Α΄ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ
ΚΕΝΤΡΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Π. Χρούσος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

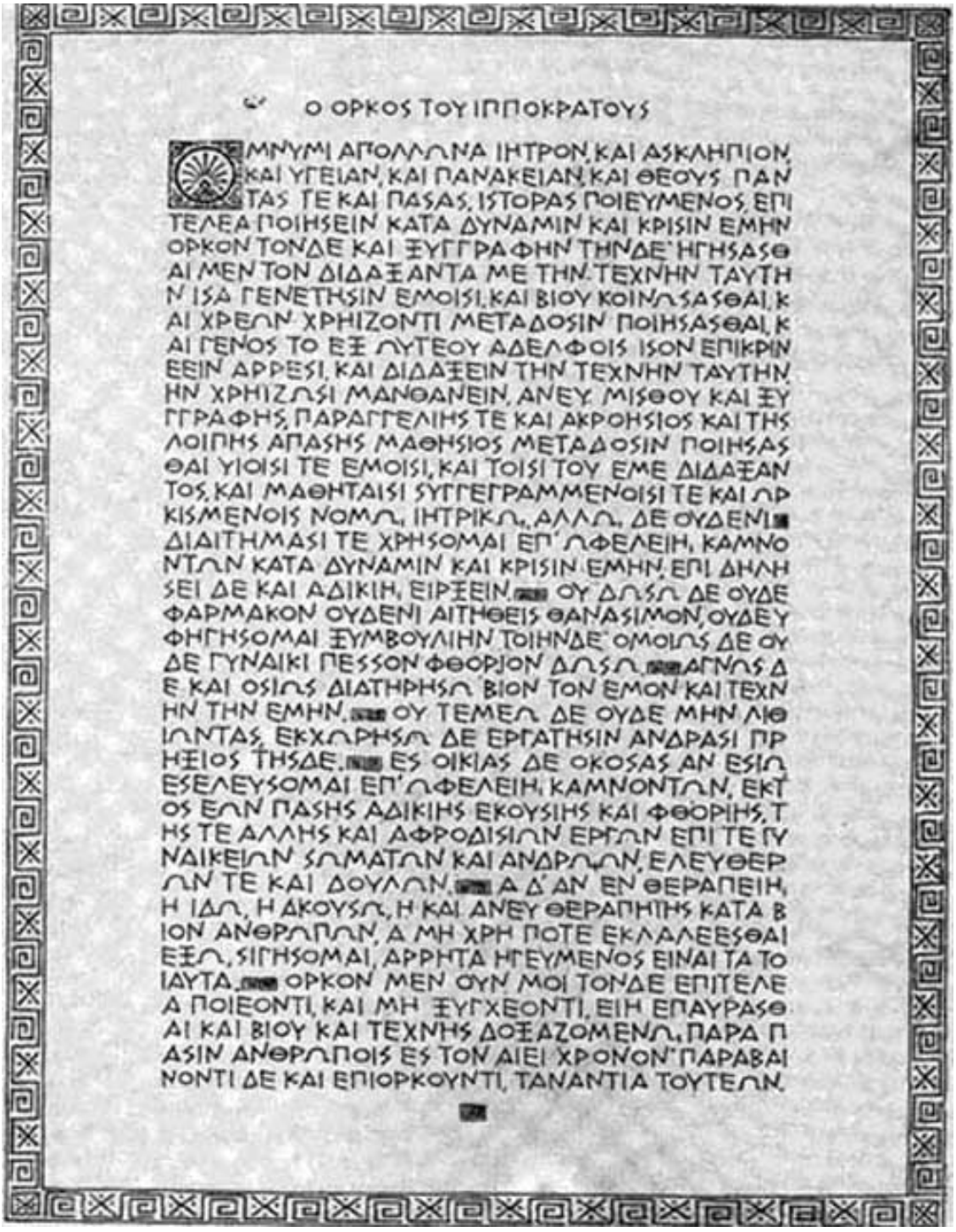
ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.

IN VITRO ΜΕΛΕΤΕΣ.

Νικόλας Χρ. Νικολαΐδης

Ιατρός

Αθήνα 2013



Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ, ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ· ΗΓΗΣΑΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΙΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΩΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΙΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΩΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΔΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ· ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΙΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ, Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ· ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

Ε Υ Ρ Ω Π Α Ϊ Κ Ο
Β Ι Ο Γ Ρ Α Φ Ι Κ Ο
Σ Η Μ Ε Ι Ω Μ Α

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ονοματεπώνυμο	**ΝΙΚΟΛΑΣ ΝΙΚΟΛΑΪΔΗΣ**
Διεύθυνση	**Παπαδιαμαντοπούλου 145, Τ.Κ. 11527, Γουδή, ΑΘΗΝΑ**
Τηλέφωνο	**6942952006**
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο	**nic3521@yahoo.com** **nnicolaides@bioacademy.gr**
Υπηκοότητα	Κυπριακή
Ημερομηνία γέννησης	12 Απριλίου 1979

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

• Ημερομηνίες	16 Οκτωβρίου 2008 - Σήμερα
• Εκπαιδευτικός Φορέας	**Α' Παιδιατρική Κλινική – Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία»** **Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών** **Εργαστήριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού – Κέντρο Κλινικής Έρευνας Ι.ΙΒ.Ε.Α.Α.** **Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Π. Χρούσος**
• Τίτλος	**Υποψήφιος Διδάκτωρ**

• Ημερομηνίες	Σεπτέμβριος 1999 – Δεκέμβριος 2007
• Εκπαιδευτικός Φορέας	**Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Ιατρικής**
• Τίτλος	**Πτυχίο Ιατρικής** Βαθμός: 8,39 «ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ»

• Ημερομηνίες	Σεπτέμβριος 1994 - 1997
• Εκπαιδευτικός Φορέας	**Λύκειο Κύκκου Α'**
• Τίτλος	**Απολυτήριο Λυκείου** Βαθμός: 19 9/11

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

• Ημερομηνίες	Δεκέμβριος 2007 – Σήμερα
• Χώρος	**Εργαστήριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού – Κέντρο Κλινικής Έρευνας Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών**
	Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Π. Χρούσος
• Κατάρτιση	**Κυτταροκαλλιέργειες**
	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
	Αλληλούχηση DNA
	Σημειακή Κατευθυνόμενη Μεταλλαξιγένεση
	Διαμολύνσεις Κυτταρικών Σειρών
	Στύπωμα κατά Western
	Ανοσοφθορισμός
	Δοκιμασίες μετατόπισης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στον πυρήνα
	Δοκιμασίες πρόσδεσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στο DNA
	Δοκιμασίες πρόσδεσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στη δεξαμεθαζόνη (ραδιενέργεια)
	Δοκιμασίες Glutathione-S-Transferase pull-down
	Μετασχηματισμός βακτηρίων
	Πολλαπλασιασμός και απομόνωση DNA
	Gel electrophoresis
	Σχεδιασμός primers, primer purification
	In vitro απομόνωση περιφερικών λεμφοκυττάρων με Ficoll paque
	Dexamethasone binding assays σε περιφερικά λεμφοκύτταρα
	Thymiding incorporation assays
	Δοκιμασίες συνανοσοκατακρήμνισης
• Ημερομηνίες	Δεκέμβριος 2000 – Δεκέμβριος 2004
• Χώρος	**Εργαστήριο Ανατομίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών**
	Διευθυντής: Καθηγητής Ιωάννης Βαράκης
• Κατάρτιση	**Ανοσοϊστοχημεία**
• Ημερομηνίες	Νοέμβριος 2002 – Ιούνιος 2005
• Πρόγραμμα	**ΠΕΝΕΔ 01 ΕΔ 377 Γενικής Γραμματείας Έρευνας Τεχνολογίας Υπουργείου Ανάπτυξης**
	Μετεμμηνοπαυσιακή Οστεοπόρωση
• Κατάρτιση	**Ωοθηκεκτομή επίμυων**
	Ανοσοϊστοχημεία
	Παρουσιάσεις Βιβλιογραφίας για τους Μοριακούς Μηχανισμούς της Μετεμμηνοπαυσιακής Οστεοπόρωσης

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

• Τίτλος	**Adrenal insufficiency**
• Συγγραφείς	Evangelia Charmandari, **Nicolas C. Nicolaides**, George P. Chrousos
• Journal	The Lancet (in press)
• Impact Factor	39.06 (Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012)
• Citations	0 (Scopus)

• Τίτλος	**A Novel Point Mutation in the DNA-Binding Domain (DBD) of the Human Glucocorticoid Receptor Causes Primary Generalized Glucocorticoid Resistance by Disrupting the Hydrophobic Structure of its DBD**
• Συγγραφείς	Michael L. Roberts, Tomoshige Kino, **Nicolas C. Nicolaides**, Darrell E. Hurt, Eleni Katsantoni, Amalia Sertedaki, Filadelfia Komianou, Korina Kassiou, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari
• Journal	Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2013; 98 (4): E790–E795
• Impact Factor	6.5 (Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011)
• Citations	0 (Scopus)
• Τίτλος	**Plasma Proteomic Analysis in Obese and Overweight Children**
• Συγγραφείς	Zoi Galata, George Moschonis, Manousos Makridakis, Ploumisti Dimitraki, **Nicolas C. Nicolaides**, Yannis Manios, Anastasia Bartzeliotou, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari
• Journal	European Journal of Clinical Investigation 2011; 41 (12): 1275-1283
• Impact Factor	2.736 (Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011)
• Citations	2 (Scopus)
• Τίτλος	**The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function**
• Συγγραφείς	**Nicolas C. Nicolaides**, Zoi Galata, Tomoshige Kino, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari
• Journal	Steroids 2010; 75: 1-12
• Impact Factor	2.829 (Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011)
• Citations	80 (Scopus)

ELECTRONIC JOURNALS

• Τίτλος Κεφαλαίου	**Adrenal Insufficiency**
• Συγγραφείς	**Nicolas C. Nicolaides**, Evangelia Charmandari, George P. Chrousos
• Σύγγραμμα	EndoText
• Χρονολογία	2011

ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

• Τίτλος	**Μια Νέα Σημειακή Μετάλλαξη Στην Περιοχή Πρόσδεσης Στο DNA Του Ανθρώπινου Υποδοχέα Των Γλυκοκορτικοειδών Προκαλεί Σύνδρομο Γενικευμένης Αντίστασης Στα Γλυκοκορτικοειδή (Σύνδρομο «ΧΡΟΥΣΟΣ»)**
• Συγγραφείς	**Ν.Χ. Νικολαΐδης**, M.L. Roberts, T. Kino, D.E. Hurt, Ε. Κατσαντώνη, Α. Σερτεδάκη, Γ.Π. Χρούσος, Ε. Χαρμανδάρη
• Συνέδριο	40^{ο} Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα
• Ημερομηνίες	17-20 Απριλίου 2013
• Τίτλος	**Ταυτοποίηση Και Λειτουργικός Χαρακτηρισμός Μιας Νέας Σημειακής Μετάλλαξης Στο Γονίδιο Του Ανθρώπινου Υποδοχέα Των Γλυκοκορτικοειδών, η Οποία Προκαλεί Σύνδρομο Γενικευμένης Αντίστασης Στα Γλυκοκορτικοειδή (Σύνδρομο «ΧΡΟΥΣΟΣ»)**
• Συγγραφείς	**Ν.Χ. Νικολαΐδης**, M.L. Roberts, T. Kino, Geoff Braatvedt, Ε. Κατσαντώνη, Α. Σερτεδάκη, Γ.Π. Χρούσος, Ε. Χαρμανδάρη
• Συνέδριο	40^{ο} Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα
• Ημερομηνίες	17-20 Απριλίου 2013

• Τίτλος	**Functional characterization of a novel mutation in the hGR gene causing primary generalized glucocorticoid resistance**
• Συγγραφείς	Michael L. Roberts, **Nicolas C. Nicolaides**, Tomoshige Kino, Eleni Katsantoni, Amalia Sertedaki, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari
• Συνέδριο	51st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Leipzig, Germany
• Ημερομηνίες	20-23 Σεπτεμβρίου 2012
• Τίτλος	**Plasma proteomic analysis in obese and overweight children**
• Συγγραφείς	Zoi Galata, George Moschonis, Manousos Makridakis, Ploumisti Dimitraki, **Nicolas C. Nicolaides,** George P Chrousos, Yannis Manios, Antonia Vlahou, Evangelia Charmandari
• Συνέδριο	49th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Prague
• Ημερομηνίες	22-25 Σεπτεμβρίου 2010

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

• Τίτλος	**Μοριακοί μηχανισμοί σηματοδότησης μιας νέας σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, η οποία προκαλεί Σύνδρομο Γενικευμένης Αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή (Σύνδρομο «ΧΡΟΥΣΟΣ»)**
• Συγγραφείς	**Ν. Χ. Νικολαΐδης**, Α. Σερτεδάκη, Γ. Π. Χρούσος, Ε. Χαρμανδάρη
• Συνέδριο	40ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα
• Ημερομηνίες	17-20 Απριλίου 2013
• Τίτλος	**Ο ρόλος της S-Παλμιτυλίωσης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στη διαμεσολάβηση των μη γενωμικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών**
• Συγγραφείς	**Ν.Χ. Νικολαΐδης**, M.L. Roberts, T. Kino, Ε. Κατσαντώνη, Α. Σερτεδάκη, Γ.Π. Χρούσος, Ε. Χαρμανδάρη
• Συνέδριο	40ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα
• Ημερομηνίες	17-20 Απριλίου 2013
• Τίτλος	**Παροδική Γενικευμένη Υπερευαισθησία στα Γλυκοκορτικοειδή: Κλινικές εκδηλώσεις και Μεταγραφωμικό προφίλ**
• Συγγραφείς	**Ν.Χ. Νικολαΐδης**, Ε. Κατσαντώνη, Π. Τριανταφύλλου, Α. Χριστοφορίδης, Γ. Κατζός, T. Kino, Α. Σερτεδάκη, Γ.Π. Χρούσος, Ε. Χαρμανδάρη
• Συνέδριο	40ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα
• Ημερομηνίες	17-20 Απριλίου 2013
• Τίτλος	**The role of S-palmitoylation of human glucocorticoid receptor in mediating the nongenomic actions of glucocorticoids**
• Συγγραφείς	**Nicolas C. Nicolaides**, Michael L. Roberts, Tomoshige Kino, Eleni Katsantoni, Amalia Sertedaki, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari
• Συνέδριο	51st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Leipzig, Germany
• Ημερομηνίες	20-23 Σεπτεμβρίου 2012

• Τίτλος	**Transient Generalized Glucocorticoid Hypersensitivity: Clinical manifestations and transcriptomics profile**
• Συγγραφείς	Evangelia Charmandari, Eleni Katsantoni, Panagiota Triantafyllou, Athanasios Christoforidis, George Katzos, Tomoshige Kino, **Nicolas C. Nicolaides**, Amalia Sertedaki, George P. Chrousos
• Συνέδριο	51st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Leipzig, Germany
• Ημερομηνίες	20-23 Σεπτεμβρίου 2012
• Τίτλος	**Molecular mechanisms of action of a novel point mutation in the human glucocorticoid receptor gene causing Primary Generalized Glucocorticoid Resistance**
• Συγγραφείς	**Nicolas C. Nicolaides**, Amalia Sertedaki, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari
• Συνέδριο	51st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Leipzig, Germany
• Ημερομηνίες	20-23 Σεπτεμβρίου 2012
• Τίτλος	**Novel Mutation in Glucocorticoid Receptor Gene Causing Primary Generalized Glucocorticoid Resistance (Chrousos syndrome)**
• Συγγραφείς	**Nicolas C. Nicolaides**, Eliza Geer, Amalia Sertedaki, Evangelia Charmandari
• Συνέδριο	50th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Glasgow
• Ημερομηνίες	25-28 Σεπτεμβρίου 2011
• Τίτλος	**Novel Mechanisms of Primary Generalized Glucocorticoid Resistance or Chrousos Syndrome**
• Συγγραφείς	Michael L. Roberts, Tomoshige Kino, **Nicolas C. Nicolaides**, Eleni Katsantoni, Amalia Sertedaki, Evangelia Charmandari
• Συνέδριο	50th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Glasgow
• Ημερομηνίες	25-28 Σεπτεμβρίου 2011
• Τίτλος	**Plasma proteomic analysis in obese and overweight children**
• Συγγραφείς	Zoi Galata, George Moschonis, Manousos Makridakis, Ploumisti Dimitraki, **Nicolas C. Nicolaides**, Yannis Manios, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari.
• Συνέδριο	International Conference on Healthy Agriculture, Healthy Nutrition and Healthy People, Olympia
• Ημερομηνίες	5-8 Οκτωβρίου 2010
• Τίτλος	**Obese Children Demonstrate Alterations in the Expression of Lipoproteins and Coagulation Factors in Plasma Proteomic Analysis**
• Συγγραφείς	Zoi Galata, George Moschonis, Manousos Makridakis, Ploumisti Dimitraki, B, **Nicolas C. Nicolaides**, George P. Chrousos, Yannis Manios, Antonia Vlahou, Evangelia Charmandari.
• Συνέδριο	LWPES / ESPE 8th Joint Meeting (New York City)
• Ημερομηνίες	9-12 Σεπτεμβρίου 2009
• Τίτλος	**A Novel Point Mutation in the Ligand-binding Domain of the Human Glucocorticoid Receptor Gene Causing Primary Generalized Glucocorticoid Resistance**
• Συγγραφείς	Amalia Sertedaki, Geoff Braatvedt, Zoi Galata, **Nicolas C. Nicolaides**, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari.
• Συνέδριο	LWPES / ESPE 8th Joint Meeting (New York City)
• Ημερομηνίες	9-12 Σεπτεμβρίου 2009

ΜΕΤΑΦΡΑΣΕΙΣ

• Τίτλος Βιβλίου	**«ΒΑΣΙΚΗ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗ ΜΕ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΗΝ ΕΠΙΛΥΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ» Steven Ryan, Jackie Gregg, Leena Patel.**
• Επίβλεψη	Στέφανος Μανταγός, Καθηγητής Παιδιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών
• Εκδοτικός Οίκος	GOTSIS Εκδόσεις
• Δραστηριότητα	Μετάφραση τριών κεφαλαίων Παιδιατρικής από την Αγγλική στην Ελληνική γλώσσα

ΕΠΙΧΟΡΗΓΗΣΕΙΣ

• Πρόγραμμα	**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ**
• Προκήρυξη	Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρεία – Παιδοενδοκρινολογία - 2013
Κύριος Ερευνητής	Ευαγγελία Χαρμανδάρη
• Τίτλος	**Μοριακοί μηχανισμοί ευαισθησίας των ιστών στα γλυκοκορτικοειδή**
• Χρηματοδότηση	€5000
• Πρόγραμμα	**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ**
• Προκήρυξη	Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρεία – Παιδοενδοκρινολογία - 2011
Κύριος Ερευνητής	Ευαγγελία Χαρμανδάρη
• Τίτλος	**Μοριακοί μηχανισμοί μη γενωμικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών**
• Χρηματοδότηση	€5000
• Πρόγραμμα	**ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΣ 70/4/9017**
• Προκήρυξη	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Κύριος Ερευνητής	Γεώργιος Π. Χρούσος
• Τίτλος	**Μοριακοί μηχανισμοί δράσης μεμβρανικών υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών**
• Χρηματοδότηση	€1250

ΒΡΑΒΕΙΑ –ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

• Ημερομηνία	20 Απριλίου 2013
• Βραβείο	**Α. ΦΑΡΜΑΚΙΩΤΗ**
• Αιτία	Καλύτερη Αναρτημένη Ανακοίνωση στο 40^{ο} Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού
• Οργάνωση	Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρεία - Πανελλήνια Ένωση Ενδοκρινολόγων
• Ημερομηνία	1 Δεκεμβρίου 2008
• Βραβείο	**ΤΙΜΗΤΙΚΗ ΔΙΑΚΡΙΣΗ**
• Αιτία	1^{ος} Αποφοιτήσας Ιατρός με την υψηλότερη βαθμολογία για το ακαδημαϊκό έτος 2007-2008
• Οργάνωση	Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών
• Ημερομηνία	4 Ιουλίου 1996
• Διαγωνισμός	Παγκύπριος Διαγωνισμός για Νεαρούς Ερευνητές
• Βραβείο	**ΠΡΩΤΟ ΒΡΑΒΕΙΟ**
• Εργασία - Έρευνα	« Μελέτη της Κληρονομικότητας του Λοβού του Αυτιού στον Άνθρωπο »
• Οργάνωση	Κυπριακή Εταιρεία Επιστημών

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

• Ημερομηνία	1 Σεπτεμβρίου 2010 – 31 Αυγούστου 2013
• Οργανισμός	Υπουργείο Παιδείας, Δια Βίου Μάθησης και Θρησκευμάτων
• Υποτροφία	**ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ ΙΙ**
• Ημερομηνία	26 Νοεμβρίου 2008
• Οργανισμός	GlaxoSmithKline α.ε.β.ε.
• Υποτροφία	**GlaxoSmithKline για Μεταπτυχιακές Σπουδές στο Εξωτερικό**
• Ημερομηνία	2000-2001
• Οργανισμός	Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών Ελλάδος
• Υποτροφία	**Πρώτο Βραβείο Β' Έτους Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών**
• Ημερομηνία	1999-2000
• Οργανισμός	Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών Ελλάδος
• Υποτροφία	**Πρώτο Βραβείο Α' Έτους Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Πατρών**

ΟΜΙΛΙΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ/ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ/ ΗΜΕΡΙΔΕΣ

• Ημερομηνίες	4 Ιουνίου 2011
• Διοργάνωση	Ελληνική Αιματολογική Εταιρεία
• Συνέδριο/Σεμινάριο/Ημερίδα	**Ενημερωτική Εκδήλωση για τον Εθελοντισμό**
• Τίτλος Ομιλίας	**«Δότες Αιμοπεταλίων - Εθελοντική Αιμοπεταλιοαφαίρεση»**
• Ημερομηνίες	10 Απριλίου 2005
• Διοργάνωση	Φιλεκπαιδευτική Εταιρεία Αιγίου Ιατρικός Σύλλογος Αιγίου
• Συνέδριο/Σεμινάριο/Ημερίδα	**Ημερίδα : « Προληπτική Ιατρική σε Παιδιά, Νέους και Εφήβους »**
• Τίτλος Ομιλίας	«**Οι Δηλητηριάσεις στα Παιδιά**»
• Ημερομηνίες	22-27 Ιουνίου 2004
• Διοργάνωση	Ελληνική Ιατρική Εταιρεία Τεχνολογίας και Πληροφορικής
• Συνέδριο/Σεμινάριο/Ημερίδα	**2° Πανελλήνιο Συνέδριο με διεθνή συμμετοχή: «Σύγχρονη Τεχνολογία–Αυριανή Ιατρική και Υγεία»**
• Τίτλος Ομιλίας	**«NF- κΒ και Καρκινογένεση: Επιλεκτική Μοριακή Στόχευση»**
• Ημερομηνίες	9-11 Μαϊου 2003
• Διοργάνωση	Επιστημονική Εταιρεία Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας
• Συνέδριο/Σεμινάριο/Ημερίδα	**9ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδας**
• Τίτλος Ομιλίας	**«Γονιδιακή Θεραπεία στην Ισχαιμική Μυοκαρδιοπάθεια»**
• Ημερομηνίες	16 Απριλίου 2003
• Διοργάνωση	Καρδιοθωρακοχειρουργική Κλινική Πανεπιστημίου Πατρών
• Συνέδριο/Σεμινάριο/Ημερίδα	**« 7° Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο στην Καρδιοθωρακοχειρουργική που διοργανώνεται από τους Τεταρτοετείς Φοιτητές »**
• Τίτλος Ομιλίας	**«Γονιδιακή Θεραπεία στην Ισχαιμική Μυοκαρδιοπάθεια»**

