμονώδη δράση των αμυρινών [ ( Santos, 2012), ( Medeiros, 2015) ], καθιστούν τις  $\alpha$ -αμυρίνες σημαντικούς υποψήφιους εκλεκτικούς αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και πιθανώς ισχυρά αντιφλεγμονώδη και αντιδιαβητικά φάρμακα. Για τη διερεύνηση της ορθότητας αυτής της υπόθεσης, μελέτες πιθανής δόσοεξαρτώμενης κυτταροτοξικότητας των ουσιών και διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές είναι υπό εξέλιξη και αποτελούν αντικείμενο ερευνών του εργαστηρίου.

## 6. Βιβλιογραφία

1. Akihisa, T., Nakamura, Y., Tagata, M., Tokuda, H., Yasukawa, K., Uchiyama, E., ... Kimura, Y. (2007). Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Chemistry and Biodiversity*, 4(2), 224–231.
2. Aragão, G. F., Carneiro, L. M. V., Junior, A. P. F., Vieira, L. C., Bandeira, P. N., Lemos, T. L. G., & Viana, G. S. de B. (2006). A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85(4), 827–834.
3. Aragao GF, Pinheiro MCC, Bandeira PN, Lemos TLG, V. G. (2007). Effect of Methanolic Extract of *Dendrophthoe falcata* Stem on Reproductive Function of Male Albino Rats. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 7(2), 79–89.
4. Schacke A, H., Sterry, W., & Asadullah, K. (2004). The Glucocorticoid Receptor as Target for Classic and Novel Anti-Inflammatory Therapy. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*, 3(4), 347–353.
5. Barnes, P. J. (2011). Glucocorticosteroids: Current and future directions. *British Journal of Pharmacology*, 163(1), 29–43.
6. Berger, M., Rehwinkel, H., Schmees, N., Schäcke, H., Edman, K., Wissler, L., ... Jaroch, S. (2017). Discovery of new selective glucocorticoid receptor agonist leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(3), 437–442.
7. Bernice Welles. (1993). Depression with anxiety and atypical depression. *Journal of Clinical Psychiatry*, 54(2 SUPPL.), 10–15.
8. Biskup, E., Golebiowski, M., Gniadecki, R., Stepnowski, P., & Lojkowska, E. (2012). Triterpenoid  $\alpha$ -amyrin stimulates proliferation of human keratinocytes but does not protect them against UVB damage. *Acta Biochimica Polonica*, 59(2), 255–260.
9. Breivik, T., Gundersen, Y., Gjermo, P., & Opstad, P. K. (2014). Chronic treatment with the glucocorticoid receptor antagonist RU486 inhibits diabetes-induced enhancement of experimental periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 49(1), 36–44.
10. Calixto, J. B., Otuki, M. F., Vieira-Lima, F., Malheiros, Â., & Yunes, R. A. (2005). Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and  $\alpha$ -amyrin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology*, 507(1–3), 253–259.
11. Capes-Davis, A., Theodosopoulos, G., Atkin, I., Drexler, H. G., Kohara, A., MacLeod, R. A. F., ... Freshney, R. I. (2010). Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. *International Journal of Cancer*, 127(1), 1–8.
12. Cassuto, H., Kochan, K., Chakravarty, K., Cohen, H., Blum, B., Olswang, Y., ... Reshef, L. (2005). Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33873–33884.
13. Chicca, A., Marazzi, J., & Gertsch, J. (2012). The antinociceptive triterpene  $\beta$ -amyrin inhibits 2- arachidonoylglycerol (2-AG) hydrolysis without directly targeting cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology*, 167(8), 1596–1608.
14. Cummins, C. L., & Lilia Magomedova. (2015). Organ-Specific Cancer Metabolism and Its Potential for Therapy Ilaria. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (January), 251–263.
15. Davani, B., Portwood, N., Bryzgalova, G., Reimer, M. K., Heiden, T., Okret, S., ... Khan, A. (2004). Aged Transgenic Mice With Increased Glucocorticoid Sensitivity in Pancreatic  $\beta$ -Cells Develop Diabetes. *Diabetes*, (8), 12–15.
16. De Bosscher, K., Haegeman, G., & Elewaut, D. (2010). Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. *Current Opinion in Pharmacology*, 10(4), 497–504.
17. Evans, R. M. (2005). The Nuclear Receptor Superfamily: A Rosetta Stone for Physiology. *Molecular Endocrinology*, 19(6), 1429–1438.
18. Evans, R. M., & Umeson, K. (1989). Determinants of Target Gene Specificity for Steroid /Thyroid Hormone Receptors. *Cell*, 57, 1139–1146.