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΑ COURSES

• Ημερομηνίες 16-19 Μαΐου 2012
• Διοργάνωση **European Society for Pediatric Endocrinology**
• Τίτλος **ESPE Science School "Stress Response and Child Health"**

• Ημερομηνίες 6-7 Οκτωβρίου 2011
• Διοργάνωση **BSRC Alexander Fleming, Athens**
• Τίτλος **Workshop on Functional and Structural Proteomics**

• Ημερομηνίες 8-10 Οκτωβρίου 2010
• Διοργάνωση **European Society for Clinical Investigation (ESCI)**
• Τίτλος **ESCI Intensive Course on the Principles & Practice of Clinical Research**

• Ημερομηνίες 22 Σεπτεμβρίου 2008 – 03 Οκτωβρίου 2008
• Διοργάνωση **BSRC Alexander Fleming, Athens – Utrecht University, The Netherlands**
• Τίτλος **Course on Laboratory Animal Science, FELASA C**
Grade 7,5 (on a scale from 1 to 10)

• Ημερομηνίες 26 Μαϊου 2005
• Διοργάνωση **European Thyroid Association**
• Τίτλος **Scientific Workshop "Functional Genomics in Thyroid Research: The Methods Under Scrutiny"**

ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

• Ημερομηνίες 27 Απριλίου 2013
• Διοργάνωση Θεραπευτική Κλινική Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών
• Τίτλος **Θεραπευτικές Εξελίξεις 2013**

• Ημερομηνίες 9 Φεβρουαρίου 2013
• Διοργάνωση Ελληνική Εταιρεία Παιδικής & Εφηβικής Ενδοκρινολογίας
• Τίτλος **Γλυκοκορτικοειδή-Αλατοκορτικοειδή. Νέες Θεραπείες στην Παιδιατρική Ενδοκρινολογία**

• Ημερομηνίες 24 Οκτωβρίου 2012
• Διοργάνωση Ελληνική Ιατρική Εταιρεία Παχυσαρκίας και Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών
• Τίτλος **«Παιδική Παχυσαρκία»**

• Ημερομηνίες 20-23 September 2012
• Διοργάνωση European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE)
• Τίτλος **51st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology**

• Ημερομηνίες 21-22 Απριλίου 2012
• Διοργάνωση Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών
• Τίτλος **45η Παιδιατρική Θεραπευτική Ενημέρωση**

• Ημερομηνίες 10 Μαρτίου 2012
• Διοργάνωση Neonatal Division, 2nd Department of Obstetrics & Gynecology
• Τίτλος **3rd Maria Delivoria-Papadopoulos Perinatal Symposium "Intrauterine growth restriction-Fetal programming"**

• Ημερομηνίες 2-4 Μαρτίου 2012
• Διοργάνωση Ελληνικό Κολλέγιο Παιδιάτρων
• Τίτλος **1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναπτυξιακής-Συμπεριφορικής Παιδιατρικής & Εφηβικής Ιατρικής**

• Ημερομηνίες 4 Φεβρουαρίου 2012
• Διοργάνωση Ελληνική Εταιρεία Παιδικής και Εφηβικής Ενδοκρινολογίας
• Τίτλος **Ανδρογόνα στην Παιδοενδοκρινολογία**

• Ημερομηνίες 9-11 Δεκεμβρίου 2011
• Διοργάνωση Ελληνική Εταιρεία Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας
• Τίτλος **62ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας**

• Ημερομηνίες 3 Δεκεμβρίου 2011
• Διοργάνωση Ελληνική Εταιρεία Παιδιατρικής Γαστρεντερολογίας, Ηπατολογίας & Διατροφής
• Τίτλος **11ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Παιδιατρικής Γαστρεντερολογίας**

• Ημερομηνίες 12 – 13 Οκτωβρίου 2011
• Διοργάνωση Ελληνική Εταιρεία Παιδιατρικών Λοιμώξεων
• Τίτλος **15η Επιστημονική Συνάντηση Παιδιατρικών Λοιμώξεων**

• Ημερομηνίες 1 Οκτωβρίου 2011
• Διοργάνωση Ελληνικό Κολλέγιο Παιδιάτρων
Ιατρείο Μεταβολικών Νοσημάτων &
Εργαστήριο Μεταβολικών Νοσημάτων Χωρεμείου Ερευνητικού Κέντρου
• Τίτλος **2ο Πανελλήνιο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο: «Ενδογενή Νοσήματα Μεταβολισμού σε Παιδιά, Εφήβους & Ενήλικες: Από το Σύμπτωμα στη Διάγνωση. Μιτοχονδριακά Νοσήματα»**

• Ημερομηνίες 27-28 Μαΐου 2011
• Διοργάνωση Hellenic College of Pediatrics
The Royal Society of Medicine
• Τίτλος **1st Joint Conference of the Hellenic College of Pediatrics and The Royal Society of Medicine**

• Ημερομηνίες 30 Απριλίου -1 Μαΐου 2011
• Διοργάνωση Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών
• Τίτλος **44η Παιδιατρική Θεραπευτική Ενημέρωση**

• Ημερομηνίες 18-19 Μαρτίου 2011
• Διοργάνωση Α' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών
Β' Παιδιατρική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών
• Τίτλος **2ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής Αιματολογίας**

• Ημερομηνίες 25-26 Φεβρουαρίου 2011
• Διοργάνωση Ελληνική Ιατρική Εταιρεία Παχυσαρκίας
• Τίτλος **7η Επιστημονική Διημερίδα Παχυσαρκίας**

• Ημερομηνίες 22 Ιανουαρίου 2011
• Διοργάνωση Ελληνική Εταιρεία Παιδικής και Εφηβικής Ενδοκρινολογίας
• Τίτλος **«Καινούργια Δεδομένα στην Αιτιοπαθογένεια και Θεραπεία του Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1 και Τύπου 2 στα Παιδιά»**

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ

ΜΗΤΡΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ **ΕΛΛΗΝΙΚΗ**

ΑΛΛΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

ΑΓΓΛΙΚΗ

• Ικανότητα ανάγνωσης Επίπεδο: εξαιρετικό

• Ικανότητα γραφής Επίπεδο: εξαιρετικό

• Ικανότητα ομιλίας Επίπεδο: εξαιρετικό

• Πιστοποιητικά
- G.C.E. (English Language- ordinary level, General Certificate of Education Examination, University of London) με βαθμό "C", 1996.
- First Certificate In English (University of Cambridge) με βαθμό ''C'',1995.

ΓΑΛΛΙΚΗ

• Ικανότητα ανάγνωσης Επίπεδο: καλό

• Ικανότητα γραφής Επίπεδο: καλό

• Ικανότητα ομιλίας Επίπεδο: καλό

• Πιστοποιητικό
- D.E.L.F.(Diplome d' Études en Langue Française), Unité AI : Expression générale.
- D.E.L.F.(Diplome d' Études en Langue Française), Unité A4 : Pratique du fonctionnement de la langue.
- D.E.L.F.(Diplome d' Études en Langue Française), Unité A2
- D.E.L.F.(Diplome d' Études en Langue Française), Unité A3

ΜΕΛΟΣ
.
- **Ελληνική Ιατρική Εταιρεία Παχυσαρκίας** (από 8/4/2011 ως σήμερα)
- **Ιατρικός Σύλλογος Αθηνών** (από 01/9/2009 ως σήμερα)
- **The Endocrine Society** (από 10/5/2008 ως σήμερα)

ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ
.

Συντονιστής – Ιδρυτής Επιτροπής ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ Εθνικής Φοιτητικής Ένωσης Κυπρίων Αθήνας
- Διοργάνωση Αιμοδοσίας (Μάιος 2008, Νοέμβριος 2008, Μάιος 2009, Νοέμβριος 2009, Μάιος 2010, Νοέμβριος 2010, Μάιος 2011, Νοέμβριος 2011, Μάιος 2012, Νοέμβριος 2012)

Συντονιστής – Ιδρυτής Επιτροπής ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ Φοιτητικής Ένωσης Κυπρίων Πάτρας
- Διοργάνωση Αιμοδοσίας (Νοέμβριος 2002, Μάιος 2003, Νοέμβριος 2003, Μάιος 2004, Νοέμβριος 2004, Μάιος 2005, Νοέμβριος 2005, Μάιος 2006, Νοέμβριος 2006, Μάιος 2007).
- Διοργάνωση Δειγματοληψίας Μυελού των Οστών με προσέλευση 122 ατόμων.
- Δημιουργία ομάδας Δοτών Αιμοπεταλίων.

ΚΑΛΛΙΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ
.
- Πτυχιούχος Βυζαντινής Μουσικής
- Οργανοπαίκτης Κιθάρας

Πρόλογος

Ήμουνα, τότε, δευτεροετής φοιτητής στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών και παρακολουθούσα τις διαλέξεις της Βιοχημείας. Ένζυμα, αντιδράσεις, χημικοί τύποι… Οι τελευταίες διαλέξεις δόθηκαν από τον τότε Καθηγητή της έδρας, τον κύριο Αθανάσιο Παπαβασιλείου, νυν Καθηγητή της Βιολογικής Χημείας στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι διαλέξεις αυτές είχαν ως αντικείμενο τη μεταγωγή σήματος. «Οι γιατροί πρέπει να καταλάβετε ένα πράγμα: Αφήστε τα νυστέρια και πιάστε τα μόρια!» Αυτή η νουθεσία άλλαξε ριζικά τον τρόπο σκέψης μου. Κι από τότε, ενώ ήμουνα υποστηριχτής της Παιδοχειρουργικής, αποφάσισα να ακολουθήσω μελλοντικά την Παιδιατρική Ενδοκρινολογία, μία εκ των υποειδικοτήτων της Παιδιατρικής με πλούσιο μοριακό υπόβαθρο!

Πέρασαν κιόλας σχεδόν 6 χρόνια από εκείνο το όμορφο πρωινό του Δεκεμβρίου που ήρθα στο Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, ένα ερευνητικό ίδρυμα που κοσμεί το επιστημονικό στερέωμα στην καρδιά του Παπάγου. Ήρθα ως υποψήφιος διδάκτορας χωρίς να γνωρίζω καμία τεχνική μοριακής βιολογίας. Τα μόνα μου εφόδια: η αγάπη και η αφοσίωση στην έρευνα, στην επιστήμη! Ανάμεσα σε τόσους βιολόγους, ανυπομονούσα πότε θα μάθω όσα αυτοί ήξεραν! Έξι χρόνια μετά, έμαθα σημαντικές τεχνικές κι απέκτησα εμπειρία στον πάγκο μέσα από την καθημερινή σκληρή τριβή στο χώρο του εργαστηρίου. Το πιο σημαντικό: έμαθα να σκέφτομαι και να αξιοποιώ τα εργαλεία της μοριακής βιολογίας στην απάντηση ενός επιστημονικού ερωτήματος.

Από τη θέση αυτή, θα ήθελα να εκφράσω τις ολόθερμες ευχαριστίες μου, την αιώνια ευγνωμοσύνη μου και τον σεβασμό μου στον επιστημονικό υπεύθυνο της διδακτορικής μου διατριβής, τον Καθηγητή κύριο Γεώργιο Π. Χρούσο, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναθέτοντάς μου το θέμα της παρούσας διατριβής. Αισθάνομαι πραγματικά υπερήφανος που διετέλεσα (διατελώ και θα διατελώ) μαθητής του και νιώθω πολύ τυχερός για όλες τις ευκαιρίες που μου έδωσε να μάθω, να διευρύνω τον επιστημονικό μου ορίζοντα και να γνωρίσω επιστήμονες παγκοσμίου φήμης. Η ευγένεια, η εργατικότητα και ο επαγγελματισμός, τα τρία «Ε» όπως τα έλεγε ο Καθηγητής Χρούσος, διαφυλάχθηκαν από το πρόσωπό μου ως κόρη οφθαλμού.

Νιώθω ιδιαίτερη συγκίνηση, ερχόμενος στο σημείο να ευχαριστήσω με όλη τη δύναμη της ψυχής μου, τον άνθρωπο που με εκπαίδευσε στον πάγκο περνώντας αμέτρητες ώρες δίπλα μου όταν έκανα τα πρώτα μου πειράματα. Τον άνθρωπο που με εμψύχωνε όταν δείλιαζα να δοκιμάσω μια καινούρια τεχνική, όταν έγραφα το πρώτο μου paper, όταν έκανα τις πρόβες για τις παρουσιάσεις μου σε Πανελλήνια και Πανευρωπαϊκά Συνέδρια. Ήταν πάντα εκεί! Για να μου υπενθυμίζει, με την πολυετή κι επιτυχημένη της πορεία, ότι τίποτα δεν χαρίζεται! Όλα κερδίζονται, αρκεί να πιστεύεις σε αυτό που κάνεις και να το αγαπάς! Είναι τόσα πολλά που θέλω να γράψω για την υπεύθυνή μου, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κυρία Ευαγγελία Χαρμανδάρη! Θέλω να

πιστεύω ότι η παρούσα διατριβή επιβραβεύει τις άοκνες προσπάθειές της τόσο για την δική μου επιστημονική πρόοδο όσο και για την πρόοδο του Εργαστηρίου μας. Ένα μεγάλο κι εγκάρδιο ευχαριστώ για όλα!

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Βιοχημείας κυρία Παρασκευή Μουτσάτσου, μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τις εποικοδομητικές συζητήσεις που είχαμε όλο αυτό το διάστημα και για την εμψύχωσή της.

Θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες προς την Ερευνήτρια Δ' κυρία Ελένη Κατσαντώνη και την βιολόγο Βασιλική Λάζου για την εκπαίδευση σε βασικές τεχνικές μοριακής βιολογίας. Ευχαριστώ, επίσης, τον Michael Roberts και την Λίνα Παπαδημητρίου για την εκπαίδευση στις διαμολύνσεις κυτταρικών σειρών και στον ανοσοφθορισμό.

Ευχαριστώ τη διοίκηση και το προσωπικό του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών για τον εξοπλισμό και την παροχή υπηρεσιών που διευκόλυναν σε μεγάλο βαθμό τα πειράματα της διδακτορικής διατριβής.

Από το Χωρέμειο Ερευνητικό Εργαστήριο ευχαριστώ θερμά την αγαπητή Αμαλία Σερτεδάκη για τις αλληλουχήσεις του γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που μας χάρισαν πολλά παράλληλα projects, αλλά και για την άριστη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια.

Από το NIH, εκφράζω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου προς τον Dr. Tomoshige Kino για την επιστημονική του καθοδήγηση και την αποστολή πλασμιδίων.

Ευχαριστώ θερμά την γραμματέα κυρία Έλλη Παπαδημητρίου για την καθοδήγηση στα γραφειοκρατικά θέματα της διδακτορικής διατριβής.

Συνοδοιπόρος, τόσο κατά την πορεία όσο και κατά την συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής, στάθηκε αταλάντευτη η αρραβωνιαστικιά μου Σταύρη! Την ευχαριστώ θερμά για όλη την υποστήριξη και την εμψύχωση στον ανηφορικο αυτό αγώνα!

Τέλος, ευχαριστώ για όλα τους αξιαγάπητους γονείς μου, Χρύσανθο και Μαρία, στους οποίους αφιερώνω την παρούσα διδακτορική διατριβή! Το ήθος που με δίδαξαν όλα αυτά τα χρόνια είναι το κλειδί της επιτυχίας!

Πρόλογος

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Περιεχόμενα

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ……...3

ΠΡΟΛΟΓΟΣ……13

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ……..16

ΠΕΡΙΛΗΨΗ……..19

ABSTRACT…….....22

ΕΙΚΟΝΕΣ……..24

ΠΙΝΑΚΕΣ……31

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ……32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ……...36

1.1 ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ……36

1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ……38

1.2.1 Πυρηνικοί υποδοχείς……38

1.2.2 Εξέλιξη του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών……40

1.2.3 Γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών……..41

1.2.4 Πρωτεΐνη του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών……42

1.2.5 Ισομορφές της πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών……...48

Ισομορφές οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα……48

hGRβ……...48

Ισομορφές hGRγ, hGRA και hGRP……51

Ισομορφές οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης…….....52

1.2.6 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών……55

Φωσφορυλίωση……56

Ουμπικουϊτινυλίωση……57

Σουμοϋλίωση……58

Ακετυλίωση……...58

1.3 ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ……61

1.3.1 Άξονας μεταγωγής σήματος των γλυκοκορτικοειδών……...61

1.3.2 Αλληλεπίδραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες……64

Περιεχόμενα

Nuclear Factor κB (NF-κB)……..66

Activator Protein-1 (AP-1)……...67

cAMP-Responsive Element-Binding Protein (CREB)……...67

Smad6……68

CAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP)……68

Liver-X-Receptor (LXR)……..69

Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες……69

1.3.3 Αλληλεπίδραση με το μη-κωδικοποιό RNA Growth Arrest-specific 5 (Gas5)…...70

1.3.4 Οι γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών ως ομοιοστατικό σύστημα……71

1.4 ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ……73

1.4.1 Μηχανισμοί μη γενωμικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών……75

1.4.1.1 Μη γενωμικές δράσεις χωρίς την εμπλοκή υποδοχέα……...77

1.4.1.2 Μη γενωμικές δράσεις μέσω κλασικών ενδοκυττάριων υποδοχέων……...77

1.4.1.3 Μη γενωμικές δράσεις μέσω μη κλασικών υποδοχέων……...78

1.5 ΠΑΛΜΙΤΥΛΙΩΣΗ……...79

1.5.1 Αγκυροβόληση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών στην κυτταρική μεμβράνη……79

1.5.2 Παλμιτυλίωση……...80

1.5.3 Παλμιτυλίωση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών……81

1.5.4 Μοτίβο παλμιτυλίωσης στον hGRα……84

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ……..89

ΥΛΙΚΑ……...89

ΜΕΘΟΔΟΙ……92

Α. Πλασμίδια……...92

Β. Κυτταρικές σειρές……..92

Γ. Τεχνικές……...93

1. Σημειακή Κατευθυνόμενη Μεταλλαξιγένεση με Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR-assisted Site-Directed Mutagenesis)……93

2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή συγκέντρωση (Miniprep)……98

3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πλασμιδιακού DNA……100

4. Αλληλούχηση επιλεγμένων δειγμάτων πλασμιδιακού DNA……...101

5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη συγκέντρωση (Maxiprep και Megaprep)...103

6. Πάγωμα υγρών καλλιεργειών βακτηρίων με μεταλλαγμένο πλασμιδιακό DNA……..104

7. Κυτταρικές καλλιέργειες……105

8. Δοκιμασίες ενεργοποίησης (Transactivation Assays)……..108

9. Στύπωμα κατά Western (Western Blotting)……109

Περιεχόμενα

10. Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence)……116

11. Υποκυτταρική κλασμάτωση……120

12. Δοκιμασίες μετατόπισης του υποδοχέα στον πυρήνα (Nuclear Translocation Studies)……121

13. Μελέτες ενεργοποίησης κινασών……122

14. Μελέτες παλμιτυλίωσης……...123

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΚΟΠΟΣ……126

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ……127

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ……146

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ……158

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ-ΒΡΑΒΕΙΑ……..178

Περίληψη

Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν μέλη της οικογένειας των στεροειδών ορμονών τα οποία ασκούν ποικιλοτρόπες δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (hGR, human glucocorticoid receptor), ο οποίος δρα ως μεταγραφικός παράγοντας επάγοντας ή καταστέλλοντας την έκφραση γονιδίων-στόχων. Εκτός από τις γενωμικές δράσεις, τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν ορισμένες ταχείες μη γενωμικές δράσεις, οι οποίες φαίνεται να διαμεσολαβούνται από μεμβρανικούς υποδοχείς που πυροδοτούν την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών κινασών. Η S-παλμιτυλίωση αποτελεί μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση κατά την οποία καταλύεται ενζυματικά και αντιστρεπτά η προσθήκη παλμιτικού οξέος σε κατάλοιπα κυστεϊνών, με αποτέλεσμα την αύξηση της υδροφοβικότητας των πρωτεϊνών και την επακόλουθη αγκυροβόλησή τους στην κυτταρική μεμβράνη. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών, πλην του υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών, υφίστανται παλμιτυλίωση σε ένα υψηλά συντηρημένο μοτίβο 9 αμινοξέων στην περιοχή σύνδεσης με τον οικείο προσδέτη. Είναι ενδιαφέρον ότι μια παρόμοια ομόλογη αλληλουχία είναι παρούσα στην ίδια περιοχή στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (663**YLCMKTLLL**671), γεγονός το οποίο οδηγεί στην υπόθεση ότι ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών ενδέχεται να παλμιτυλιώνεται.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση του ρόλου του μοτίβου 663**YLCMKTLLL**671 στη μεμβρανική εντόπιση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, στο συνεντοπισμό με την καβεολίνη-1 και στις ταχείες μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών των MAPK και της PI_3K. Επίσης, η διδακτορική διατριβή αυτή θα απαντήσει στο ερώτημα εάν ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών παλμιτυλιώνεται.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των μεταλλαγμένων υποδοχέων, οι οποίοι φέρουν μεταλλάξεις σε θέσεις σημαντικές για την παλμιτυλίωση του υποδοχέα (hGRαY663A, hGRαC665A και hGRαLL670/671AA), με τη μέθοδο της σημειακής κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης. Ακολούθησε αλληλούχηση για την επιβεβαίωση των μεταλλάξεων. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η μεταγραφική ικανότητα των μεταλλαγμένων υποδοχέων hGRαY663A, hGRαC665A και hGRαLL670/671AA σε σχέση με τον φυσικού τύπου υποδοχέα (hGRαWT) σε κύτταρα CV-1 με δοκιμασίες

ενεργοποίησης. Δείξαμε ότι συγκριτικά με τον hGRαWT, οι υποδοχείς hGRαC665A και hGRαLL670/671AA παρουσιάζουν ελαττωμένη ικανότητα ενεργοποίησης του υποκινητή του MMTV σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης (< 10^{-6}M) και την ίδια ικανότητα ενεργοποίησης του υποκινητή αυτού σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης (10^{-6}M, 10^{-5}M). Ο υποδοχέας hGRαY663A παρουσίασε ελάττωση της ικανότητας ενεργοποίησης του υποκινητή MMTV σε όλες τις συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης. Επίσης, σε δοκιμασίες μετατόπισης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στον πυρήνα, δείξαμε ότι ο hGRαC665A εμφανίζει καθυστέρηση κατά 2,6 φορές για να ολοκληρωθεί η μετατόπισή του στον πυρήνα, σε σχέση με τον hGRαWT.

Κατά τη μελέτη των μη γενωμικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού για τον προσδιορισμό της ενδοκυττάριας κατανομής και τον εντοπισμό στην κυτταρική μεμβράνη τόσο του hGRαWT όσο και των μεταλλαγμένων υποδοχέων. Δείξαμε ότι τόσο ο hGRαWT όσο και οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα (100% των διαμολυνθέντων κυττάρων) και στην κυτταρική μεμβράνη (10%-13%). Η έκθεση των διαμολυνθέντων κυττάρων σε δεξαμεθαζόνη (αγωνιστής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών) είχε ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση του hGRαWT και των μεταλλαγμένων υποδοχέων στον πυρήνα και την εμφάνιση αποκλειστικά πυρηνικού σήματος σε ποσοστό 100% των διαμολυνθέντων κυττάρων. Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού επιβεβαιώθηκαν με υποκυτταρική κλασμάτωση και στύπωμα κατά Western. Επιπρόσθετα, μελετήσαμε το ενδεχόμενο συνεντοπισμού του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με την καβεολίνη-1 με πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού. Δείξαμε ότι ο hGRαWT και οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς συνεντοπίζονται με την καβεολίνη-1 στην κυτταρική μεμβράνη. Η προσθήκη του αναστολέα της παλμιτυλίωσης 2-βρωμοπαλμιτικού (2-Br) δεν απέτρεψε τον εντοπισμό στην κυτταρική μεμβράνη και τον συνεντοπισμό με την καβεολίνη-1 τόσο του hGRαWT όσο και των μεταλλαγμένων υποδοχέων.

Με σκοπό να μελετήσουμε τον ενδεχόμενο λειτουργικό ρόλο του μοτίβου στις μη γενωμικές δράσεις των ορμονών αυτών, υλοποιήθηκαν οι δοκιμασίες ενεργοποίησης των

σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK και PI_3K σε κύτταρα διαμολυνθέντα με τον hGRαWT και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς μετά από έκθεση σε δεξαμεθαζόνη για διαφορετικούς χρόνους. Δείξαμε ότι τόσο ο hGRαWT όσο και οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς επάγουν διφασικά την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK σε χρόνο 5 και 15 λεπτών. Η προσθήκη του αναστολέα 2-Br δεν απέτρεψε την ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI_3K δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τον hGRαWT ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς στην παρουσία ή απουσία του αναστολέα 2-Br.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες παλμιτυλίωσης σε κύτταρα διαμολυνθέντα με τον hGRαWT (δείγμα) και τον $erbA^{-1}$ (αρνητικό πρότυπο) καθώς και σε κύτταρα μη-διαμολυνθέντα (θετικό πρότυπο: καβεολίνη-1). Τα κύτταρα επωάστηκαν με 9,10-^{3}H(N) παλμιτικό οξύ (0,1mCi/mL) για 2 ώρες. Δείξαμε ότι η καβεολίνη-1 υφίσταται παλμιτυλίωση, ενώ οι τιμές cpm για τον hGRαWT εμπίπτουν στις αντίστοιχες τιμές του αρνητικού προτύπου, αποτέλεσμα το οποίο δείχνει ότι ο hGRα δεν υφίσταται παλμιτυλίωση.

Abstract

In humans, glucocorticoids (GCs) regulate a broad spectrum of physiologic functions and exert both genomic and nongenomic actions through their ubiquitously expressed glucocorticoid receptor (hGR). The rapid nongenomic actions of GCs are likely to be mediated by membrane hGRs that transduce the glucocorticoid signal via activation of kinases. S-palmitoylation plays an important role in plasma membrane localization and occurs through a highly conserved 9 amino acid motif in the ligand-binding domain (LBD) of steroid receptors. A highly homologous sequence (663**YLCMKTLLL**671) is present in the LBD of the hGRα protein, suggesting that the hGR might also undergo S-palmitoylation.

The aim of this thesis is to determine the role of the motif 663**YLCMKTLLL**671 in mediating rapid non-genomic glucocorticoid signaling following translocation and binding to the plasma membrane.

The plasmids pRShGRαY663A, pRShGRαC665A and pRShGRαLL670/671AA were constructed by introducing the indicating mutations into the pRShGRα plasmid using PCR-assisted site-directed mutagenesis. Transactivation assays showed that compared with the wild-type receptor, the mutant receptors hGRαC665A and hGRαLL670/671AA demonstrated decreased ability to transactivate the glucocorticoid-inducible mouse mammary tumor virus (MMTV) promoter at low concentrations of dexamethasone ($< 10^{-6}$M), but similar ability to transactivate the MMTV promoter at higher dexamethasone concentrations (10^{-6}M, 10^{-5}M); the mutant receptor hGRαY663A displayed decreased transactivational activity at all dexamethasone concentrations. Nuclear translocation assays showed that the mutant receptor hGRαC665A required 36 minutes to translocate from the cytoplasm to the nucleus, suggesting a 2,6-fold delay compared to the time required for hGRαWT nuclear translocation.

To study the membrane localization of the hGRα, we performed immunofluorescence experiments. We showed that both the hGRαWT and the mutant receptors hGRαY663A, hGRαC665A and hGRαLL670/671AA showed similar distribution to the plasma membrane. These results were confirmed by subcellular

fractionation experiments. Addition of 2-bromopalmitate did not prevent membrane localization of the receptor or colocalization with caveolin-1.

In kinase signaling assays, we demonstrated that neither the mutant receptors nor the addition of 2-bromopalmitate did prevent the diphasic activation of MAPK signaling pathway in the early time points. Moreover, there was no essential difference in the activation of PI_3K pathway, both in the absence or presence of the 2-bromopalmitate.

Finally, we performed palmitoylation assays using 9,10-^{3}H(N) palmitic acid in order to determine whether the hGRα is a palmitoylated protein. We demonstrated that the hGRα does not undergo palmitoylation.

In conclusion, the motif 663**YLCMKTLLL**671 does not play a role in the membrane localization of hGRα and it is not involved in mediating rapid non-genomic glucocorticoid effects. Moreover, the hGRα is not a palmitoylated protein.

Εικόνες

1. Εισαγωγή

Εικόνα 1.1: Ποικίλες και πλειοτρόπες συστηματικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών στον ανθρώπινο οργανισμό (Rhen and Cidlowski, 2005)**……37**

Εικόνα 1.2: Μέλη της οικογένειας των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών. Οι ομολογίες των αλληλουχιών ανά περιοχή σε κάθε πρωτεΐνη εκφράζονται σε % ποσοστό σε σύγκριση με την αλληλουχία του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GRα). MR: υποδοχέας των αλατοκορτικοειδών, PR-A: υποδοχέας της προγεστερόνης, AR: υποδοχέας των ανδρογόνων, ERα: υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου α, ERβ: υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου β**……40**

Εικόνα 1.3: Εγγύς και άπω περιοχή των 11 διαφορετικών υποκινητών που ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στον άνθρωπο (Presul et al., 2007; Turner and Muller, 2005)**……...42**

Εικόνα 1.4: Το γονίδιο *hGR* αποτελείται από 10 εξόνια (1-9α και 9β). Από την εναλλακτική χρήση των εξονίων 9α και 9β προκύπτουν οι δύο κύριες ισομορφές: ο hGRα και ο hGRβ. Στην εικόνα φαίνονται οι αρθρωτές δομές των πρωτεϊνών, καθώς και σημαντικές αλληλουχίες για το διμερισμό, τη μετατόπιση στον πυρήνα και για την αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές. NTD: N-terminal domain, DBD: DNA-binding domain, HD: hinge domain, LBD: ligand-binding domain, NL: nuclear translocation signal, AF: activation function domain**……..43**

Εικόνα 1.5: Περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD). **(A):** Ο κάθε δάκτυλος ψευδαργύρου περιβάλλεται από τέσσερεις κυστεΐνες. Οι θέσεις αμινοξέων με κόκκινο χρώμα σχηματίζουν δομές α-έλικας. **(B):** Τρισδιάστατο μοντέλο της αλληλεπίδρασης της DBD με τα GREs**……..45**

Εικόνα 1.6: Η περιοχή πρόσδεσης του hGRα με την ορμόνη (LBD) αποτελείται από 12 α-έλικες και 4 μικρές β-πτυχωτές δομές οι οποίες σχηματίζουν μια τριεπίπεδη ελικοειδή δομή. Οι έλικες 1 και 3 σχηματίζουν τη μια πλευρά, οι έλικες 7 και 10 σχηματίζουν την αντικριστή πλευρά. Οι έλικες 4, 5, 8 και 9 οριοθετούν το άνω ήμισυ της πρωτεΐνης. Η περιοχή σύνδεσης των γλυκοκορτικοειδών επισημαίνεται με κίτρινο αστέρι**……..46**

Εικόνα 1.7: Η δομή της LBD του hGRα κατά τη σύνδεση με αγωνιστή και ανταγωνιστή. Στην πρώτη περίπτωση, οι έλικες 11 και 12 δημιουργούν την κατάλληλη επιφάνεια αλληλεπίδρασης του hGRα με τους συνενεργοποιητές. Στη δεύτερη περίπτωση, η έλικα 12 καταλαμβάνει διαφορετική θέση, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές και να ευνοείται η αλληλεπίδραση με συγκαταστολείς**……47**

Εικόνα 1.8: Οι ισομορφές GRα και GRβ στο zebrafish προκύπτουν από διατήρηση εσονίου (intron retention)**……51**

Εικόνες

Εικόνα 1.9: Οι 8 εναλλακτικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης του mRNA του hGRα δίνουν γένεση σε 8 διαφορετικές hGRα ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν ως προς το μήκος του αμινοτελικού τους άκρου. Δυνητικά, θα μπορούσαν να προκύψουν 8 ισομορφές και για τον hGRβ, διότι το mRNA του hGRβ εμπεριέχει τις 8 θέσεις έναρξης της μετάφρασης**……...53**

Εικόνα 1.10: Σημαντικές θέσεις αμινοξέων στον hGRα που υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. P: φωσφορυλίωση, S: σουμοϋλίωση, U: ουμπικουϊτινυλίωση, A: ακετυλίωση. Οι περισσότερες θέσεις φωσφορυλίωσης εδράζονται στην AF-1 περιοχή, γεγονός το οποίο αναδεικνύει τη σημασία της φωσφορυλίωσης στη μεταγραφική ενεργότητα του hGRα**..…….....55**

Εικόνα 1.11: (A): Τα κατάλοιπα λυσινών στις θέσεις 480, 492, 494 και 495 εδράζονται στην περιοχή αρμού του hGRα και υφίστανται ακετυλίωση από τον Clock μετά από αλληλεπίδρασή του με την LBD του hGRα. **(B):** Ο ακετυλιωμένος hGRα εμφανίζει μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης στα GREs με αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας**……60**

Εικόνα 1.12: Άξονας μεταγωγής σήματος των γλυκοκορτικοειδών. HSPs: heat shock proteins, GR: glucocorticoid receptor, TFs: transcription factors**……62**

Εικόνα 1.13: Αλληλεπίδραση του hGRα με συνενεργοποιητές, συμπλέγματα ανακατασκευής της χρωματίνης και γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες για την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων CBP: cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-binding protein, DRIP: vitamin D receptor-interacting protein, p/CAF: p300/CBP-associated factor, SWI/SNF: mating-type switching/sucrose non-fermenting, TRAP: thyroid hormone receptor-associated protein. **……..64**

Εικόνα 1.14: Τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων από τον hGR. Ο hGR δύναται να αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες άμεσα ή έμμεσα επηρεάζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων**……...66**

Εικόνα 1.15: (A): Αλληλεπίδραση του Gas5 με την DBD του hGR **(B):** Ο Gas5 αποτρέπει την πρόσδεση του hGR στα GREs καταστέλλοντας τη μεταγραφική του ενεργότητα**……71**

Εικόνα 1.16: Η στοχαστική φύση του συστήματος των γλυκοκορτικοειδών**……...72**

Εικόνα 1.17: Τα ομοιοστατικά συστήματα επάγουν τις δράσεις τους έχοντας ως ομοιοστατική απόκριση την ανάστροφη καμπύλη. Η βέλτιστη ενεργότητα προκαλεί την «εύσταση», ενώ η μικρή ή η μεγάλη ενεργότητα προκαλούν «αλλόσταση» ή «κακόσταση»**……..73**

Εικόνα 1.18: Σχηματική αναπαράσταση των γενωμικών και μη γενωμικών δράσεων των στεροειδών ορμονών. Αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να συμβούν σε ένα κοινό κύτταρο – σε κανένα κυτταρικό τύπο δεν έχει δειχθεί να συμβαίνουν όλες αυτές οι δράσεις. Τα μονοπάτια δράσης περιλαμβάνουν άμεση ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω κλασικών υποδοχέων (αριστερά), μονοπάτια κινασών που

ενεργοποιούνται από κλασικούς υποδοχείς (μεσαίο τμήμα), καθώς και μονοπάτια κυκλικού AMP, λιπασών και κινασών, συμπεριλαμβανομένων των ροών ιόντων, τα οποία ενεργοποιούνται από μη κλασικούς υποδοχείς (δεξιά). Μερικά σηματοδοτικά μονοπάτια τελικά οδηγούν σε (έμμεση) ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω τροποποίησης μεταγραφικών παραγόντων. CREB: cyclic AMP response-element-binding protein, DAG: διακιλογλυκερόλη, ERK/MAPK: extracellular-signal regulated kinase/mitogen-activated protein kinase, InsP3: τριφωσφορική ινοσιτόλη, MEK, MAPK και ERK κινάση, pCREB: φωσφορυλιωμένο CREB, PI3K: κινάση της φωσφατίδιλοϊνοσιτόλης 3, PKA: πρωτεϊνική κινάση A, PKC: πρωτεϊνική κινάση C, PLC: φωσφολιπάση C**……76**

Εικόνα 1.19: Η προσθήκη παλμιτόυλ-ακέτυλο-συνενζύμου Α σε κατάλοιπο κυστεΐνης καταλύεται από τις παλμιτόυλ-ακέτυλ-τρανσφεράσες. Η αντίστροφη αντίδραση (αποπαλμιτυλίωση) καταλύεται από ένζυμα τα οποία δεν έχουν απομονωθεί, μέχρι στιγμής. PATs: palmitoyl-acetyl-transferases. APT1: αποπαλμιτοϋλάση 1**……81**

Εικόνα 1.20: Φυλογενετική ανάλυση και ευθυγράμμιση των αλληλουχιών αμινοξέων των ανθρώπινων υποδοχέων των οιστρογόνων (ER), των υποδοχέων των σχετιζομένων με τους υποδοχείς των οιστρογόνων (ERR), των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών (GR), του υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών (MR), του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR) και του υποδοχέα της προγεστερόνης (PR). Το αστέρι, η οριζόντια γραμμή και ο κύκλος δείχνουν την παλμιτυλιούμενη κυστεΐνη, το υδρόφοβο τμήμα και την περιοχή της γλυκοζυλίωσης, αντίστοιχα. Τα κατάλοιπα αμινοξέων έχουν χρωματιστεί με βάση τις χημικές τους ιδιότητες. GenBank accession codes: ERa (NP_000116), ERb (NP_001428), ERRa (NP_004442), ERRb (NP_004443), ERRg (NP_001429), GRa (NP_001018087), GRg (NP_001019265), GRb (NP_001018661), MR (NP_000892), PR (NP_000917), and AR (NP_000035). Το φυλογενετικό δέντρο ελήφθη από AliBee (available from: http://www.genebee.msu.su/index.html). Η ευθυγράμμιση της αλληλουχίας των αμινοξέων έγινε με CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Οι αλληλουχίες των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών ευθυγραμμίστηκαν σύμφωνα με το σταθερό κατάλοιπο Αργινίνης (i.e.K)**……...82**

Εικόνα 1.21: (Α) Κρυσταλλική δομή της περιοχής σύνδεσης με τον προσδέτη (LBD) του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών-άλφα (hGRα). Οι έλικες έχουν κόκκινο χρώμα, ενώ οι β-πτυχωτές δομές έχουν πράσινο χρώμα. Οι δύο αλληλουχίες 9 αμινοξέων είναι έντονες. **(Β)** Στερεοτακτική διαμόρφωση της υπό αγωνιστή μορφής της LBD του hGRα. Τα κίτρινα βέλη δείχνουν τις αλληλουχίες των 9 αμινοξέων 620**LLCFAPDLI**628 (αριστερά) και 663**YLCMKTLLL**671 (δεξιά)**……85-86**

Εικόνες

2. Υλικά και Μέθοδοι

Εικόνα 2.1: Βασικές αρχές σημειακής κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης. Μετά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, το προϊόν υπόκειται σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Dpn1* και ακολουθεί μετασχηματισμός χημειοδεκτικών βακτηρίων**……...94**

Εικόνα 2.2: Βήματα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης**……97**

Εικόνα 2.3: Πρωτόκολο εταιρείας PROMEGA για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή συγκέντρωση (miniprep)**……..100**

Εικόνα 2.4: Αλληλούχηση με τη μέθοδο Sanger**……102**

Εικόνα 2.5: Μέτρηση κυττάρων με την πλάκα Neubauer. Τα κύτταρα (άσπροι μικροί κύκλοι) μετρώνται στα 4 τετράγωνα και ακολούθως υπολογίζεται ο μέσος όρος**……..106**

Εικόνα 2.6: Παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με τη μέθοδο των κατιονικών σωματίων. Αρχικά, σχηματίζεται σύμπλεγμα μεταξύ της λιποφεκταμίνης (λιπιδιακό κατιόν σωμάτιο) και του αρνητικά φορτισμένου DNA. Στη συνέχεια, το εξωτερικά περιβαλλόμενο με θετικά φορτία σύμπλεγμα ενδοκυτταρώνεται επωφελούμενο του αρνητικού φορτίου της εξωτερικής πλευράς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης**……..107**

Εικόνα 2.7: Βήματα πρωτοκόλλου στυπώματος κατά Western**..……112**

Εικόνα 2.8: Σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ αντιγονικού επιτόπου και φθορίζοντος αντισώματος**…….116**

Εικόνα 2.9: Τεχνική sandwich**……117**

Εικόνα 2.10: Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με ακτίνες laser**……118**

Εικόνα 2.11: Βασικές αρχές ανοσοκατακρήμνισης**……124**

4. Αποτελέσματα

Εικόνα 4.1: Χρωματογράφημα αλληλούχησης στο οποίο επιβεβαιώνεται η αντικατάσταση της τυροσίνης σε αλανίνη στη θέση 663 του hGRα (hGRαY663A)**……127**

Εικόνα 4.2: Χρωματογράφημα αλληλούχησης στο οποίο επιβεβαιώνεται η αντικατάσταση της κυστεΐνης σε αλανίνη στη θέση 665 του hGRα (hGRαC665A)**……128**

Εικόνες

Εικόνα 4.3: Χρωματογράφημα αλληλούχησης στο οποίο επιβεβαιώνεται η αντικατάσταση της λευκίνης σε αλανίνη στις θέσεις 670 και 671 του hGRα (hGRαLL670/671AA)**……128**

Εικόνα 4.4: Δοκιμασίες ενεργοποίησης του υποκινητή MMTV από τα πλασμίδια pRShGRαWT, pRShGRαY663A, pRShGRαC665A και pRShGRαLL670/671AA**……130**

Εικόνα 4.5: Στύπωμα κατά Western των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε CV-1 και COS-7 κύτταρα**……131**

Εικόνα 4.6: Η μετατόπιση στον πυρήνα του hGRαWT ολοκληρώνεται σε 15 λεπτά**…….....131**

Εικόνα 4.7: Η μετατόπιση στον πυρήνα του hGRαC665A ολοκληρώνεται σε 36 λεπτά**……...132**

Εικόνα 4.8: Ανοσοφθορισμός σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαWT. Με κίτρινα βέλη δείχνουμε τη μεμβρανική εντόπιση. Η προσθήκη δεξαμεθαζόνης δίνει αποκλειστικά πυρηνικό σήμα**…..133**

Εικόνα 4.9: Η χορήγηση 2-Βρωμοπαλμιτικού δεν απέτρεψε τη μεμβρανική εντόπιση (κίτρινα βέλη) του hGRαWT**……..133**

Εικόνα 4.10: Ανοσοφθορισμός σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαC665A. Με κίτρινα βέλη δείχνουμε τη μεμβρανική εντόπιση**……..134**

Εικόνα 4.11: Ανοσοφθορισμός σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαY663A**…….134**

Εικόνα 4.12: Ανοσοφθορισμός σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαLL670/671AA. Με κίτρινα βέλη δείχνουμε τη μεμβρανική εντόπιση**…….135**

Εικόνα 4.13: Στύπωμα κατά Western μετά από υποκυτταρική κλασμάτωση. Στα μεμβρανικά εκχυλίσματα παρατηρείται εντόπιση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών**……...135**

Εικόνα 4.14: Εντόπιση της καβεολίνης-1 στο κυτταρόπλασμα και τη μεμβράνη των μη-διαμολυνθέντων COS-7**……...136**

Εικόνα 4.15: Συνεντοπισμός του hGRαWT με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη**….....137**

Εικόνα 4.16: Συνεντοπισμός του hGRα με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαWT στα οποία χορηγήθηκε ο αναστολέας 2-Βρωμοπαλμιτικό**…...138**

Εικόνα 4.17: Πυρηνική εντόπιση του hGRαWT μετά από επώαση με δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M**……138**

Εικόνα 4.18: Συνεντοπισμός του hGRα με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαC665A**……..139**

Εικόνες

Εικόνα 4.19: Πυρηνική εντόπιση του hGRαC665A μετά από επώαση με δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M**……...139**

Εικόνα 4.20: Συνεντοπισμός του hGRα με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαY663A**……..140**

Εικόνα 4.21: Πυρηνική εντόπιση του hGRαY663A μετά από επώαση με δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M**……...140**

Εικόνα 4.22: Συνεντοπισμός του hGRα με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαLL670/671AA**……..141**