19. Fingert, J. H., Alward, W. L., Wang, K., Yorio, T., & Clark, A. F. (2010). Assessment of SNPs associated with the human glucocorticoid receptor in primary open-angle glaucoma and steroid responders. *Molecular Vision*, 16(March), 596–601.
20. Gross, K. L., Oakley, R. H., Scoltock, A. B., Jewell, C. M., & Cidlowski, J. a. (2011). Glucocorticoid receptor alpha isoform-selective regulation of antiapoptotic genes in osteosarcoma cells: a new mechanism for glucocorticoid resistance. *Mol Endocrinol*, 25(7), 1087–1099.
21. Gruver-Yates, A., & Cidlowski, J. (2013). Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword. *Cells*, 2(2), 202–223.
22. Haralampidis, K., Trojanowska, M., & Osbourn, A. E. (2002). Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 75, 31–49.
23. Hayashi, H., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., Kushiro, T., Morita, M., Shibuya, M., & Ebizuka, Y. (2000). Molecular cloning and characterization of a cDNA for *Glycyrrhiza glabra* cycloartenol synthase. *Biol. Pharm. Bull.*, 23(2), 231–234.
24. Hayashi, H., Huang, P., Kirakosyan, A., Inoue, K., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., ... Ebizuka, Y. (2001). Cloning and characterization of a cDNA encoding beta-amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosyntheses in licorice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24(8), 912–916.
25. Hernandez-Vazquez, L., Bonfill, M., Moyano, E., Cusido, R. M., Navarro-Ocaña, A., & Palazon, J. (2010). Conversion of  $\alpha$ -amyrin into centellosides by plant cell cultures of *Centella asiatica*. *Biotechnology Letters*, 32(2), 315–319.
26. Holanda Pinto, S. A., Pinto, L. M. S., Cunha, G. M. A., Chaves, M. H., Santos, F. A., & Rao, V. S. (2008). Anti-inflammatory effect of  $\alpha$ ,  $\beta$ -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, 16(1), 48–52.
27. Holanda Pinto, S. A., Pinto, L. M. S., Guedes, M. A., Cunha, G. M. A., Chaves, M. H., Santos, F. A., & Rao, V. S. (2008). Antinociceptive effect of triterpenoid  $\alpha,\beta$ -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine*, 15(8), 630–634.



28. Hu, X., Du, S., Tunca, C., Braden, T., Long, K. R., Lee, J., ... Obukowicz, M. G. (2011). The antagonists but not partial agonists of glucocorticoid receptor ligands show substantial side effect dissociation. *Endocrinology*, 152(8), 3123–3134.
29. Hwang, J. L., & Weiss, R. E. (2014). Steroid-induced diabetes: A clinical and molecular approach to understanding and treatment. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 30(2), 96–102.
30. J. Sambrook, E. F. F. and T. M. (1991). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Trends in Biotechnology*, 9(1), 213–214.
31. Jetter, R., & Buschhaus, C. (2012). Composition and Physiological Function of the Wax Layers Coating Arabidopsis Leaves:  $\alpha$ -Amyrin Negatively Affects the Intracuticular Water Barrier. *Plant Physiology*, 160(2), 1120–1129.
32. Jiang, C. L., Liu, L., & Tasker, J. G. (2014). Why do we need nongenomic glucocorticoid mechanisms? *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(1), 72–75.
33. Kadmiel, M., & Cidlowski, J. A. (2013). Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Science*, 34(9), 518–530.
34. Kajikawa, M., Yamato, K. T., Fukuzawa, H., Sakai, Y., Uchida, H., & Ohyama, K. (2005). Cloning and characterization of a cDNA encoding  $\beta$ -amyrin synthase from petroleum plant *Euphorbia tirucalli* L. *Phytochemistry*, 66(15), 1759–1766.
35. Kemen, A. C., Honkanen, S., Melton, R. E., Findlay, K. C., Mugford, S. T., Hayashi, K., ... Osbourn, A. (2014). Investigation of triterpene synthesis and regulation in oats reveals a role for  $\alpha$ -amyrin in determining root epidermal cell patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(23), 8679–8684.
36. Kharroubi, A. T. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, 6(6), 850.
37. Kleiman, A., & Tuckermann, J. P. (2007). Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: Lessons from conditional knockout mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1–2), 98–108.
38. Kumar, R., & Thompson, E. B. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*, 64(5), 310–319.
39. Kuo, T., McQueen, A., Chen, T., & Wang, J. (2015). Glucocorticoid Signaling, 872, 99–126.
40. Kushiro, T., Shibuya, M., Masuda, K., & Ebizuka, Y. (2000). Mutational studies on triterpene synthases: Engineering lupeol synthase into  $\beta$ -amyrin synthase. *Journal of the American Chemical Society*, 122(29), 6816–6824.