Εικόνα 4.23: Πυρηνική εντόπιση του hGRαLL670/671AA μετά από επώαση με δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M**...141**

Εικόνα 4.24: Στύπωμα κατά Western στο οποίο απεικονίζεται η ενεργοποίηση της ERK σε κύτταρα διαμολυνθέντα με τον φυσικού τύπου υποδοχέα και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς μετά από έκθεση σε δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M σε διαφορετικούς χρόνους**……..143**

Εικόνα 4.25: Στύπωμα κατά Western στο οποίο απεικονίζεται η ενεργοποίηση της ERK σε κύτταρα διαμολυνθέντα με τον φυσικού τύπου υποδοχέα και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς μετά από επώαση με τον αναστολέα της παλμιτυλίωσης 2-Br και ακολούθως μετά από έκθεση σε δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M σε διαφορετικούς χρόνους**……143**

Εικόνα 4.26: Στύπωμα κατά Western στο οποίο απεικονίζεται η ενεργοποίηση της PI_3K σε κύτταρα διαμολυνθέντα με τον φυσικού τύπου υποδοχέα και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς μετά από έκθεση σε δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M σε διαφορετικούς χρόνους**……144**

Εικόνα 4.27: Στύπωμα κατά Western στο οποίο απεικονίζεται η ενεργοποίηση της PI_3K σε κύτταρα διαμολυνθέντα με τον φυσικού τύπου υποδοχέα και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς μετά από επώαση με τον αναστολέα της παλμιτυλίωσης 2-Br για 24 ώρες και ακολούθως μετά από έκθεση σε δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M σε διαφορετικούς χρόνους**……..144**

Εικόνα 4.28: Η ενδογενής καβεολίνη-1 υφίσταται παλμιτυλίωση. Οι τιμές ενσωμάτωσης παλμιτικού οξέος στον hGRα εμπίπτουν στις αντίστοιχες τιμές του αρνητικού προτύπου ($erbA^{-1}$)**……145**

5. Συζήτηση

Εικόνα 5.1: Η υπομονάδα Gβ/Gγ αλληλεπιδρά με τον GR. Κατά την ταυτόχρονη ενεργοποίηση του GR και του GPCR, το σύμπλοκο GR/Gβ/Gγ μεταναστεύει στον πυρήνα και καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του GR. Το ανενεργό σύμπλοκο Gβ/Gγ εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της

κυτταρικής μεμβράνης και θα μπορούσε έμμεσα να αγκυροβολεί τον GR στη μεμβράνη (Kino et al., 2005)**……155**

Εικόνα 5.2: Η PRMT1 μεθυλιώνει παροδικά την αργινίνη στη θέση 260 στη DBD του ERα. Η αλληλεπίδραση του μεθυλιωμένου ERα με άλλες πρωτεΐνες πυροδοτεί τις ταχείες μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων**……..156**

Πίνακες

2. Υλικά και Μέθοδοι

Πίνακας 1: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σημειακή κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση**……95**

Συντομογραφίες

2-Br: 2-Βρωμοπαλμιτικό

A: ακετυλίωση

ACTH: φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη

AF-1: περιοχή ενεργοποίησης 1

AF-2: περιοχή ενεργοποίησης 2

AMPK: adenosine 5’ monophosphate-activated protein kinase

AP-1: ενεργοποιητική πρωτεΐνη 1

APT1: αποπαλμιτοϋλάση 1

AR: υποδοχέας των ανδρογόνων

Bmal1: brain-muscle-arnt-like protein 1

BMPs: μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών

CBP: cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-binding protein

CDK5: κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση 5

Clock: circadian locomotor output cycle kaput

COUP-TFII: chicken ovalbumin promoter-upstream transcription factor II

CRH: εκλυτική ορμόνη της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης

DAG: διακιλογλυκερόλη

DBD: περιοχή πρόσδεσης στο DNA

D-box: distal box

DRIP: vitamin D receptor-interacting protein

eNOS: ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου

ERK/MAPK: extracellular-signalregulated kinase/mitogen-activated protein kinase

ERα: υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου α

Συντομογραφίες

ERβ: υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου β

Gas5: growth arrest specific 5

GPCR: υποδοχέας συνδεόμενος με G πρωτεΐνες

GR: υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών

GREs: αλληλουχίες που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή

HD: περιοχή αρμού

HDAC3: απακετυλάση 3 της ιστόνης

hER: ανθρώπινος υποδοχέας των οιστρογόνων

hGRα: ανθρώπινος υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών τύπου α

hGRβ: ανθρώπινος υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών τύπου β

HSPs: συνοδές πρωτεΐνες θερμικού σοκ

InsP3: τριφωσφορική ινοσιτόλη

IRF-3: ρυθμιστικός παράγοντα 3 της ιντερφερόνης

LBD: περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη

LXR: liver X receptor

MAPK: mitogen-activated protein kinase

mGRα: υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών τύπου α στον ποντικό

mGRβ: υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών τύπου β στον ποντικό

MMTV: mouse mammary tumor virus

MR: υποδοχέας των αλατοκορτικοειδών

NF-κB: πυρηνικός παράγοντας κΒ (nuclear factor-κΒ)

NL: αλληλουχία για τη μετατόπιση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στον πυρήνα

NOR-1: neuron-derived orphan receptor-1

Συντομογραφίες

NRB: nuclear receptor binding site

NTD: αμινοτελική περιοχή

NURR1: nuclear receptor-related 1

p/CAF: p300/CBP-associated factor

P: φωσφορυλίωση

PATs: παλμιτόυλ-ακέτυλο-τρανσφεράσες

P-box: proximal box

PEPCK: φωσφοενολοπυροσταφυλική καρβοξικινάση

PI3K: κινάση της φωσφατίδιλοϊνοσιτόλης 3

PKA: πρωτεϊνική κινάση Α

PKC: πρωτεϊνική κινάση C

PLC: φωσφολιπάση C

PPT: propyl-pyrazole-triol

PR: υποδοχέας της προγεστερόνης

rGRα: υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών τύπου α στον επίμυ

rGRβ: υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών τύπου β στον επίμυ

RXR: retinoid X receptor

S: σουμοϋλίωση

Srebf1: sterol regulatory element-binding factor 1

STATs: μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής

SWI/SNF: mating-type switching/sucrose non-fermenting

TCR: υποδοχέας των Τ-λεμφοκυττάρων

TFs: μεταγραφικοί παράγοντες

Συντομογραφίες

TGFβ: μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β

TRAP: thyroid hormone receptor-associated protein

U: ουμπικουιτινυλίωση

zGRα: υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών τύπου α στο zebrafish

zGRβ: υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών τύπου β στο zebrafish

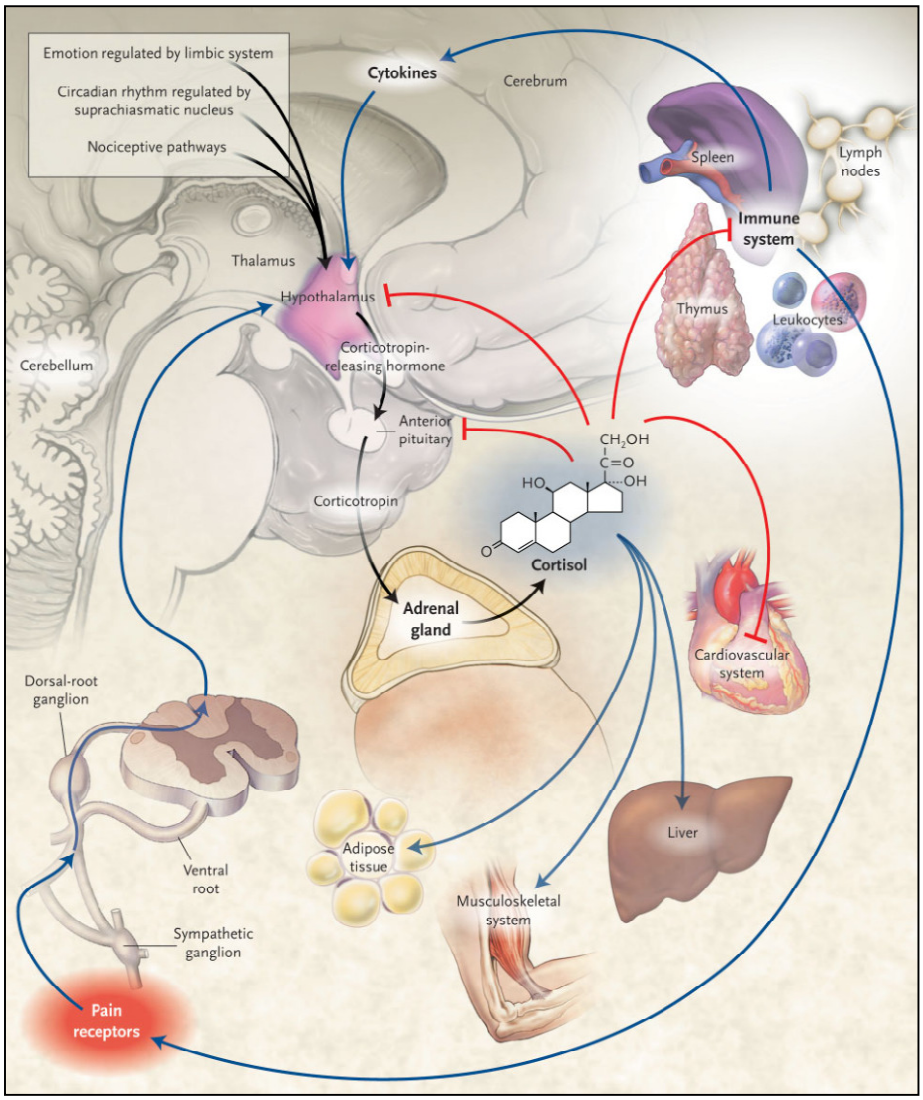
1. Εισαγωγή

1.1 ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν μέλη της οικογένειας των στεροειδών ορμονών τα οποία συντίθενται στο φλοιό των επινεφριδίων (Kino et al., 2011). Η απελευθέρωσή τους στη συστηματική κυκλοφορία διέπεται από κιρκάδιο ρυθμό έκκρισης και τελεί υπό τον έλεγχο του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων. Ποικίλα στρεσογόνα ερεθίσματα διεγείρουν τα νευροεκκριτικά κύτταρα του υπεροπτικού και παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου με αποτέλεσμα την έκκριση της εκλυτικής ορμόνης της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (CRH) στο πυλαίο κυκλοφορικό σύστημα της υπόφυσης. Η CRH διεγείρει τα κορτικοτρόπα κύτταρα του προσθίου λοβού της υπόφυσης, τα οποία απελευθερώνουν στη συστηματική κυκλοφορία την φλοιοεπινεφριδιοτρόπο ορμόνη (ACTH). Η ACTH προάγει τη σύνθεση και έκκριση της κορτιζόλης από τη στηλιδωτή στοιβάδα του φλοιού των επινεφριδίων. Τα απελευθερούμενα επίπεδα της κορτιζόλης δύνανται να ασκήσουν παλίνδρομη αρνητική ρύθμιση του άξονα τόσο στο επίπεδο της υπόφυσης όσο και στο επίπεδο του υποθαλάμου (Chrousos, 2009).

Τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της βασικής και της σχετιζόμενης με στρες ομοιόστασης, και ρυθμίζουν ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών λειτουργιών απαραίτητων για τη ζωή, όπως την αύξηση, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, τη διατήρηση του καρδιαγγειακού τόνου, το μεταβολισμό -με κύριες καταβολικές δράσεις-, την ποιότητα και την ποσότητα της ανοσολογικής αντίδρασης έναντι διαφόρων παθογόνων, λειτουργίες του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως επίσης τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση (Chrousos, 2004; Chrousos et al., 2004) (**Εικόνα 1.1**). Περίπου 20% των γονιδίων που εκφράζονται στα λευκοκύτταρα του ανθρώπου ρυθμίζονται θετικά ή αρνητικά από τα γλυκοκορτικοειδή, ποσοστό κατά πολύ μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των γονιδίων που απορυθμίζονται κατά την κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων (Galon et al., 2002). Σε φαρμακολογικές δόσεις, τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν ισχυρά αντιφλεγμονώδη/ ανοσοκατασταλτικά/αποπτωτικά σκευάσματα και αντιπροσωπεύουν μια από τις πιο σημαντικές κατηγορίες θεραπευτικών σκευασμάτων που χορηγούνται σε εκατομμύρια ασθενών ετησίως για τη θεραπεία φλεγμονωδών, αλλεργικών, αυτοάνοσων και

λεμφοϋπερπλαστικών ασθενειών (Rhen and Cidlowski, 2005). Όλες αυτές οι δράσεις των φυσικών και συνθετικών γλυκοκορτικοειδών διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (hGR).



Εικόνα 1.1: Ποικίλες και πλειοτρόπες συστηματικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών στον ανθρώπινο οργανισμό (Rhen and Cidlowski, 2005).

1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

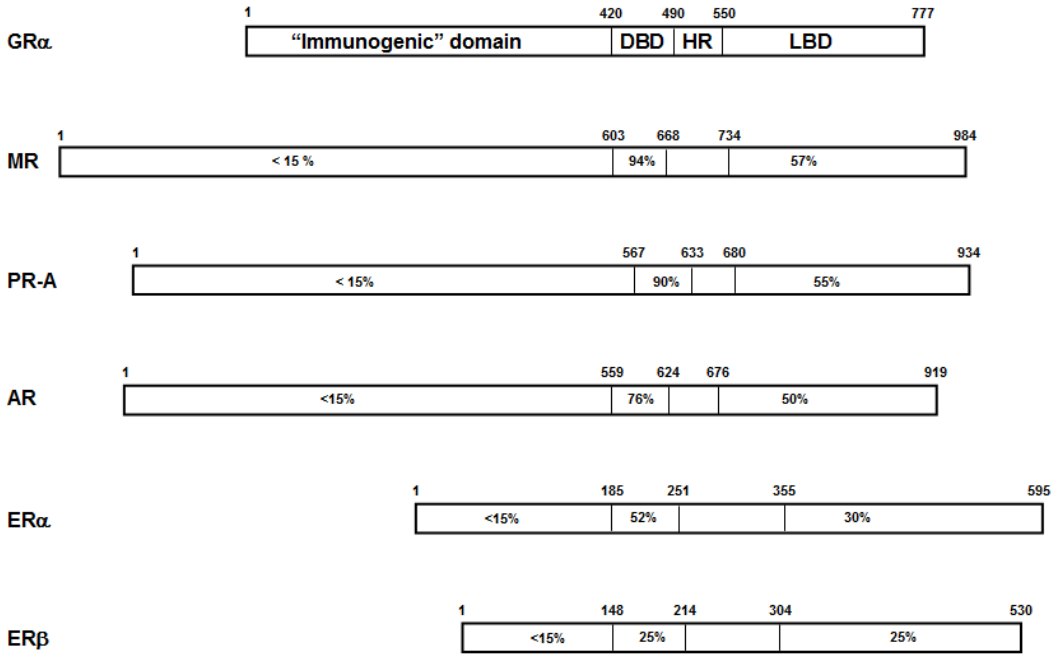
1.2.1 Πυρηνικοί υποδοχείς

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών αποτελεί μέλος της οικογένειας των στεροειδών ορμονών και της ευρύτερης υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, οι οποίοι δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες επάγοντας ή καταστέλλοντας την έκφραση πολλών γονιδίων-στόχων (Nicolaides et al., 2010). Μέχρι σήμερα, η υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων απαριθμεί πάνω από 300 μέλη, εκ των οποίων 48 πυρηνικοί υποδοχείς εκφράζονται στον άνθρωπο (Evans, 1988). Οι πρωτεΐνες αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των θηλαστικών, δεδομένου ότι εμπλέκονται στην εμβρυονική ανάπτυξη, στον πολλαπλασιασμό, στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση), στην αναπαραγωγή, στις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς και στη βασική και σχετιζόμενη με στρες ομοιόσταση (Sonoda et al., 2008).

Η ανάλυση της πλήρους αλληλουχίας των δύο ιδρυτικών μελών της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (hGR) και του ανθρώπινου υποδοχέα των οιστρογόνων (hERα), ανέδειξε κοινές δομικές περιοχές και ομολογία με το ιικό ογκογονίδιο v-erbA, καταδεικνύοντας την παρουσία μιας οικογένειας των πρωτεϊνών αυτών (Evans, 2004). Η αλυσιδωτή δομή των πυρηνικών υποδοχέων αποτελείται από μια λιγότερο συντηρημένη αμινοτελική (ανοσογενή) περιοχή [aminoterminal/immunogenic domain (NTD)], η οποία περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης 1 [activation function (AF-1)] που χρησιμοποιείται ως πλατφόρμα αλληλεπίδρασης των πυρηνικών υποδοχέων με συμπαράγοντες. Ακολουθεί η υψηλά συντηρημένη περιοχή της πρόσδεσης των πυρηνικών υποδοχέων με το DNA [DNA-binding domain (DBD)], η οποία αποτελείται από δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου που βοηθούν στην σύνδεση του υποδοχέα με ειδικές αλληλουχίες του DNA, τα στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη (hormone response elements, HRE). Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA περιέχει επίσης αλληλουχίες σημαντικές για την μετακίνηση του υποδοχέα στον πυρήνα και την σύνδεση του υποδοχέα με τις πρωτεΐνες

heat shock (hsps). Ακολουθεί περιοχή αρμού [hinge region (HP)], η οποία δίνει ευελιξία στην δομή του υποδοχέα και επιτρέπει το διμερές ενός συγκεκριμένου υποδοχέα να αλληλεπιδρά με πολλές διαφορετικές αλληλουχίες DNA (διαφορετικά στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη), προσδίδοντας έτσι ειδικότητα στον υποδοχέα. Το αμινοτελικό άκρο της περιοχής αυτής αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της περιοχής πρόσδεσης στο DNA και συμμετέχει στον διμερισμό του υποδοχέα διαμέσου της περιοχής πρόσδεσης στο DNA. Στο τέλος της αλληλουχίας εντοπίζεται η περιοχή σύνδεσης των υποδοχέων αυτών με τον προσδέτη [ligand-binding domain (LBD)], η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και σύνδεση με τον προσδέτη, για τον σχηματισμό όμο- ή ετεροδιμερών, καθώς και για την αλληλεπίδραση με συμπαράγοντες, δεδομένου ότι στην περιοχή αυτή εδράζεται η περιοχή ενεργοποίησης 2 [activation function (AF-2)] στην οποία λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις με συμπαράγοντες κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη σύνδεση με τον προσδέτη.

Η υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων αποτελείται από 6 οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων. Εξ αυτών, η τρίτη οικογένεια (NR3) αποτελείται από τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών: τον υποδοχέα των οιστρογόνων τύπου α και β (ERα και ERβ), τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), τον υποδοχέα της προγεστερόνης (PR), τον υποδοχέα των ανδρογόνων (AR) και τον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών (MR) (**Εικόνα 1.2**).



Εικόνα 1.2: Μέλη της οικογένειας των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών. Οι ομολογίες των αλληλουχιών ανά περιοχή σε κάθε πρωτεΐνη εκφράζονται σε % ποσοστό σε σύγκριση με την αλληλουχία του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GRα). MR: υποδοχέας των αλατοκορτικοειδών, PR-A: υποδοχέας της προγεστερόνης, AR: υποδοχέας των ανδρογόνων, ERα: υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου α, ERβ: υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου β.

1.2.2 Εξέλιξη του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών εξελίχθηκαν στη σειρά των χορδωτών μετά το διαχωρισμό των δευτεροστομίων από τα πρωτοστόμια πριν από 540 εκατομμύρια έτη (Thornton, 2001; Thornton et al., 2003). Σύμφωνα με τη φυλογονία των πρωτεϊνών αυτών, φαίνεται ότι δύο κατά σειρά γονιδιακοί διπλασιασμοί του γονιδίου του προγονικού υποδοχέα των στεροειδών ορμονών έλαβαν χώρα πριν τον διπλασιασμό των lamprey από τα σπονδυλωτά με σιαγόνα. Ο πρώτος διπλασιασμός του γονιδίου δημιούργησε τον υποδοχέα των οιστρογόνων και ένα 3-κετοστεροειδικό υποδοχέα, ενώ ο δεύτερος διπλασιασμός του τελευταίου γονιδίου έδωσε γένεση σε ένα κορτικοειδικό υποδοχέα και σε ένα υποδοχέα για 3-κετογοναδικά στεροειδή (ανδρογόνα, προγεστίνες). Τα τρία γονίδια που προέκυψαν από τους δύο διπλασιασμούς (γονίδιο του υποδοχέα των

οιστρογόνων, γονίδιο του κορτικοειδικού υποδοχέα και γονίδιο του υποδοχέα για 3-κετογοναδικά στεροειδή) υπέστησαν εκ νέου διπλασιασμό στη σειρά των γναθοστομίων με αποτέλεσμα τη δημιουργία έξι συνολικά γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν τους αντίστοιχους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών. Ο αρχέγονος υποδοχέας των οιστρογόνων δημιούργησε τους υποδοχείς των οιστρογόνων τύπου α και β, ο κορτικοειδικός υποδοχέας έδωσε γένεση στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και στον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών, ενώ ο υποδοχέας για τα 3-κετογοναδικά στεροειδή δημιούργησε τον υποδοχέα των ανδρογόνων και τον υποδοχέα της προγεστερόνης (Thornton, 2001).

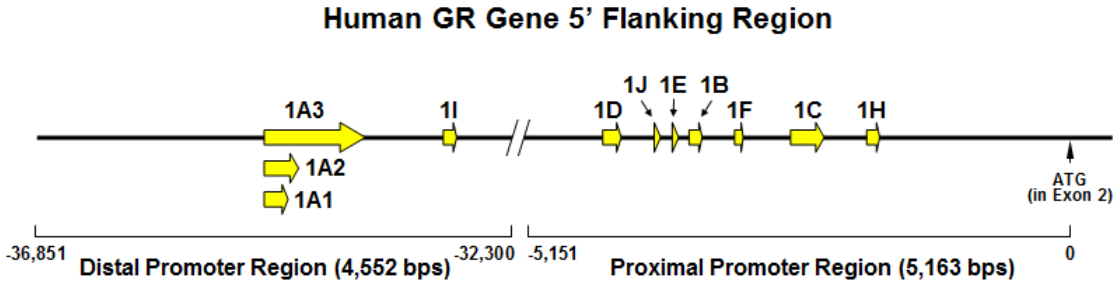
Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών απέκτησε την ειδικότητα σύνδεσής του με την κορτιζόλη κατόπιν αντικαταστάσεων οι οποίες συνέβηκαν στο γονίδιο του αρχέγονου κορτικοειδικού υποδοχέα (Ortlund et al., 2007). Κατά την εξελικτική αυτή διαδικασία, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών αρχικά διατηρούσε την ικανότητα σύνδεσής του με την αλδοστερόνη, τη δεοξυκορτιζόλη και την κορτιζόλη (Bridgham et al., 2006). Στη συνέχεια, και υπό την επίδραση σημειακών αντικαταστάσεων κατέστη δυνατή η επιλεκτική σύνδεση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με την κορτιζόλη. Τα αναφερθέντα εξελικτικά γεγονότα έλαβαν χώρα περίπου πριν από 420 ως 440 εκατομμύρια έτη (Ortlund et al., 2007).