41. Lesovaya, E., Yemelyanov, A. I., Swart, A. C., Swart, P., Haegeman, G., & Budunova, I. (2015). Discovery of Compound A - a selective activator of the glucocorticoid receptor with anti-inflammatory and anti-cancer activity. *Oncotarget*, 6(31), 30730–30744.
42. Lima-Junior, R. C. P., Sousa, D. I. M., Brito, G. A. C., Cunha, G. M., Chaves, M. H., Rao, V. S. N., & Santos, F. A. (2007). Modulation of acute visceral nociception and bladder inflammation by plant triterpene,  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin in a mouse model of cystitis: Role of tachykinin NK1-receptors, and K<sup>+</sup>-ATP channels. *Inflammation Research*, 56(12), 487–494.
43. Link, J. T., Sorensen, B., Patel, J., Grynfarb, M., Goos-Nilsson, A., Wang, J., ... Jacobson, P. B. (2005). Antidiabetic activity of passive nonsteroidal glucocorticoid receptor modulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(16), 5295–5304.
44. Liu, Y., Cai, Y., Zhao, Z., Wang, J., Li, J., Xin, W., ... Xiang, F. (2009). Cloning and Functional Analysis of a beta-amyrin synthase gene associated with oleanolic acid biosynthesis in *Gentiana straminea* MAXIM. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(5), 818–824.
45. Liu, Y., Zhao, Z., Xue, Z., Wang, L., Cai, Y., Wang, P., ... Xiang, F. (2016). An Intronless  $\beta$ -amyrin Synthase Gene is More Efficient in Oleanolic Acid Accumulation than its Paralog in *Gentiana straminea*. *Scientific Reports*, 6(September), 33364.
46. Lu, N. Z., Collins, J. B., Grissom, S. F., & Cidlowski, J. A. (2007). Selective Regulation of Bone Cell Apoptosis by Translational Isoforms of the Glucocorticoid Receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 27(20), 7143–7160.
47. Matsuo, K., Nambu, T., Matsuda, Y., Kanai, Y., Yonemitsu, S., Muro, S., & Oki, S. (2013). Evaluation of the Effects of Exenatide Administration in Patients with Type 2 Diabetes with Worsened Glycemic Control Caused by Glucocorticoid Therapy. *Internal Medicine*, 52(1), 89–95.
48. Medeiros, R., Otuki, M. F., Avellar, M. C. W., & Calixto, J. B. (2007). Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene  $\alpha$ -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology*, 559(2–3), 227–235.
49. Melo, C. M., Carvalho, K. M. M. B., de Sousa Neves, J. C., Morais, T. C., Rao, V. S., Santos, F. A., ... Chaves, M. H. (2010).  $\alpha$ , $\beta$ -amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 16(34), 4272–4280.
50. Melo, C. M., Morais, T. C., Tomé, A. R., Brito, G. A. C., Chaves, M. H., Rao, V. S., & Santos, F. A. (2011). Anti-inflammatory effect of  $\alpha$ , $\beta$ -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflammation Research*, 60(7), 673–681.
51. Morita, M., Shibuya, M., Lee, M.-S., Sankawa, U., & Ebizuka, Y. (1997). Molecular Cloning of Pea cDNA Encoding Cycloartenol Synthase and Its Functional Expression in Yeast. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 20(7), 770–775.
52. Narender, T., Khaliq, T., Singh, A. B., Joshi, M. D., Mishra, P., Chaturvedi, J. P., ... Agarwal, S. C. (2009). Synthesis of  $\alpha$ -amyrin derivatives and their in vivo antihyperglycemic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(3), 1215–1222.
53. Nes, W. R., & Cannon, J. W. (1968). Concerning the mechanism and control of  $\alpha$ -amyrin biosynthesis. *Phytochemistry*, 7(8), 1321–1323.
54. Nixon, M., Andrew, R., & Chapman, K. E. (2013). It takes two to tango: Dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions. *Steroids*, 78(1), 59–68.
55. O'Brien, S. J. (2001). Cell culture forensics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 7656–7658.
56. Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: New mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *Journal of Biological Chemistry*, 286(5), 3177–3184.

57. Oliveira, F. A., Chaves, M. H., Almeida, F. R. C., Lima, R. C. P., Silva, R. M., Maia, J. L., ... Rao, V. S. (2005). Protective effect of  $\alpha$ - And  $\beta$ -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(1–2), 103–108.