1.2.3 Γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Το γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στον άνθρωπο εδράζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 5 (5q31.32). Αποτελείται από 10 εξόνια (1 ως 9α και 9β). Το εξόνιο 1 είναι μη κωδικοποιό. Το εξόνιο 2 κωδικοποιεί την αμινοτελική ή ανοσογενή περιοχή, τα εξόνια 3 και 4 κωδικοποιούν την περιοχή σύνδεσης με το DNA, ενώ τα εξόνια 5-9 κωδικοποιούν την περιοχή του αρμού (hinge region) και την περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη.

Η εναλλακτική χρήση του εξονίου 9α ή 9β δίνει γένεση σε δύο ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών: τον hGRα και τον hGRβ. Οι ισομορφές αυτές θα σχολιαστούν εκτενώς σε επόμενο κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής.

Η έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στον άνθρωπο δύναται να ελεγχθεί από 11 διαφορετικούς υποκινητές με εναλλακτικά εξόνια 1 (1A1, 1A2, 1A3, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1H, 1I και 1J) με αποτέλεσμα να προκύπτουν 11 διαφορετικά μετάγραφα τα οποία εκκινούν από το ίδιο εξόνιο 2 (Presul et al., 2007; Turner and Muller, 2005). Οι υποκινητές 1A1, 1A2, 1A3 και 1I εντοπίζονται στην άπω περιοχή των υποκινητών περίπου 32000-36000 βάσεις από το σημείο έναρξης της μεταγραφής, ενώ οι υποκινητές 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1H και 1J βρίσκονται περίπου 5000 βάσεις μακρόθεν του σημείου αυτού (Presul et al., 2007).

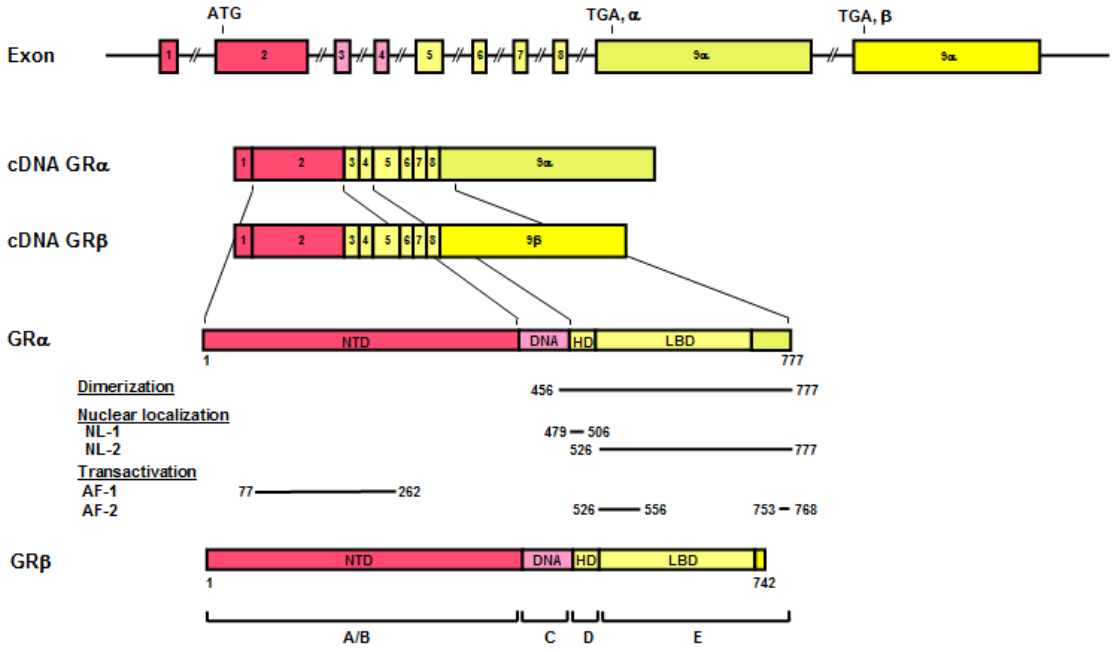


Εικόνα 1.3: Εγγύς και άπω περιοχή των 11 διαφορετικών υποκινητών που ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στον άνθρωπο (Presul et al., 2007; Turner and Muller, 2005).

1.2.4 Πρωτεΐνη του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Το εναλλακτικό μάτισμα του εξονίου 9 στο γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στον άνθρωπο δημιουργεί δύο υψηλά ομόλογες ισομορφές, τον hGRα και τον hGRβ (**Εικόνα 1.4**). Οι ισομορφές αυτές είναι όμοιες μέχρι το αμινοξύ 727 και ακολούθως διαχωρίζονται, με τον hGRα να έχει επιπλέον 50 αμινοξέα και τον hGRβ επιπρόσθετα 15 μη ομόλογα αμινοξέα. Ο hGRα αποτελεί τον κλασικό υποδοχέα των

γλυκοκορτικοειδών, ο οποίος εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, δεσμεύει τα γνωστά φυσικά και συνθετικά γλυκοκορτικοειδή και διαμεσολαβεί όλες τις γενωμικές και μη γενωμικές δράσεις των ορμονών αυτών. Ο hGRβ έχει επίσης ευρεία έκφραση σε πολλούς ιστούς, ασκεί αρνητική επικρατούσα δράση επί της μεταγραφικής ενεργότητας του hGRα και έχει ενδογενή μεταγραφική ενεργότητα ανεξάρτητη από τον hGRα (Bamberger et al., 1995). Εκτενής αναφορά στην ισομορφή hGRβ γίνεται σε επόμενο κεφάλαιο της διδακτορικής διατριβής.



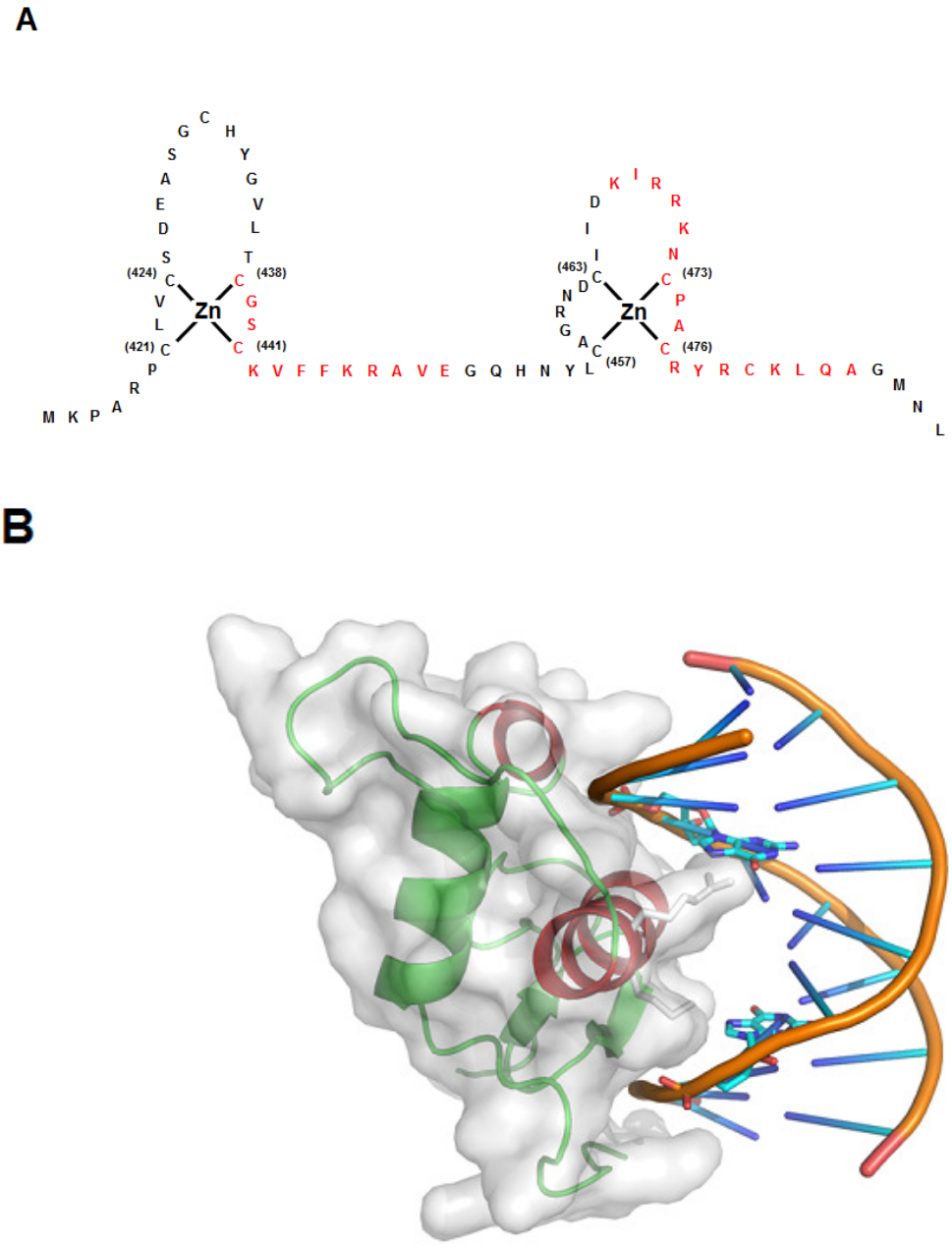
Εικόνα 1.4: Το γονίδιο *hGR* αποτελείται από 10 εξόνια (1-9α και 9β). Από την εναλλακτική χρήση των εξονίων 9α και 9β προκύπτουν οι δύο κύριες ισομορφές: ο hGRα και ο hGRβ. Στην εικόνα φαίνονται οι αρθρωτές δομές των πρωτεϊνών, καθώς και σημαντικές αλληλουχίες για το διμερισμό, τη μετατόπιση στον πυρήνα και για την αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές. NTD: N-terminal domain, DBD: DNA-binding domain, HD: hinge domain, LBD: ligand-binding domain, NL: nuclear translocation signal, AF: activation function domain.

Η πρωτεΐνη του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών έχει αρθρωτή δομή, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων (**Εικόνα 1.4**). Αποτελείται από τις ακόλουθες περιοχές:

- Περιοχή A/B ή αμινοτελική περιοχή ή ανοσογενής περιοχή.
- Περιοχή C ή περιοχή σύνδεσης με το DNA.
- Περιοχή D ή περιοχή αρμού.
- Περιοχή E ή περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη.

Η αμινοτελική περιοχή εκτείνεται μέχρι το αμινοξύ 420 και περιλαμβάνει την περιοχή ενεργοποίησης 1 [activation function (AF-1)]. Η AF-1 εδράζεται μεταξύ των αμινοξέων 77 και 262 και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μη εξαρτώμενη από τον προσδέτη αλληλεπίδραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με μόρια αναγκαία για την έναρξη της μεταγραφής, όπως συνενεργοποιητές, τροποποιητές της χρωματίνης και βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Almlof et al., 1997; Almlof et al., 1998).

Η περιοχή σύνδεσης με το DNA (DBD) βρίσκεται ανάμεσα στα αμινοξέα 420 και 480 και περιέχει το χαρακτηριστικό μοτίβο των δύο δακτύλων ψευδαργύρου μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η σύνδεση με τις αλληλουχίες που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή [glucocorticoid-response elements (GREs)] (Howard et al., 1990; Schule et al., 1990). Το κάθε άτομο ψευδαργύρου περιστοιχίζεται τετραεδρικά από τέσσερεις κυστεΐνες, ενώ τα περιβάλλοντα αμινοξέα δημιουργούν το κατάλληλο υδρόφοβο περιβάλλον στην περιοχή, το οποίο διευκολύνει τους δεσμούς που σχηματίζονται ανάμεσα στην πρωτεΐνη και το DNA των γονιδίων-στόχων. Στην περιοχή σύνδεσης με το DNA, μικρός αριθμός αμινοξέων που απαρτίζουν την υποπεριοχή P-box (proximal box) στον πρώτο δάκτυλο ψευδαργύρου διαμεσολαβεί την αναγνώριση των GREs. Μια δεύτερη ομάδα αμινοξέων της υποπεριοχής D-box (distal box), η οποία βρίσκεται στον δεύτερο δάκτυλο ψευδαργύρου, σχηματίζει την επιφάνεια ασθενούς διμερισμού της περιοχής σύνδεσης με το DNA. Η περιοχή σύνδεσης με το DNA περιέχει, επίσης, αλληλουχίες σημαντικές για τον διμερισμό καθώς και για τη μετατόπιση του υποδοχέα στον πυρήνα (Duma et al., 2006; Zhou and Cidlowski, 2005).



Εικόνα 1.5: Περιοχή σύνδεσης με το DNA (DBD). **(A):** Ο κάθε δάκτυλος ψευδαργύρου περιβάλλεται από τέσσερεις κυστεΐνες. Οι θέσεις αμινοξέων με κόκκινο χρώμα σχηματίζουν δομές α-έλικας. **(B):** Τρισδιάστατο μοντέλο της αλληλεπίδρασης της DBD με τα GREs.

Η περιοχή του αρμού (hinge region) εκτείνεται ανάμεσα στα αμινοξέα 488 και 527. Το αμινοτελικό της άκρο αποτελεί τμήμα της DBD και εμπλέκεται στο διμερισμό της. Η περιοχή αυτή προσφέρει την απαραίτητη μοριακή ευελιξία στην πρωτεΐνη, έτσι

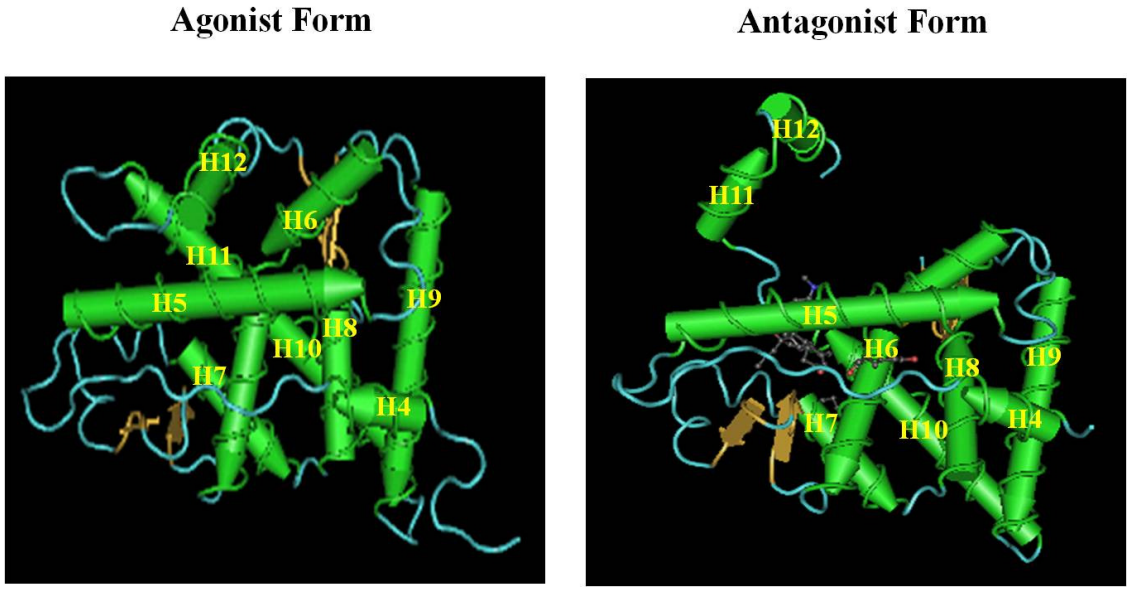
ώστε να δύναται ενεργοποιούμενη να αλληλεπιδράσει με πολλαπλά GREs (Duma et al., 2006; Zhou and Cidlowski, 2005).

Η περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη (LBD) ξεκινά από το αμινοξύ 527 μέχρι την ολοκλήρωση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης. Η περιοχή αυτή προσδένει τα γλυκοκορτικοειδή και εμπεριέχει την AF-2 η οποία διαμεσολαβεί την εξαρτώμενη από τον προσδέτη αλληλεπίδραση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με συνενεργοποιητές. Στην LBD εδράζονται αλληλουχίες σημαντικές για το διμερισμό του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, τη μετατόπισή του στον πυρήνα μετά από σύνδεση με τον προσδέτη, καθώς και για την αλληλεπίδρασή του με τις συνοδές πρωτεΐνες θερμικού σοκ [heat shock proteins(HSPs)] (Duma et al., 2006; Zhou and Cidlowski, 2005). Η LBD αποτελείται από 12 α-έλικες και 4 β-πτυχωτές δομές. Οι έλικες 1 και 3 σχηματίζουν τη μια πλευρά της θέσης σύνδεσης με τον προσδέτη, ενώ οι έλικες 7 και 10 οριοθετούν την αντικριστή πλευρά. Οι έλικες 4, 5, 8 και 9 συναποτελούν το μέσο επίπεδο των ελίκων και εντοπίζονται στο άνω ήμισυ και όχι στο κάτω ήμισυ της πρωτεΐνης. Η στερεοδομή αυτή σχηματίζει μια φωλιά στο κάτω ήμισυ της πρωτεΐνης, στην οποία συνδέονται οι αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (**Εικόνα 1.6**) (Bledsoe et al., 2002; Tanenbaum et al., 1998).

Εικόνα 1.6: Η περιοχή πρόσδεσης του hGRα με την ορμόνη (LBD) αποτελείται από 12 α-έλικες και 4 μικρές β-πτυχωτές δομές οι οποίες σχηματίζουν μια τριεπίπεδη ελικοειδή δομή. Οι έλικες 1 και 3 σχηματίζουν τη μια πλευρά, οι έλικες 7 και 10 σχηματίζουν την αντικριστή πλευρά. Οι έλικες 4, 5, 8 και 9

οριοθετούν το άνω ήμισυ της πρωτεΐνης. Η περιοχή σύνδεσης των γλυκοκορτικοειδών επισημαίνεται με κίτρινο αστέρι.

Η σύνδεση των προσδετών επάγει αλλαγές στη στερεοδομή της πρωτεΐνης, οδηγώντας σε αλλαγή της θέσης των ελίκων 11 και 12 και δημιουργώντας την επιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ της AF-2 περιοχής του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και του μοτίβου LXXLL των συνενεργοποιητών. Κατά την φάση ενεργοποίησης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών από τον προσδέτη, η έλικα 12 καταλαμβάνει την κατάλληλη θέση στην LBD έτσι ώστε να διευκολύνεται η αλληλεπίδραση των συνενεργοποιητών με την AF-2 (**Εικόνα 1.7**). Αντίθετα, κατά την σύνδεση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με τον ανταγωνιστή RU-486 (μιφεπριστόνη), η θέση της έλικας 12 αποτρέπει την αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές και επιτρέπει την αλληλεπίδραση με συγκαταστολείς, οδηγώντας σε καταστολή της έκφρασης γονιδίων-στόχων (Kauppi et al., 2003) (**Εικόνα 1.7**).



Εικόνα 1.7: Η δομή της LBD του hGRα κατά τη σύνδεση με αγωνιστή και ανταγωνιστή. Στην πρώτη περίπτωση, οι έλικες 11 και 12 δημιουργούν την κατάλληλη επιφάνεια αλληλεπίδρασης του hGRα με τους συνενεργοποιητές. Στη δεύτερη περίπτωση, η έλικα 12 καταλαμβάνει διαφορετική θέση, με αποτέλεσμα να αποτρέπεται η αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές και να ευνοείται η αλληλεπίδραση με συγκαταστολείς.