58. Oliveira, F. A., Lima-Junior, R. C. P., Cordeiro, W. M., Vieira-Júnior, G. M., Chaves, M. H., Almeida, F. R. C., ... Rao, V. S. N. (2004). Pentacyclic triterpenoids,  $\alpha$ , $\beta$ -amyryns, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78(4), 719–725.
59. Patel, R., Williams-Dautovich, J., & Cummins, C. L. (2014). Minireview: New Molecular Mediators of Glucocorticoid Receptor Activity in Metabolic Tissues. *Molecular Endocrinology*, 28(7), 999–1011.
60. Perez, A., Jansen-Chaparro, S., Saigi, I., Bernal-Lopez, M. R., Miñambres, I., & Gomez-Huelgas, R. (2014a). Glucocorticoid-induced hyperglycemia. *Journal of Diabetes*, 6(1), 9–20.
61. Perez, A., Jansen-Chaparro, S., Saigi, I., Bernal-Lopez, M. R., Miñambres, I., & Gomez-Huelgas, R. (2014b). Glucocorticoid-induced hyperglycemia. *Journal of Diabetes*, 6(1), 9–20.
62. Phillips, D. R., Rasbery, J. M., Bartel, B., & Matsuda, S. P. (2006). Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 305–314.
63. Psarra, A. M. G., & Sekeris, C. E. (2008). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(1), 1–11.
64. R. Oakley, J. C. (2013). The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanism in Health and Disease. *J Allergy Clin Immunol*, 132(5), 1033–1044.
65. Ramamoorthy, S., Cidlowski, J. A., & Services, H. (2016). Action from Sensitivity to Resistance, 27709, 1–15.
66. Recio, M. del C., Giner, R. M., Mániz, S., & Rios, J. L. (1995). Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Medica*, 61, 182–185.
67. Rees, H. H., Britton, G., & Goodwin, T. W. (1968). The biosynthesis of beta-amyrin. Mechanism of squalene cyclization. *The Biochemical Journal*, 106(3), 659–65. Retrieved from
68. Rees, H. H., Mercer, E. I., & Goodwin, T. W. (1965). The Stereospecific Biosynthesis of Plant Sterols a and b Amyrin. *Biochemistry*, 99, 726–734.
69. Rhen, T., & Cidlowski, J. A. (2005). Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *New England Journal of Medicine*, 353(16), 1711–1723.
70. Saksida, T., Vujicic, M., Nikolic, I., Stojanovic, I., Haegeman, G., & Stosic-Grujicic, S. (2014). Compound A, a selective glucocorticoid receptor agonist, inhibits immunoinflammatory diabetes, induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *British Journal of Pharmacology*, 171(24), 5898–5909.
71. Salminen, A., Lehtonen, M., Suuronen, T., Kaarniranta, K., & Huuskonen, J. (2008). Terpenoids: Natural inhibitors of NF- $\kappa$ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(19), 2979–2999.
72. Santos, F., Frota, J., Arruda, B., de Melo, T., da Silva, A. A. de C. A., Brito, G. A. de C., ... Rao, V. (2012). Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in Health and Disease*, 11(1), 98.
73. Schacke, H., Berger, M., Rehwinkel, H., & Asadullah, K. (2007). Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): Novel ligands with an improved therapeutic index. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1–2), 109–117.
74. Schacke, H., Schottelius, A., Docke, W.-D., Strehlke, P., Jaroch, S., Schmees, N., ... Asadullah, K. (2004). Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(1), 227–232.
75. Schlossmacher, G., Stevens, A., & White, A. (2011). Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: Mechanisms of resistance in cancer cells. *Journal of Endocrinology*, 211(1), 17–25.
76. Scott, D. K., Strömstedt, P. E., Wang, J. C., & Granner, D. K. (1998). Further characterization of the glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. The role of the glucocorticoid receptor-binding sites. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 12(4), 482–91.
77. Sena, C. M., Bento, C. F., Pereira, P., & Seica, R. (2010). Diabetes mellitus: New challenges and innovative therapies. *EPMA Journal*, 1(1), 138–163.
78. Shah, K., Patel, D., Jadav, P., Sheikh, M., Sairam, K. V. V. M., Johrapurkar, A., ... Bahekar, R. (2012). Discovery of liver selective non-steroidal glucocorticoid receptor antagonist as novel antidiabetic agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(18), 5857–5862.
79. Shah, S. A. A., Tan, H. L., Sultan, S., Faridz, M. A. B. M., Shah, M. A. B. M., Nurfazilah, S., & Hussain, M. (2014). Microbial-catalyzed biotransformation of multifunctional triterpenoids derived from phytonutrients. *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 15).