1.2.5 Ισομορφές της πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

- **Ισομορφές οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα**
  - **hGRβ**

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, ο hGRβ αποτελεί ισομορφή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, η οποία προκύπτει από το εναλλακτικό μάτισμα του εξονίου 9 (Kino et al., 2009; Lewis-Tuffin and Cidlowski, 2006). Αποτελείται από 742 αμινοξέα, εκ των οποίων τα 727 είναι όμοια με τα αμινοξέα του hGRα, ενώ τα τελευταία 15 αμινοξέα είναι μη ομόλογα. Η προκύπτουσα δομή του hGRβ δεν κωδικοποιεί τις έλικες 11 και 12, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην σύνδεση με τον προσδέτη, καθώς και στην αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές (Kino et al., 2009; Lewis-Tuffin and Cidlowski, 2006; Yudt et al., 2003). Ως εκ τούτου, ο hGRβ δεν προσδένει τα γνωστά γλυκοκορτικοειδή, εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων και δεν ρυθμίζει άμεσα την έκφραση γονιδίων που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή. Η ισομορφή αυτή ασκεί αρνητική επικρατούσα δράση επί της μεταγραφικής ενεργότητας του hGRα, φαινόμενο που έχει αποδοθεί στο σχηματισμό ετεροδιμερούς hGRα/hGRβ, στον ανταγωνισμό του hGRβ με τον hGRα για την πρόσδεση με τα GREs ή για την αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές/συγκαταστολείς (Bamberger et al., 1995; Charmandari et al., 2005; Kino and Chrousos, 2004; Kino et al., 2003; Yudt et al., 2003). Η ικανότητα του hGRβ να καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του hGRα αναδεικνύει την ισομορφή αυτή σε ένα από τους κυριότερους παράγοντες που καθορίζουν την απόκριση των ιστών στα γλυκοκορτικοειδή. Ο hGRβ εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τον hGRα. Η έκθεση των κυττάρων σε φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, καθώς και σε ποικίλα μόρια που ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα, οδηγεί επιλεκτικά σε αύξηση της έκφρασης του hGRβ με αποτέλεσμα την εμφάνιση αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή (Hauk et al., 2000; Tliba et al., 2006; Webster et al.,

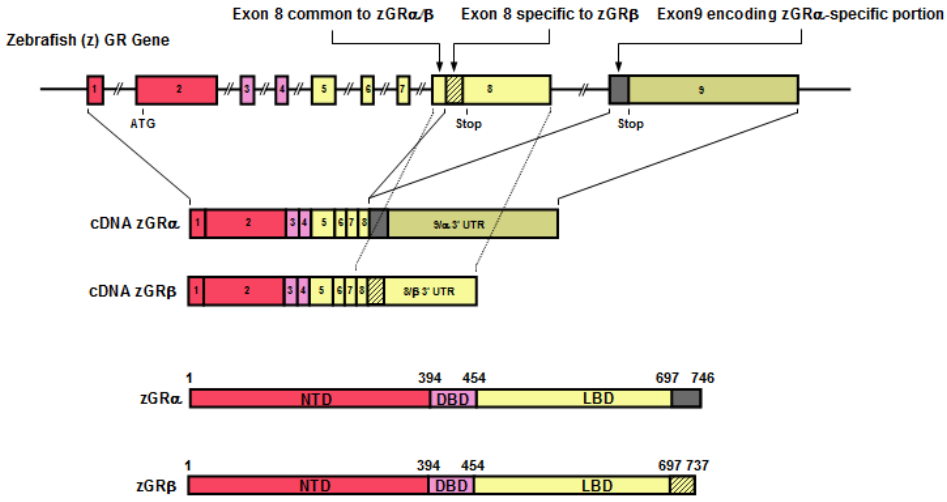
2001). Αυξημένα επίπεδα του hGRβ έχουν αναφερθεί σε ορισμένους ασθενείς με ανθεκτικό στα γλυκοκορτικοειδή άσθμα, με ελκώδη κολίτιδα, με ρινικούς πολύποδες, καθώς και σε περιστατικά συστηματικού ερυθηματώδους λύκου, οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας και χρόνιας λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας (Lewis-Tuffin and Cidlowski, 2006). Η μοριακή βάση της επιλεκτικά αυξημένης έκφρασης του hGRβ δεν είναι πλήρως κατανοητή, αν και σε αρκετές μελέτες έχει ενοχοποιηθεί η εμπλοκή του παράγοντα ματίσματος SRp30c (serine/arginine-rich protein p30c) (Xu et al., 2003; Zhu et al., 2007). Επιπρόσθετα, αυξημένα επίπεδα του hGRβ μπορούν να προκύψουν από τον φυσικά απαντώμενο πολυμορφισμό (A3669G) στην 3'-μη κωδικοποιούσα περιοχή του mRNA του hGRβ, ο οποίος διακόπτει ένα μοτίβο αποσταθεροποίησης του mRNA (AUUUA) (Derijk et al., 2001; Schaaf and Cidlowski, 2002). Ο πολυμορφισμός αυτός έχει συνδεθεί με μειωμένη κεντρική παχυσαρκία στις γυναίκες και ένα ευνοϊκό λιπιδαιμικό προφίλ στους άνδρες (Syed et al., 2006), καταδεικνύοντας ότι ορισμένες από τις ανεπιθύμητες δράσεις του hGRα στην κατανομή και το μεταβολισμό του λίπους μπορούν να αντιρροπισθούν από την αύξηση της έκφρασης του hGRβ. Από την άλλη πλευρά, αντιρροπώντας τις ευεργετικές αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκασταλτικές δράσεις του hGRα από τον hGRβ, παρατηρείται αυξημένος κίνδυνος στους φορείς του πολυμορφισμού αυτού για αυτοάνοσα νοσήματα, έμφραγμα του μυοκαρδίου και καρδιαγγειακή νόσο (van den Akker et al., 2008).

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο hGRβ διαθέτει ενδογενή, ανεξάρτητη από τον hGRα, μεταγραφική ενεργότητα, επάγοντας ή καταστέλλοντας την έκφραση πολλών γονιδίων-στόχων (Kino et al., 2009). Εξ αυτών, τα περισσότερα ήταν διαφορετικά από τα γονίδια που ρυθμίζονταν από τον hGRα, με εξαίρεση ένα μικρό αριθμό γονιδίων που ρυθμιζόταν και από τις δύο ισομορφές. Ακολούθως, τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) και δείχθηκε ότι η μεταγραφική ενεργότητα του

hGRβ ήταν ειδική για κάθε γονίδιο (Kino et al., 2009; Kino et al., 2009). Με δεδομένο ότι ο hGRβ επηρέαζε την έκφραση γονιδίων, τα οποία δεν διαθέτουν GREs στους υποκινητές τους, η μεταγραφική ενεργότητα του hGRβ αποδόθηκε σε αλληλεπιδράσεις της ισομορφής αυτής, μέσω της AF-1 περιοχής, με άλλους ρυθμιστές της μεταγραφής. Ως γνωστόν, η AF-1 περιοχή είναι πανομοιότυπη μεταξύ του hGRα και του hGRβ και διαμεσολαβεί τις αλληλεπιδράσεις με συνενεργοποιητές (Kino et al., 2009; Kino et al., 2009).

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα είναι η ανακάλυψη της ισομορφής hGRβ σε άλλα είδη, όπως το zebrafish (z) (Schaaf et al., 2008), τον ποντικό (m) (Hinds et al., 2010) και τον αρουραίο (r) (DuBois et al., 2013). Σε αντιδιαστολή με τις ισομορφές hGRα και hGRβ που προκύπτουν από εναλλακτική χρήση του εξονίου 9α ή 9β, οι ισομορφές zGRα και zGRβ δημιουργούνται από διατήρηση εσονίου (intron retention) (Schaaf et al., 2008). Κατά συνέπεια, ο zGRα και ο zGRβ χρησιμοποιούν τα εξόνια 1 εως 8 για τα κοινά 697 αμινοτελικά αμινοξέα, ενώ ο zGRα χρησιμοποιεί το εξόνιο 9 για το καρβοξυτελικό άκρο και ο zGRβ χρησιμοποιεί το υπόλοιπο του εξονίου 8, καθώς και το κωδικόνιο λήξης της 3'-μη κωδικοποιούσας περιοχής του εξονίου αυτού για τον σχηματισμό του καρβοξυτελικού της άκρου (**Εικόνα 1.8**) (Schaaf et al., 2008). Στον ποντικό, ο mGRβ έχει δειχθεί ότι σχηματίζεται με τον ίδιο μηχανισμό, καθιστώντας τη διατήρηση του εσονίου ως γενικό μηχανισμό δημιουργίας της ισομορφής αυτής στους οργανισμούς (Hinds et al., 2010). Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι η ισομορφή mGRβ δεν προσδένει τη δεξαμεθαζόνη, ασκεί ανασταλτική δράση επί της μεταγραφικής ενεργότητας της ισομορφής mGRα και η έκφρασή της επάγεται από φλεγμονώδη σήματα (Hinds et al., 2010). Επιπρόσθετα, στην ίδια μελέτη οι συγγραφείς έδειξαν ότι ο mGRβ εμπλέκεται στο μεταβολισμό των υδατανθράκων αναστέλλοντας την έκφραση των γλυκονεογενετικών ενζύμων PDK4 και G6Pase. Η επώαση των κυττάρων με ινσουλίνη είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του mGRβ, αποτέλεσμα το

οποίο επιβεβαιώθηκε *in vivo* με τη δοκιμασία νηστείας-επανασίτισης των ποντικών κατά την οποία η μεγάλη αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης αύξησε τα επίπεδα της ισομορφής αυτής στο ήπαρ (Hinds et al., 2010). Στον αρουραίο, η ισομορφή rGRβ προκύπτει, επίσης, από διατήρηση ιντρονίου (DuBois et al., 2013). Αν και η ισομορφή που υπερέχει σε επίπεδα έκφρασης είναι ο rGRα, ο rGRβ εκφράζεται σε μικρότερο βαθμό σε όλους τους ιστούς και τα επίπεδα έκφρασής του μειώνονται κατά τη χορήγηση λιποπολυσακχαρίτη (DuBois et al., 2013). Στο ήπαρ διαβητικών αρουραίων, ο rGRβ εκφράζεται σε πολύ ψηλά επίπεδα, αποτέλεσμα το οποίο αναδεικνύει πιθανή σχέση των επιπέδων ινσουλίνης με τα επίπεδα έκφρασης της ισομορφής αυτής (DuBois et al., 2013).



Εικόνα 1.8: Οι ισομορφές GRα και GRβ στο zebrafish προκύπτουν από διατήρηση εσονίου (intron retention).

- **Ισομορφές hGRγ, hGRA και hGRP**

Εκτός από τον hGRα και τον hGRβ, τρεις άλλες ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου: ο hGRγ, ο hGRA και ο hGRP.

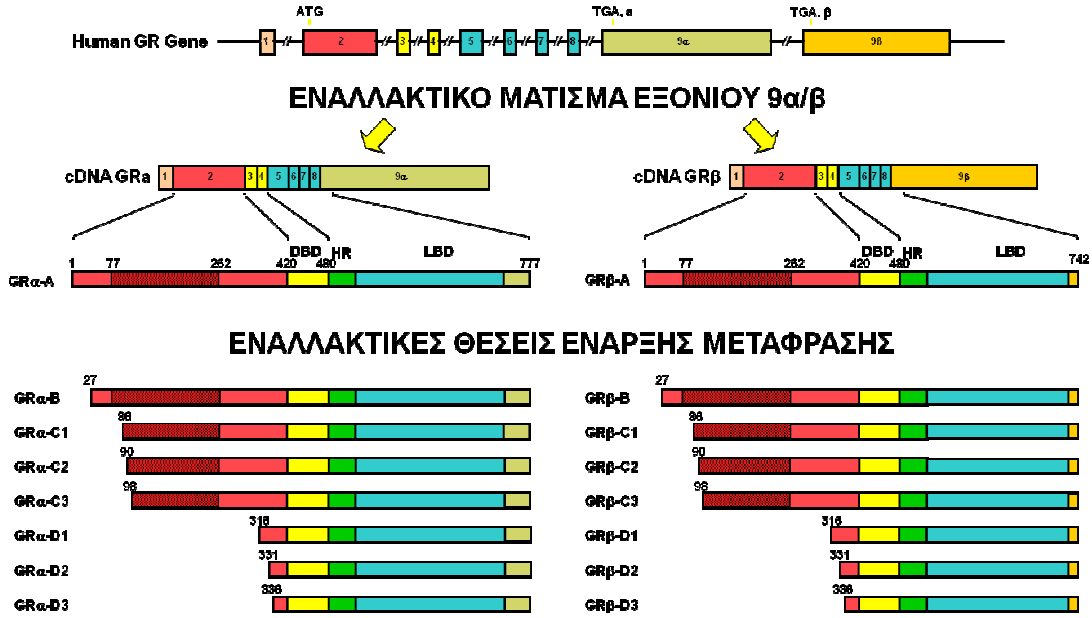
Η ισομορφή hGRγ περιέχει μια διείσδυση (insertion) του αμινοξέος αργινίνη μεταξύ των δύο δακτύλων ψευδαργύρου στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA (Rivers et al., 1999). Η ισομορφή αυτή εκφράζεται

ευρέως στους ιστούς και προσδένεται στα γλυκοκορτικοειδή και στο DNA με ικανότητα όμοια προς τον hGRα. Όμως, έχει διακριτό μεταγραφικό προφίλ σε σχέση με τον hGRα και συνδέεται με αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή σε μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονος, στα κορτικοτρόπα αδενώματα της υπόφυσης και στην παιδική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (Meijsing et al., 2009).

Δύο ισομορφές, οι οποίες δεν συνδέονται με ορμόνη και οι οποίες έχουν απολέσει μεγάλα τμήματα της περιοχής που συνδέεται ο υποδοχέας με τα γλυκοκορτικοειδή, έχουν ανακαλυφθεί σε κύτταρα πολλαπλού μυελώματος που ανθίστανται στα γλυκοκορτικοειδή (Moalli et al., 1993). Η ισομορφή hGR-A έχει απολέσει το αμινοτελικό ήμισυ της περιοχής που συνδέεται ο υποδοχέας με τα γλυκοκορτικοειδή και το οποίο κωδικοποιείται από τα εξόνια 5-7, ενώ ο hGR-P δεν διαθέτει τα εξόνια 8 και 9. Η τελευταία ισομορφή εκφράζεται σε πολλούς ιστούς και αποτελεί την κυρίαρχη ισομορφή σε καρκινικά κύτταρα που ανθίστανται στα γλυκοκορτικοειδή (de Lange et al., 2001).

- **Ισομορφές οι οποίες προκύπτουν από εναλλακτικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης**

Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι προκύπτουν επιπλέον πρωτεϊνικές ισομορφές του hGR λόγω της παρουσίας πολλαπλών εναλλακτικών θέσεων έναρξης της μετάφρασης του mRNA (Lu and Cidlowski, 2005). Τα 8 διακριτά και εξαιρετικά συντηρημένα κωδικόνια έναρξης από το εξόνιο 2 δίνουν γένεση σε 8 ισομορφές hGRα με προοδευτικά μικρότερα αμινοτελικά τμήματα (hGRα-A, hGRα-B, hGRα-C1, hGRα-C2, hGRα-C3, hGRα-D1, hGRα-D2 και hGRα-D3) (**Εικόνα 1.8**). Ο hGRα-A αντιπροσωπεύει τον κλασικό υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και αποτελείται από 777 αμινοξέα.



Εικόνα 1.9: Οι 8 εναλλακτικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης του mRNA του hGRα δίνουν γένεση σε 8 διαφορετικές hGRα ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν ως προς το μήκος του αμινοτελικού τους άκρου. Δυνητικά, θα μπορούσαν να προκύψουν 8 ισομορφές και για τον hGRβ, διότι το mRNA του hGRβ εμπεριέχει τις 8 θέσεις έναρξης της μετάφρασης.

Οι 8 ισομορφές διαφέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο και μπορούν να μετάγουν με διαφορετικό τρόπο το σήμα των γλυκοκορτικοειδών ανάλογα με το επίπεδο έκφρασής τους. Οι ισομορφές αυτές έχουν ομοιότητες, αλλά και διαφορές μεταξύ τους. Έχουν παρόμοια συγγένεια σύνδεσης με τα γλυκοκορτικοειδή και πρόσδεσης στα GREs. Όμως, έχουν σαφείς διαφορές στην ενδοκυττάρια εντόπισή τους με την ισομορφή hGRα-D να εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα των κυττάρων (Lu and Cidlowski, 2005). Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι κάποιες αλληλουχίες στο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μετατόπιση στον πυρήνα, στην έξοδο από τον πυρήνα και/ή στην παραμονή της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα (Oakley and Cidlowski, 2011). Επιπρόσθετα, η ισομορφή αυτή έχει δειχθεί ότι προσδένεται κατά συνεχή τρόπο σε ορισμένους υποκινητές γονιδίων που φέρουν GREs (Lu et al., 2007). Η πιο ουσιαστική διαφορά των ισομορφών που προκύπτουν από τις 8 εναλλακτικές θέσεις έναρξης

μετάφρασης είναι το προφίλ των γονιδίων-στόχων που ρυθμίζουν. Έτσι, η ισομορφή hGRα-C θεωρείται ως η πιο ενεργή και η hGRα-D ως η μεταγραφικώς λιγότερο ενεργή (Lu and Cidlowski, 2005; Oakley and Cidlowski, 2011). Η διαφορά αυτή οφείλεται στη στρατολόγηση διαφορετικών συνενεργοποιητών, αλλά και της RNA πολυμεράσης ΙΙ στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων. Οι διαφορετικές ισομορφές ρυθμίζουν την έκφραση τόσο κοινών (< 10%) όσο και διαφορετικών γονιδίων. Ακόμη και η ισομορφή hGRα-D, στην οποία απουσιάζει η AF-1 περιοχή και σχεδόν το 80% του αμινοτελικού άκρου, ρυθμίζει την έκφραση περίπου 1800 γονιδίων κατά την ενεργοποίησή της (Lu et al., 2007). Οι διαφορές που προκύπτουν σε επίπεδο μεταγραφικής ρύθμισης οδηγούν σε λειτουργικές διαφορές στην επαγώμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση. Έτσι, κύτταρα οστεοσαρκώματος που εκφράζουν την ισομορφή hGRα-C υφίστανται πιο εύκολα απόπτωση σε απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή, ενώ κύτταρα που εκφράζουν τον hGRα-D είναι πιο ανθεκτικά (Lu et al., 2007). Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε μια σχετικά πρόσφατη μελέτη, στην οποία μελετήθηκε το αποπτωτικό μεταγραφωμικό προφίλ των ισομορφών αυτών σε κύτταρα Jurkat T-λεμφοβλαστικής λευχαιμίας (Wu et al., 2013). Η έκθεση των κυττάρων σε δεξαμεθαζόνη προκάλεσε απόπτωση στα κύτταρα Jurkat που εξέφραζαν τις ισομορφές GR-A, -B, ή –C και όχι την ισομορφή GR-D (Wu et al., 2013). Επίσης, η εμπλοκή των ισομορφών αυτών στην επαγώμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση διερευνήθηκε και στα δενδριτικά κύτταρα σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη (Cao et al., 2013). Τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν την ισομορφή GR-D, ενώ τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα έχουν ως επικρατούσα ισομορφή την GR-A, η δε απόκρισή τους στη δεξαμεθαζόνη και η επαγωγή της απόπτωσής τους δείχθηκε ότι επηρεάζεται από την έκφραση των ισομορφών αυτών (Cao et al., 2013)

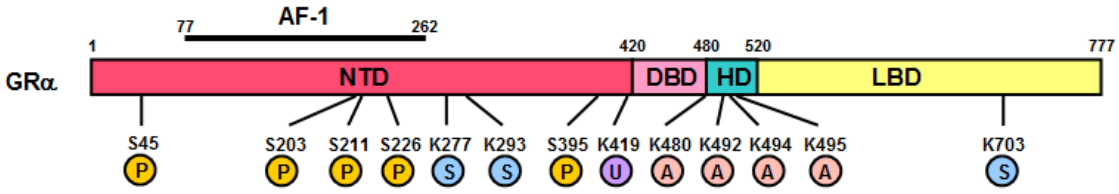
Εκτός από τις διαφορές στη δομή και τη λειτουργία τους, οι ισομορφές αυτές εμφανίζουν διαφορές στην έκφρασή τους σε διαφορετικούς ιστούς (Lu and Cidlowski, 2005). Στα τρωκτικά, η ισομορφή GRα-C εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στο ήπαρ και σε υψηλά επίπεδα στο πάγκρεας, στον πνεύμονα και στο έντερο. Η ισομορφή GRα-D επικρατεί στον σπλήνα και στην ουροδόχο κύστη,

ενώ η έκφρασή της στην καρδιά και στο πάγκρεας βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα (Lu and Cidlowski, 2005). Στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν οι ισομορφές GRα-A και GRα-B είναι οι επικρατούσες, με εξαίρεση τα trabecular meshwork κύτταρα που εκφράζουν τις ισομορφές GRα-C και GRα-D (Nehme et al., 2009).

Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών αναδεικνύουν τις ισομορφές που προκύπτουν από τις εναλλακτικές θέσεις έναρξης της μετάφρασης του mRNA του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της ευαισθησίας των ιστών-στόχων στα γλυκοκορτικοειδή. Δεδομένου ότι το mRNA των hGR-β, hGR-γ και hGR-P είναι κοινό με το αντίστοιχο του hGR-A και εμπεριέχει τα 8 κωδικόνια έναρξης, είναι πιθανόν να προκύπτουν αντίστοιχες ισομορφές, οι οποίες να καθιστούν την απόκριση των ιστών στα γλυκοκορτικοειδή πιο πολύπλοκη και στοχαστική (Chrousos and Kino, 2005; Oakley and Cidlowski, 2011).

1.2.6 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Η κάθε μία ισομορφή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών δύναται να υφίσταται ποικίλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, οι οποίες ρυθμίζουν περαιτέρω την ενεργότητα της πρωτεΐνης, την σταθερότητα των επιπέδων της, την κυτταρική της εντόπιση και επηρεάζουν την ιστική απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή.



Εικόνα 1.10: Σημαντικές θέσεις αμινοξέων στον hGRα που υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. P: φωσφορυλίωση, S: σουμοϋλίωση, U: ουμπικουϊτινυλίωση, A: ακετυλίωση. Οι περισσότερες θέσεις φωσφορυλίωσης εδράζονται στην AF-1 περιοχή, γεγονός το οποίο αναδεικνύει τη σημασία της φωσφορυλίωσης στη μεταγραφική ενεργότητα του hGRα.

- **Φωσφορυλίωση**

Η φωσφορυλίωση ήταν η πρώτη μετα-μεταφραστική τροποποίηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που αναγνωρίστηκε και η περισσότερο μελετημένη. (Beck et al., 2009; Galliher-Beckley and Cidlowski, 2009; Kumar and Calhoun, 2008). Ο hGR διαθέτει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα σερίνης (S113, S141, S203, S211, S226 και S404), η πλειοψηφία των οποίων εδράζεται στην AF-1 περιοχή του αμινοτελικού άκρου της πρωτεΐνης (Ismaili and Garabedian, 2004). Η φωσφορυλίωση του hGRα συμβαίνει μετά από την σύνδεσή του με τα γλυκοκορτικοειδή και ρυθμίζει την ανακύκλωση της πρωτεΐνης, τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της, την ειδικότητα πρόσδεσης σε ιστοειδικούς υποκινητές, την αλληλεπίδραση με άλλους συμπαράγοντες, τη σταθερότητα του μορίου καθώς και τη διάρκεια και την αντοχή του σήματος των γλυκοκορτικοειδών. Επιπρόσθετα, ρυθμίζει τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και συμμετέχει στις μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Παραδείγματα κινασών που φωσφορυλιώνουν τον hGRα *in vitro* και *in vivo* είναι: 1. p34CDC28 (Ismaili and Garabedian, 2004; Wang et al., 2002), 2. p38 (MAPK) (Miller et al., 2005), 3. GSK-3β (Galliher-Beckley et al., 2008; Rogatsky et al., 1998), 4. JNK (Itoh et al., 2002; Rogatsky et al., 1998) και 5. CDK5 (Kino et al., 2007). Η CDK5 αλληλεπιδρά με τον hGRα μέσω της υπομονάδας p35, φωσφορυλιώνει τον hGRα σε πολλά κατάλοιπα σερινών, συμπεριλαμβανομένων των θέσεων 203 και 211 και ρυθμίζει τη μεταγραφική ενεργότητα του hGRα μεταβάλλοντας τη στρατολόγηση των συνενεργοποιητών στα GREs (Kino et al., 2007). Η CDK5 και η p35 εκφράζονται κυρίως στα νευρικά κύτταρα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρυϊκού εγκεφάλου. Η συνεχής έκφραση της CDK5 στο κεντρικό νευρικό σύστημα εμπλέκεται στην παθογένεια νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, όπως η νόσος Alzheimer's και η πλαγία μυοτροφική σκλήρυνση (Dhavan and Tsai, 2001).