80. Sheng, H., & Sun, H. (2011). Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: a multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. *Natural Product Reports*, 28(3), 543.
81. Shibuya, M., Katsube, Y., Otsuka, M., Zhang, H., Tansakul, P., Xiang, T., & Ebizuka, Y. (2009). Identification of a product specific  $\beta$ -amyrin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(1), 26–30.
82. Simão Da Silva, K. A. B., Paszcuk, A. F., Passos, G. F., Silva, E. S., Bento, A. F., Meotti, F. C., & Calixto, J. B. (2011). Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene  $\alpha$ , $\beta$ -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. *Pain*, 152(8), 1872–1887.
83. Singh, A. B., Yadav, D. K., Maurya, R., & Srivastava, A. K. (2009). Antihyperglycaemic activity of alpha-amyrin acetate in rats and db/db mice. *Natural Product Research*, 23(9), 876–882.
84. Smith, L. K., & Cidlowski, J. A. (2010). *Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. Progress in brain research* (Vol. 182). Elsevier B.V.

85. Sporn, M. B., Liby, K. T., Yore, M. M., Fu, L., Lopchuk, J. M., & Gribble, G. W. (2011). New synthetic triterpenoids: Potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. *Journal of Natural Products*, 74(3), 537–545.
86. Steven D. Carson and Samuel J. Pirruccello. (2010). HeLa Cell Heterogeneity and Cocksackievirus B3 Cytopathic Effect: Implications for Inter-laboratory Reproducibility of Results. *Anticancer Research*, 30(12), 4799–4804.
87. Sundahl, N., Bridelance, J., Libert, C., De Bosscher, K., & Beck, I. M. (2015). Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacology and Therapeutics*, 152, 28–41.
88. Tahrani, A. A., Bailey, C. J., Del Prato, S., & Barnett, A. H. (2011). Management of type 2 diabetes: New and future developments in treatment. *The Lancet*, 378(9786), 182–197.
89. Tan, H., Wang, W., Yin, X., Li, Y., & Yin, R. (2014). Identification of a selective glucocorticoid receptor ligand for the treatment of chronic inflammation in type 2 diabetes mellitus. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(4), 1111–1114.
90. Taylor, A. I., Frizzell, N., McKillop, A. M., Flatt, P. R., & Gault, V. A. (2009). Effect of RU486 on hepatic and adipocyte gene expression improves diabetes control in obesity-type 2 diabetes. *Hormone and Metabolic Research*, 41(12), 899–904.
91. Tetsuo KUSHIRO, M. S. and Y. E. T. (1998). Cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants, 244, 238–244.
92. Tomlinson, J. W., & Stewart, P. M. (2007). Modulation of glucocorticoid action and the treatment of type-2 diabetes. *Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism*, 21(4), 607–619.
93. van Raalte, D. H., & Diamant, M. (2014). Steroid diabetes: From mechanism to treatment? *Netherlands Journal of Medicine*, 72(2), 62–72.
94. Van Raalte, D. H., Ouwens, D. M., & Diamant, M. (2009). Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: Towards expansion of therapeutic options? *European Journal of Clinical Investigation*, 39(2), 81–93.
95. Vandevyver, S., Dejager, L., Tuckermann, J., & Libert, C. (2013). New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: An emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology*, 154(3), 993–1007.
96. Vázquez, L. H., Palazon, J., Navarro-ocaña, A., Metropolitana, A., Xochimilco, U., & Biológicos, D. S. (2011). The Pentacyclic Triterpenes  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyryns: A Review of Sources and Biological Activities. *Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, 426, 478–502.
97. Vegiopoulos, A., & Herzig, S. (2007). Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1–2), 43–61.
98. Vitor, C. E., Figueiredo, C. P., Hara, D. B., Bento, A. F., Mazzuco, T. L., & Calixto, J. B. (2009). Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes,  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyryn, in a mouse model of colitis. *British Journal of Pharmacology*, 157(6), 1034–1044.
99. Vollmer, T. R., Stockhausen, A., & Zhang, J. Z. (2012). Anti-inflammatory effects of mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, is partially mediated by MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1). *Journal of Biological Chemistry*, 287(42), 35212–35221.
100. Yan, X. J., Gong, L. H., Zheng, F. Y., Cheng, K. J., Chen, Z. S., & Shi, Z. (2014). Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. *Drug Discovery Today*, 19(4), 482–488.
101. Yudt, M. R., & Cidlowski, J. A. (2002). The Glucocorticoid Receptor: Coding a Diversity of Proteins and Responses through a Single Gene. *Molecular Endocrinology*, 16(8), 1719–1726.