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK), ένα μόριο σημαντικό για τη ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης και το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κατανάλωση ενέργειας, φωσφορυλιώνει έμμεσα τον hGRα στη σερίνη 211 μέσω

ενεργοποίησης της p38 MAPK (Nader et al., 2010). Η έμμεση αυτή φωσφορυλίωση δίνει τη δυνατότητα στην AMPK να ρυθμίζει τις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, τροποποιώντας τη μεταγραφή των γονιδίων που ελέγχονται από τα γλυκοκορτικοειδή ανάλογα με τον υποκινητή και τον ιστό (Nader et al., 2010). Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν την AMPK ως ένα πολλά υποσχόμενο στόχο φαρμακολογικής παρέμβασης σε νοσήματα του μεταβολισμού, στα οποία τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν μείζονα παθογενετικό ρόλο.

- **Ουμπικουϊτινυλίωση**

Το σύστημα ουμπικουϊτίνης/πρωτεασώματος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής. Οι πυρηνικοί υποδοχείς, συμπεριλαμβανομένου του hGR, όπως επίσης και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες (p53, cJun, cMyc και E2F-1) υφίστανται ουμπικουϊτινυλίωση και αποδομούνται στο πρωτεάσωμα (Dennis and O'Malley, 2005; Kinyamu et al., 2005). Πολλά ενδιάμεσα μόρια της μεταγραφής, όπως συνενεργοποιητές πυρηνικών υποδοχέων, παράγοντες αναδόμησης της χρωματίνης, καθώς και ορισμένες συνιστώσες της χρωματίνης (ιστόνη H1, πρωτεΐνες HMG) ουμπικουϊτινυλιώνονται και υφίστανται αποδόμηση στο πρωτεάσωμα (Dennis and O'Malley, 2005; Jason et al., 2002; Kinyamu et al., 2005). Επιπρόσθετα, το πρωτεάσωμα αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο της RNA πολυμεράσης II και συνδέεται άμεσα με τις περιοχές των υποκινητών πολλών γονιδίων, ρυθμίζοντας τις μεταγραφικές τους ενεργότητες (Gillette et al., 2004). Με βάση τους μηχανισμούς αυτούς, φαίνεται ότι η ουμπικουϊτινυλίωση και η επακόλουθη αποδόμηση στο πρωτεάσωμα ρυθμίζουν τη μεταγραφική ενεργότητα του hGRα, πιθανώς διαμεσολαβώντας την ταχεία ανακύκλωση των συνδεόμενων με τους υποκινητές μορίων του hGRα και κατά συνέπεια καταστέλλοντας τη μεταγραφική ενεργότητα του hGRα. Η αλληλουχία του GRα στον ποντικό εμπεριέχει ένα μοτίβο PEST ανάμεσα στα αμινοξέα 407-426 (399-419 στον hGRα) δια του οποίου τα ένζυμα ubiqunine-conjugating enzyme E2 και the ubiquitine-ligase enzyme E3 αναγνωρίζουν τα υποστρώματά τους (Wallace and

Cidlowski, 2001). Η λυσίνη στη θέση 426 στον mGRα (θέση 419 στον hGRα) έχει δειχθεί ότι υφίσταται ουμπικουϊτινυλίωση, συμπέρασμα το οποίο εξήχθη όταν κατά την αναστολή της ουμπικουϊτινυλίωσης με το συνθετικό σκεύασμα MG132 παρατηρήθηκε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του φυσικού τύπου GRα, ενώ ο μεταλλαγμένος υποδοχέας από λυσίνη σε αλανίνη στη θέση 426 παρουσίασε περισσότερο αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα και ανθεκτικότητα στο MG132 (Wallace and Cidlowski, 2001).

- **Σουμοϋλίωση**

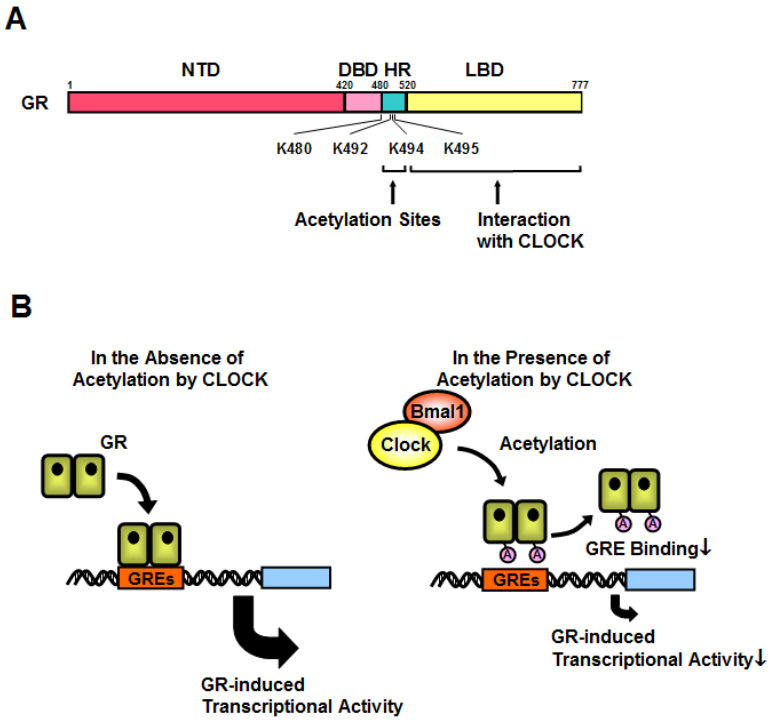
Η αλληλουχία του hGRα διαθέτει τρεις θέσεις σουμοϋλίωσης στις λυσίνες 277, 293 και 703 (Holmstrom et al., 2003). Η σουμοϋλίωση επιφέρει καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του hGRα σε υποκινητή που φέρει πολλαπλά GREs, πιθανώς επηρεάζοντας τη συνεργική δράση πολλών μορίων hGRs που προσδένονται σε αυτό τον υποκινητή (Davies et al., 2008; Le Drean et al., 2002; Tian et al., 2002). Είναι, επίσης, γνωστό ότι η φωσφορυλίωση του rGRα στη θέση 246 (θέση 226 στον hGRα) από την JNK διευκολύνει τη σουμοϋλίωση του υποδοχέα και ρυθμίζει τη μεταγραφική του ενεργότητα κατά τρόπο εξαρτώμενο από το γονίδιο-στόχο (Davies et al., 2008).

- **Ακετυλίωση**

Όλοι οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών ακετυλιώνονται από ακετυλοτρανσφεράσες, όπως p300, p/CAF and Tip60 και διαθέτουν κοινές θέσεις ακετυλίωσης σε ένα υψηλά συντηρημένο μοτίβο ακετυλίωσης KXKK, το οποίο βρίσκεται στην περιοχή αρμού των υποδοχέων αυτών (Faus and Haendler, 2006; Fu et al., 2006; Kim et al., 2006). Ο hGRα ακετυλιώνεται στις λυσίνες 494 και 495 στην περιοχή του αρμού και απακετυλιώνεται από την HDAC2, φαινόμενο το οποίο απαιτείται για την καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του NF-κB από τον ενεργοποιημένο hGR (Ito et al., 2006)

Σε μια πρόσφατη μελέτη, δείχθηκε ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Clock αλληλεπιδρά με τον hGRα στην περιοχή σύνδεσης με τον προδέτη και ακετυλιώνει τον hGRα στις λυσίνες K480, K492, K494 και K495,

καταστέλλοντας τη μεταγραφική ενεργότητα του hGRα σε πολλά γονίδια που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή (Nader et al., 2009; Nader et al., 2010) (**Εικόνα 1.11Α**). Ο Clock (circadian locomotor output cycle kaput), όπως και ο Bmal1 (brain-muscle-arnt-like protein 1) ανήκουν στην υπεροικογένεια των basic helix-loop-helix μεταγραφικών παραγόντων PER-ARNT-SIM (PAS) και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη γένεση των κιρκάδιων ρυθμών έκφρασης πολλών γονιδίων (Takahashi et al., 2008). Η ακετυλίωση του hGRα από τον Clock είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του hGRα, πιθανώς λόγω μείωσης της ικανότητας πρόσδεσης του hGRα στα GREs ή λόγω διαταραγμένης μετατόπισης του υποδοχέα στον πυρήνα (ή λόγω και των δύο αυτών παραγόντων) (Nader et al., 2009; Nader et al., 2010) (**Εικόνα 1.11Β**). Επίσης, δείχθηκε ότι η έκφραση γονιδίων που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή παρουσιάζει διακύμανση κατά κιρκάδιο τρόπο, αντανακλώντας την έκφραση των γονιδίων *Clock/Bmal1*. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας Clock δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της μεταγραφικής ενεργότητας του hGRα, παρέχοντας ένα περιφερικό μηχανισμό ρύθμισης της δράσης των κυκλοφορούντων γλυκοκορτικοειδών.



Εικόνα 1.11 (Α): Τα κατάλοιπα λυσινών στις θέσεις 480, 492, 494 και 495 εδράζονται στην περιοχή αρμού του hGRα και υφίστανται ακετυλίωση από τον Clock μετά από αλληλεπίδρασή του με την LBD του hGRα. **(Β):** Ο ακετυλιωμένος hGRα εμφανίζει μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης στα GREs με αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας.

Σε συνέχεια των *in vitro* αποτελεσμάτων, διερευνήθηκε *in vivo* και *ex vivo* το επίπεδο ακετυλίωσης του hGRα, καθώς και η έκφραση των σχετιζομένων με τον Clock γονιδίων και των γονιδίων που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή σε μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος υγειών ατόμων (Charmandari et al., 2011). Το επίπεδο ακετυλίωσης του hGRα ήταν υψηλό κατά τις πρωινές ώρες και χαμηλό κατά τις απογευματινές ώρες, αντανακλώντας τα επίπεδα της κυκλοφορούσας κορτιζόλης (Charmandari et al., 2011). Επίσης, δείχθηκε ότι η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταγραφικό παράγοντα Clock παρουσίαζε διακύμανση, ενώ ο Clock ρύθμιζε την έκφραση των γονιδίων που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή ανάλογα με το είδος του γονιδίου (Charmandari et al., 2011). Η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η διαμεσολαβούμενη από τον Clock ακετυλίωση του hGRα ελαττώνει

αποτελεσματικά την ευαισθησία των ιστών στις ζενίθ κυκλοφορούσες συγκεντρώσεις των γλυκοκορτικοειδών κατά τις πρωινές ώρες, ενώ το αντίθετο συμβαίνει κατά τις βραδινές ώρες στην παρουσία των ναδίρ συγκεντρώσεων της κορτιζόλης (Charmandari et al., 2011).

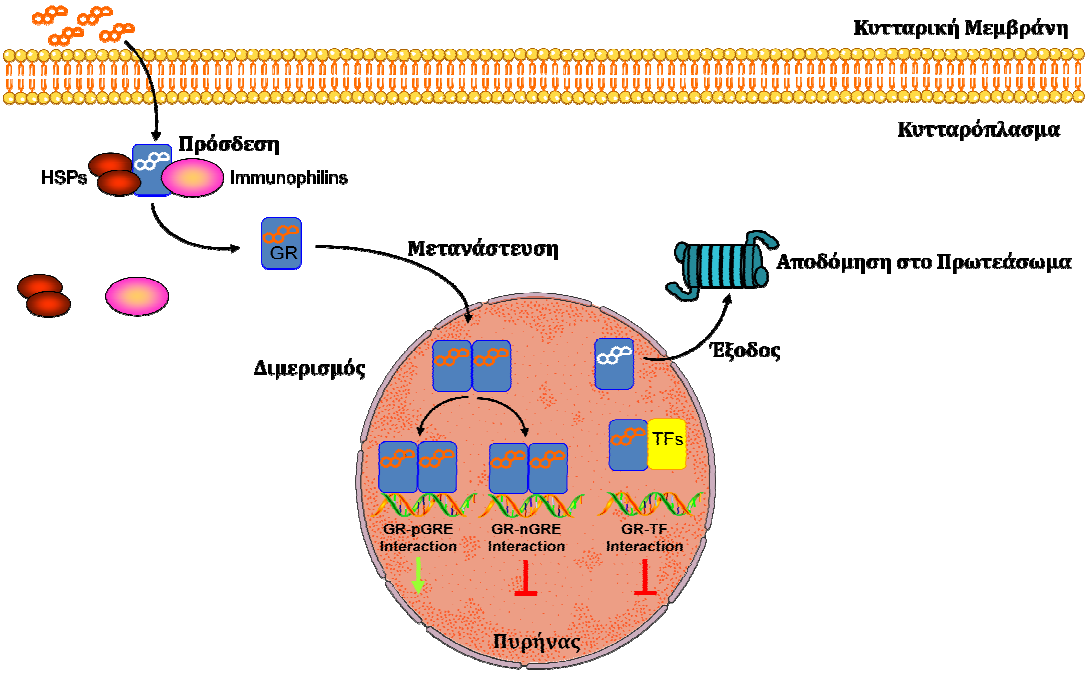
Η αποσύνδεση των κεντρικών και περιφερικών συνιστωσών του συστήματος CLOCK ή/και η αποσύνδεση της αλληλεπίδρασης του συστήματος του στρες με το σύστημα CLOCK θα μπορούσε να οδηγήσει σε λειτουργική υπερκορτιζολαιμία στους περιφερικούς ιστούς με επιβλαβείς δράσεις των γλυκοκορτικοειδών στο καρδιαγγειακό σύστημα (Charmandari et al., 2011; Kino and Chrousos, 2011; Kino and Chrousos, 2011; Nader et al., 2009; Nader et al., 2010).

1.3 ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

1.3.1 Άξονας μεταγωγής σήματος των γλυκοκορτικοειδών (Εικόνα 1.12)

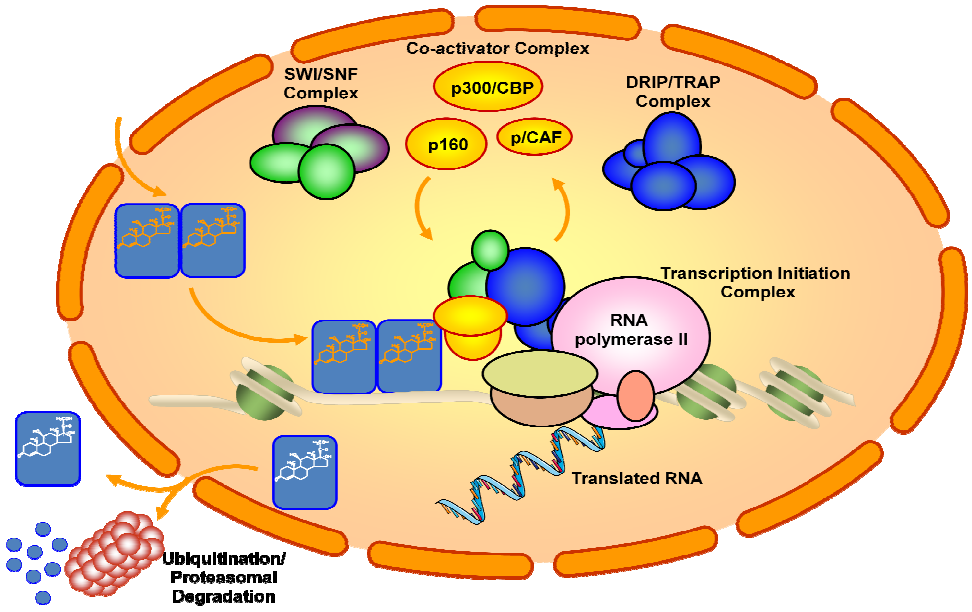
Κατά την απουσία προσδέτη, ο hGRα εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ως τμήμα ενός ετερο-ολιγομερούς συμπλέγματος, το οποίο περιλαμβάνει συνοδές πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins) (HSPs) 90, 70 και 50, αλλά και άλλες πρωτεΐνες (Pratt, 1993). Η HSP90 ρυθμίζει την πρόσδεση της ορμόνης στον υποδοχέα, αλλά και την παραμονή του hGRα στο κυτταρόπλασμα, εκθέτοντας την περιοχή του υποδοχέα στην οποία προσδένεται η ορμόνη και αποκρύβοντας τις δύο αλληλουχίες που είναι υπεύθυνες για τη μετανάστευση του υποδοχέα στον πυρήνα (NL), NL1 και NL2. Όταν ο υποδοχέας ενεργοποιηθεί από τον προσδέτη, διαχωρίζεται από το πολυπρωτεϊνικό σύμπλεγμα και μεταναστεύει στον πυρήνα (Pratt, 1993; Terry et al., 2007). Εκεί, ο υποδοχέας προσδένεται ως ομοδιμερές/ετεροδιμερές στις αλληλουχίες που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid response elements) (GREs), οι οποίες εντοπίζονται στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων, και ρυθμίζει την έκφραση των τελευταίων θετικά ή αρνητικά, ανάλογα με την αλληλουχία GRE και το περιεχόμενο

του υποκινητή (Bamberger et al., 1996; Schaaf and Cidlowski, 2002). Εναλλακτικά, ο ενεργοποιημένος -μετά από πρόσδεση- hGRα μπορεί να τροποποιήσει τη γονιδιακή έκφραση ανεξάρτητα από την πρόσδεσή του στο DNA, αλληλεπιδρώντας -πιθανώς ως μονομερές- με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως η ενεργοποιητική πρωτεΐνη-1 (activator protein-1) (AP-1), ο πυρηνικός παράγοντας κΒ (nuclear factor-κB) (NF-κB) και οι μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής (STATs) (Chrousos and Kino, 2005; Jonat et al., 1990; Kino and Chrousos, 2002; Scheinman et al., 1995). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές θα αναφερθούν λεπτομερώς σε επόμενη παράγραφο της διδακτορικής διατριβής. Μετά την ενεργοποίηση ή την αναστολή της μεταγραφής των γονιδίων που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή, ο hGRα διαχωρίζεται από τον προσδέτη και αποκτά χαμηλότερη συγγένεια πρόσδεσης με τις αλληλουχίες GREs. Ο μη προσδεδεμένος hGRα παραμένει στον πυρήνα για ένα σεβαστό χρονικό διάστημα και, ακολούθως, βγαίνει προς το κυτταρόπλασμα. Τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα ο hGRα μπορεί να ανακυκλώνεται και/ή να αποδομείται στο πρωτεάσωμα (Liu and DeFranco, 2000).



Εικόνα 1.12: Άξονας μεταγωγής σήματος των γλυκοκορτικοειδών. HSPs: heat shock proteins, GR: glucocorticoid receptor, TFs: transcription factors.

Προκειμένου να ξεκινήσει η μεταγραφή, ο hGRα χρησιμοποιεί τις περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής (activation function) (AF)-1 και AF-2 ως επιφάνειες αλληλεπίδρασης με συνενεργοποιητές πυρηνικών υποδοχέων [p160, p300/cyclic AMP-response element (CRE)-binding protein (CBP) και p300/CBP-associated factor (p/CAF)], συμπλέγματα ανακατασκευής της χρωματίνης [switching sucrose nonfermenting (SWI/SNF) και vitamin D receptor-interacting protein (DRIP)/thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP)] και γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Auboeuf et al., 2002; Hittelman et al., 1999; McKenna et al., 1999; McKenna and O'Malley, 2002; McKenna et al., 1999). Οι συνενεργοποιητές p160, όπως ο steroid receptor coactivator 1 (SRC1) και ο glucocorticoid receptor-interacting protein 1 (GRIP1), αλληλεπιδρούν άμεσα τόσο με την περιοχή AF-1 του hGRα διαμέσου του καρβοξυτελικού τους άκρου όσο και με την περιοχή AF-2 διαμέσου πολλαπλών αμφιπαθητικών μοτίβων αμινοξέων LXXLL που εντοπίζονται στην περιοχή πρόσδεσης με τον πυρηνικό υποδοχέα (nuclear receptor-binding) (NRB) (Heery et al., 1997). Επιπρόσθετα, έχουν δραστηριότητα ακετυλοτρανσφεράσης της ιστόνης η οποία προάγει την αποσυμπύκνωση της χρωματίνης και επιτρέπει στο σύμπλεγμα έναρξης μεταγραφής της RNA-πολυμεράσης και των συνιστωσών της να ξεκινήσουν και να προάγουν τη μεταγραφή (Auboeuf et al., 2002; McKenna et al., 1999; McKenna and O'Malley, 2002; McKenna et al., 1999) (**Εικόνα 1.13**).



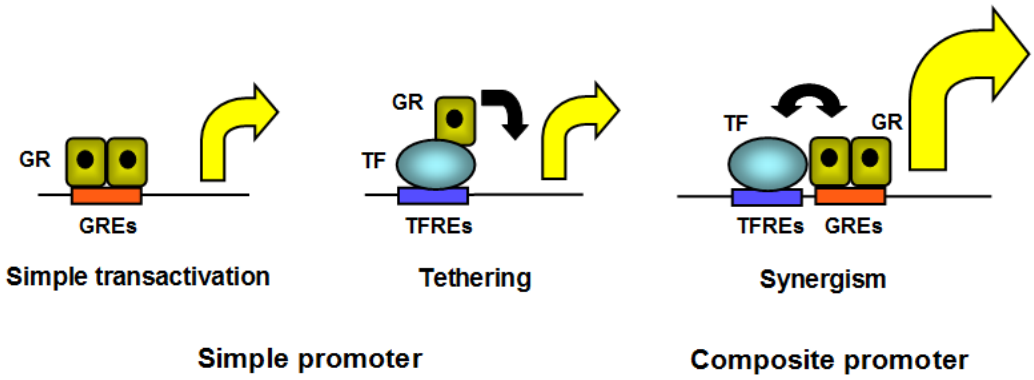
Εικόνα 1.13: Αλληλεπίδραση του hGRα με συνενεργοποιητές, συμπλέγματα ανακατασκευής της χρωματίνης και γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες για την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων. CBP: cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-binding protein, DRIP: vitamin D receptor-interacting protein, p/CAF: p300/CBP-associated factor, SWI/SNF: mating-type switching/sucrose non-fermenting, TRAP: thyroid hormone receptor-associated protein.

1.3.2 Αλληλεπιδράσεις του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες

Τα γλυκοκορτικοειδή διαμεσολαβούν τις ποικιλοτρόπες δράσεις τους διαμέσου του οικείου τους υποδοχέα. Οι ορμόνες αυτές μπορούν να επηρεάσουν άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, επιδρώντας στην ικανότητα των τελευταίων να επάγουν ή να καταστέλλουν τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους. Η δραστηριότητα αυτή φαίνεται να είναι πιο σημαντική από την πρόσδεση στα GREs, δεδομένου ότι ποντικοί, οι οποίοι φέρουν μεταλλαγμένο GRα που είναι ικανός να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες και ταυτόχρονα ανενεργός στη μεταγραφή γονιδίων μέσω πρόσδεσης στο DNA, επιβιώνουν. Σε αντίθεση, ποντικοί με απάλειψη ολόκληρου του *GR* γονιδίου καταλήγουν αμέσως μετά τη γέννησή τους με βαρύ σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας (Cole et al., 1995;

Reichardt et al., 1998). Τα *in vivo* ευρήματα αυτά, καθώς και *in vitro* αποτελέσματα δείχνουν ότι ο GR αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ως μονομερές και επηρεάζει τη μεταγραφική ενεργότητα των τελευταίων (Reichardt et al., 1998; Reichardt et al., 2001).

Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του hGRα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες λαμβάνουν χώρα σε υποκινητές οι οποίοι δεν περιέχουν GREs (tethering mechanism), αλλά και σε υποκινητές που περιέχουν τόσο GREs όσο και αλληλουχίες που αποκρίνονται στους μεταγραφικούς παράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρά ο GRα (composite promoters) (**Εικόνα 1.14**) (Miner and Yamamoto, 1991). Η καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας αυτών των μεταγραφικών παραγόντων μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και της φλεγμονής από τα γλυκοκορτικοειδή (Reichardt et al., 1998; Reichardt et al., 2001). Ορισμένες από τις δράσεις των ορμονών αυτών στο ανοσοποιητικό σύστημα μπορούν να αποδοθούν στην αλληλεπίδραση μεταξύ του hGRα και του NF-κB, του AP-1 και ενδεχομένως των STATs (Barnes and Karin, 1997; Didonato et al., 1996; Karin and Chang, 2001). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι ο hGR αλληλεπιδρά άμεσα με τους μεταγραφικούς παράγοντες «T-box expressed in T-cells» (T-bet) και GATA-3, οι οποίοι έχουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των T helper-1 και T helper-2 λεμφοκυττάρων (Liberman et al., 2009; Liberman et al., 2007). Επιπρόσθετα, ο hGR επηρεάζει έμμεσα τις δράσεις του ρυθμιστικού παράγοντα 3 της ιντερφερόνης (IRF-3) μέσω του GRIP, ανταγωνιζόμενος τον IRF-3 στην πρόσδεσή του με τον GRIP (Reily et al., 2006). Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι σημαντικοί για τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και οι αναφερθείσες αλληλεπιδράσεις μπορούν να ερμηνεύσουν ορισμένες δράσεις του hGR στο ανοσοποιητικό σύστημα. Στη συνέχεια, αναλύονται διεξοδικά οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του hGR με σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες.



Εικόνα 1.14: Τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί ρύθμισης της μεταγραφής γονιδίων από τον hGR. Ο hGR δύναται να αλληλεπιδρά με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες άμεσα ή έμμεσα επηρεάζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων των μεταγραφικών παραγόντων.

1. Nuclear Factor-κB (NF-κB)

Ο NF-κB είναι ένας από τους πιο σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν τη φλεγμονή και πολλές λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος. Πρόκειται για ένα ετεροδιμερές που απαρτίζεται από ποικίλα πρωτεϊνικά μόρια, όπως το p50, το p52, το p65 (RelA), το c-Rel και το RelB. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB ενεργοποιείται από φλεγμονώδη σήματα και κυτταροκίνες, με αποτέλεσμα το κλασικό ετεροδιμερές p65/p50 να προσδένεται στις αλληλουχίες που αποκρίνονται στον NF-κB (κB-response elements) στους υποκινητές γονιδίων-στόχων ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων αυτών (Barnes and Karin, 1997; Perkins, 2000). Ο ενεργοποιημένος hGRα αλληλεπιδρά άμεσα με την υπομονάδα p65 του NF-κB μέσω της DBD και καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του NF-κB, ενώ ο τελευταίος καταστέλλει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων του hGRα μέσω GREs. Η αλληλεπίδραση του NF-κB με τον hGRα αναστέλλει την πρόσδεση του πρώτου με το DNA των γονιδίων-στόχων ή ουδετεροποιεί την ικανότητά του να μετάγει επιτυχώς το φλεγμονώδες σήμα (Caldenhoven et al., 1995; Liden et al., 1997; McKay and Cidlowski, 1999; Wissink et al., 1997). Η LBD του hGRα αποδείχθηκε ότι είναι απαραίτητη για την κατασταλτική δράση του hGRα επί του NF-κB (McKay and Cidlowski,

1998). Εκτός από την αλληλεπίδρασή του με την p65 υπομονάδα του NF-κB, ένας άλλος μηχανισμός καταστολής του NF-κB από τον hGRα είναι η πρόσδεση του hGRα στις αλληλουχίες που αποκρίνονται στον NF-κB και η επακόλουθη στρατολόγηση της απακετυλάσης της ιστόνης και/ή η ρύθμιση της φωσφορυλίωσης του καρβοξυτελικού άκρου της RNA πολυμεράσης II (Ito et al., 2000; Nissen and Yamamoto, 2000). Επίσης, ο ενεργοποιημένος hGRα επάγει την έκφραση της κινάσης του NF-κB (IκB), μέσω πρόσδεσής του σε κλασικά GREs, με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του NF-κB και την επακόλουθη αποδόμησή του στο πρωτεάσωμα (Auphan et al., 1995).

2. Activator Protein-1 (AP-1)

Ο AP-1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση (Herrlich, 2001; Karin and Chang, 2001; van Dam and Castellazzi, 2001). Ο μεταγραφικός παράγοντας αυτός και ο hGRα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και καταστέλλουν τη μεταγραφική ενεργότητα ένθεν και ένθεν. Η LBD και η DBD του hGRα λαμβάνουν μέρος στην αλληλεπίδραση αυτή (Schule et al., 1990). Ο hGRα αναστέλλει την πρόσδεση του AP-1 στο DNA και επιπλέον ανταγωνίζεται με τον AP-1 για την αλληλεπίδραση με τον συνενεργοποιητή p300/CBP. Οι μηχανισμοί αυτοί διέπουν την καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του AP-1 από τον hGRα (Kamei et al., 1996).

3. cAMP-Responsive Element-Binding Protein (CREB)

Ο CREB καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του hGRα και αντίστροφα (Chatterjee et al., 1991; Stauber et al., 1992). Αν και έχει αναφερθεί η άμεση αλληλεπίδραση των δύο μεταγραφικών παραγόντων *in vitro*, η φυσική τους αλληλεπίδραση δεν είναι απολύτως ξεκάθαρη (Imai et al., 1993; Stauber et al., 1992). Επιπρόσθετα, οι δύο μεταγραφικοί παράγοντες συνεργιστικά ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων που εκφράζουν την φωσφοενολοπυροσταφυλική καρβοξικινάση (PEPCK) και τη σωματοστατίνη, οι

υποκινητές των οποίων φέρουν αλληλουχίες GRE και CRE (Imai et al., 1993; Liu et al., 1994).

4. Smad6

Μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών Smad μετάγουν το σήμα μελών της υπεροικογένειας του Transforming Growth Factor (TGF) β, όπως ο TGFβ, η ακτιβίνη και οι Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) (ten Dijke et al., 2000). Ο Smad6 δείχθηκε ότι αλληλεπιδρά με το αμινοτελικό άκρο του hGRα και καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του hGRα *in vitro* (Ichijo et al., 2005). Η διαμεσολαβούμενη από αδενοϊό υπερέκφραση του Smad6 αναστέλλει τη δράση των γλυκοκορτικοειδών στο ήπαρ επίμυος *in vivo* αποτρέποντας την επαγώμενη από δεξαμεθαζόνη αύξηση των επιπέδων γλυκόζης του αίματος και της έκφρασης mRNA της φωσφοενολοπυροσταφυλικής καρβοξικινάσης στο ήπαρ (Ichijo et al., 2005). Ο Smad6 καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του hGRα προσελκύοντας την απακετυλάση 3 της ιστόνης (HDAC3) στον προσδεδεμένο στο DNA hGRα και ανταγωνιζόμενος την ακετυλίωση των ιστονών Η3 και Η4 από την p160 ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης (Ichijo et al., 2005). Συνεπώς, ο Smad6 ρυθμίζει τις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών ως καταστολέας του hGRα. Οι αντι-γλυκοκορτικοειδικές δράσεις του Smad6 ενδέχεται να συμβάλλουν στις νευροπροστατευτικές, αντι-καταβολικές και επάγουσες την επούλωση του τραύματος ιδιότητες της οικογένειας των πρωτεϊνών TGFβ (Ichijo et al., 2005).

5. CAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP)

Ο C/EBP είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας με σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση στο έμβρυο επιδρώντας στο ήπαρ, τον λιπώδη ιστό, το ανοσοποιητικό σύστημα και τους αιμοποιητικούς ιστούς. Ο C/EBP ρυθμίζει συνεργιστικά τη μεταγραφή γονιδίων που περιέχουν στον υποκινητή τους περιοχής πρόσδεσης του hGRα και του C/EBP (Nishio et al., 1993). Από την άλλη πλευρά, ο hGRα ενισχύει τη δράση του C/EBP σε υποκινητή γονιδίου που περιέχει περιοχή πρόσδεσης μόνο για τον C/EBP (Boruk

et al., 1998; Nishio et al., 1993). Έχει, επίσης, αναφερθεί η *in vitro* αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών.

6. Liver-X-Receptor (LXR)

Ο LXR αποτελεί σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα στο μεταβολισμό. Προσδένει τους μεταβολίτες της χοληστερόλης, σχηματίζει ετεροδιμερή με τον retinoid X receptor (RXR) και ρυθμίζει τον κύκλο της χοληστερόλης, τον ηπατικό μεταβολισμό της γλυκόζης μέσω μείωσης της έκφρασης του ενζύμου G6Pase, ενώ καταστέλλει μια κατηγορία γονιδίων που εμπλέκονται στη φλεγμονή στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Nader et al., 2012). Πρόσφατα *in vitro* και *in vivo* αποτελέσματα έδειξαν ότι ο LXR μειώνει τη μεταγραφική ενεργότητα του hGRα ανταγωνιζόμενος τον τελευταίο στην πρόσδεσή του στα GREs (Nader et al., 2012). Το ενεργοποιημένο ετεροδιμερές LXRα/RXRα δείχθηκε ότι προσδένεται στα GREs, αναστέλλοντας την πρόσδεση του hGRα στις αλληλουχίες αυτές, με αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του hGRα (Nader et al., 2012). Τα ευρήματα αυτά κρίνονται σημαντικά, δεδομένου ότι η χορήγηση αγωνιστών του LXR θα μπορούσε να αποβεί ευεργετική σε δυσλειτουργία του μεταβολισμού, η οποία σχετίζεται με χορήγηση γλυκοκορτικοειδών ή με το στρες, καταστέλλοντας τη μεταγραφική ενεργότητα του hGRα σε γονίδια που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της γλυκόζης και/ή των λιπιδίων.

7. Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες

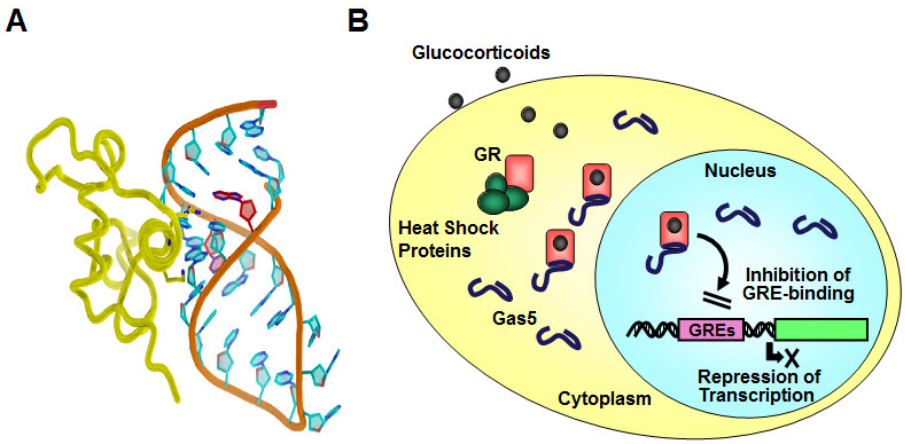
Έχει αναφερθεί λειτουργική αλληλεπίδραση του hGRα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο chicken ovalbumin promoter-upstream transcription factor II (COUP-TFII), ο HNF-6, οι «ορφανοί» υποδοχείς NR4A, όπως ο neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1), ο nuclear receptor-related 1 (NURR1) και ο Nur77, ο p53, ο GATA-1, ο Oct-1 και -2, ο NF-1 και ο Sp-1. Ο COUP-TFII είναι ένας πυρηνικός υποδοχέας με άγνωστο προσδέτη που διαδραματίζει ρόλο στη νευρογένεση και στον μεταβολισμό της γλυκόζης, των λιπιδίων και των ξενοβιοτικών. Αλληλεπιδρά με την περιοχή αρμού του hGRα

και καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του hGRα προσελκύοντας ένα συγκαταστολέα (SMRT) (De Martino et al., 2004). Ο HNF6 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στον ηπατικό μεταβολισμό της γλυκόζης. Καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του hGRα αλληλεπιδρώντας με την DBD του hGRα μέσω της αμινοτελικής περιοχής του (Pierreux et al., 1999). Η αλληλεπίδραση του πυρηνικού υποδοχέα Nurr77 με τον hGRα έχει μεγάλη σημασία στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της προοπιομελανοκορτίνης (Philips et al., 1997). Ο ογκοκατασταλτικός παράγοντας p53 αλληλεπιδρά με τον hGRα στο κυτταρόπλασμα καταστέλλοντας τη μεταγραφική ενεργότητα του τελευταίου και αντίστροφα, μέσω αύξησης του ρυθμού αποδόμησης (Sengupta et al., 2000; Sengupta and Wasylyk, 2001). Επιπρόσθετα, ο hGRα αλληλεπιδρά με τον Oct-1 και τον Oct-2 στον υποκινητή mouse mammary tumor virus (MMTV) και στον υποκινητή του εκλυτικού παράγοντα των γοναδοτροπινών (GnRH) (Chandran et al., 1999; Hartig and Cato, 1994; Prefontaine et al., 1998; Subramaniam et al., 1998; Truss et al., 1995). Ο NF-1, ο οποίος επίσης επάγει τον υποκινητή MMTV, αλληλεπιδρά με τον hGRα και ρυθμίζει τη ενεργότητα του υποκινητή αυτού (Archer et al., 1991; Hartig and Cato, 1994). Ο GATA-1, μεταγραφικός παράγοντας με σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση της ερυθροειδούς σειράς, καταστέλλεται από τον hGRα μέσω αλληλεπίδρασης με το αμινοτελικό άκρο του τελευταίου (Chang et al., 1993).

1.3.3 Αλληλεπίδραση με το μη-κωδικοποιό RNA Growth Arrest-specific 5 (Gas5)

Η διαθεσιμότητα των διατροφικών συστατικών επηρεάζει την κυτταρική αύξηση και την επιβίωση επιδρώντας στη μεταγραφή γονιδίων, ενώ τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και ελέγχουν, σε επίπεδο μεταγραφής, την κυτταρική αύξηση, την κατανάλωση ενέργειας και την επιβίωση. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το growth arrest-specific 5 (Gas5), το οποίο είναι ένα μη-κωδικοποιό RNA που εκφράζεται από την αλληλουχία του εξονίου του γονιδίου του Gas5 και το οποίο συσσωρεύεται σε κύτταρα των οποίων η αύξηση έχει σταματήσει λόγω ανεπάρκειας

διατροφικών συστατικών ή αυξητικών παραγόντων, λειτουργεί ως RNA καταστολέας του hGR καθώς και ορισμένων άλλων υποδοχέων των στεροειδών ορμονών (Kino et al., 2010). Το Gas5 ευαισθητοποιεί τα κύτταρα προς απόπτωση, καταστέλλοντας τη διαμεσολαβούμενη από τα γλυκοκορτικοειδή επαγωγή πολλών γονιδίων, όπως το γονίδιο που κωδικοποιεί τον κυτταρικό αναστολέα 2 της απόπτωσης, καθώς και το γονίδιο της serum/glucocorticoid-responsive kinase (SGK). Ο μηχανισμός της καταστολής της μεταγραφικής ενεργότητας του hGRα από τον Gas5 έχει αποδοθεί στην πρόσδεση του Gas5 στην περιοχή σύνδεσης του hGRα με το DNA, μιμούμενο τις αλληλουχίες GREs και ανταγωνιζόμενο με το DNA για την σύνδεση του hGRα (**Εικόνα 1.15**) (Kino et al., 2010). Συμπερασματικά, ο Gas5 δρα ως ριβο-καταστολέας του hGRα, επηρεάζοντας την κυτταρική επιβίωση και τις μεταβολικές δραστηριότητες κατά την έλλειψη διατροφικών συστατικών, ρυθμίζοντας την μεταγραφική ενεργότητα του hGRα.



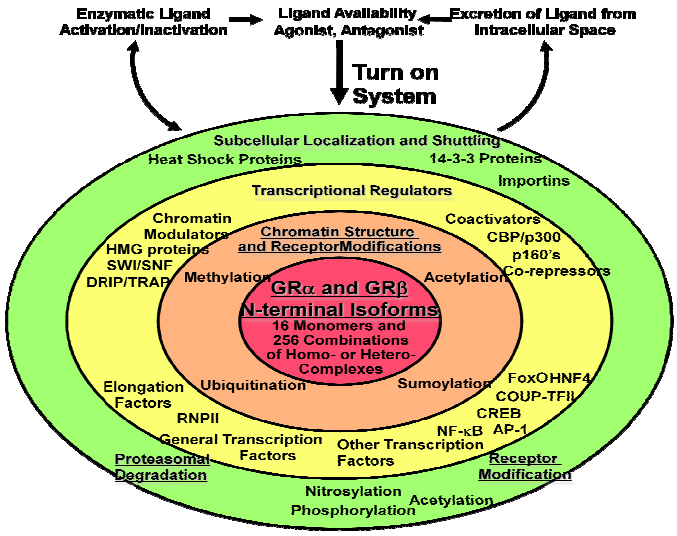
Εικόνα 1.15 (Α): Αλληλεπίδραση του Gas5 με την DBD του hGR **(Β):** Ο Gas5 αποτρέπει την πρόσδεση του hGR στα GREs καταστέλλοντας τη μεταγραφική του ενεργότητα.

1.3.4 Οι γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών ως ομοιοστατικό σύστημα

Οι πιο πάνω δράσεις των γλυκοκορτικοειδών αναφέρονται ως «γενωμικές» δράσεις. Απαιτούν ώρες για να εκτυλιχθούν πλήρως και χαρακτηρίζονται φαρμακολογικά από την ευαισθησία σε αναστολείς μεταγραφής και μετάφρασης, όπως η ακτινομυκίνη D ή η κυκλοεξιμίδη. Οι επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στη σταθερότητα του mRNA μπορούν επίσης να συμπεριληφθούν στον κλασικό γονιδιακό

τρόπο δράσης, διότι επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και μπορούν να είναι ευαίσθητες σε αναστολείς πρωτεϊνοσύνθεσης.

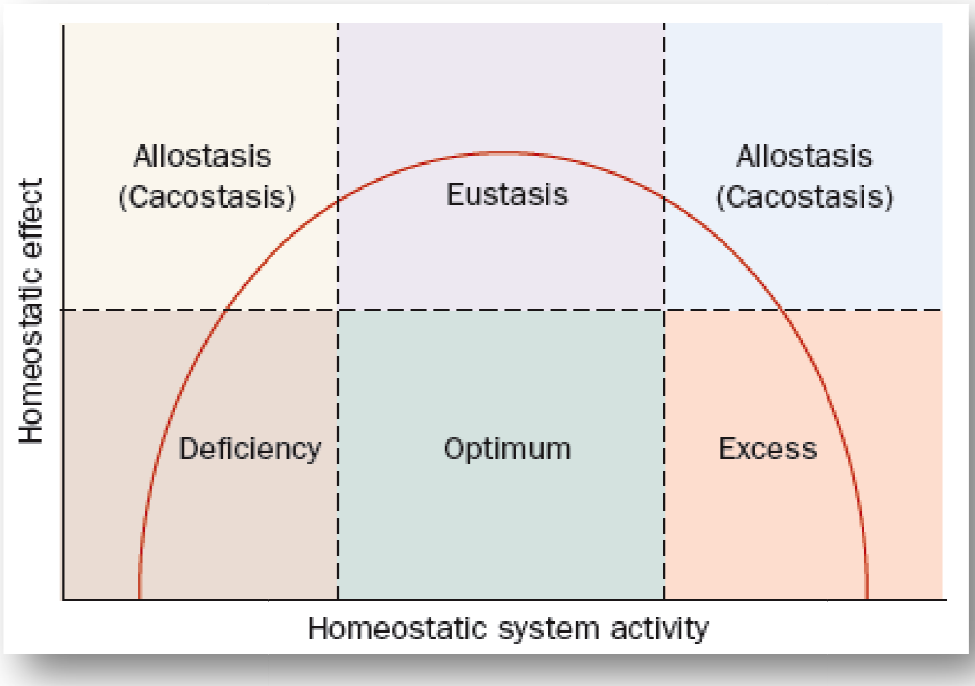
Αν αναλογιστούμε ότι οι 8 διαφορετικές ισομορφές του hGRα δύνανται να σχηματίζουν όμο- ή ετεροδιμερή τόσο μεταξύ τους όσο και με τις δυνητικά 8 ισομορφές του hGRβ, τότε προκύπτουν 256 διαφορετικοί συνδυασμοί διμερών που μετάγουν το σήμα το γλυκοκορτικοειδών. Αν προσθέσουμε σε αυτούς τους συνδυασμούς τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που υφίσταται η κάθε ισομορφή, αλλά και τις αλληλεπιδράσεις με μόρια-ρυθμιστές της μεταγραφής, αλλά και με άλλες πρωτεΐνες, τότε κατανοούμε ότι το φαινομενικά απλό σύστημα των γλυκοκορτικοειδών καθίσταται στοχαστικό (Chrousos and Kino, 2005). Το βιολογικό αποτέλεσμα όλων των δράσεων των γλυκοκορτικοειδών είναι μια απαρτίωση (ολοκλήρωμα στον απειροστικό λογισμό), όπου οι παράγοντες που φαίνονται στην **εικόνα 1.16** είναι οι τελεστές της μαθηματικής εξίσωσης.



Εικόνα 1.16: Η στοχαστική φύση του συστήματος των γλυκοκορτικοειδών.

Όπως όλα τα ομοιοστατικά συστήματα, τα συστήματα που ρυθμίζουν την εσωτερική ισορροπία στον οργανισμό (αρμονία ή ομοιόσταση), έτσι και το στοχαστικό σύστημα των γλυκοκορτικοειδών διέπεται από τη διαχρονική ρήση **«Μηδέν άγαν»**, δηλαδή «τίποτα το υπερβολικό». Κατά συνέπεια, το σύστημα λειτουργεί βέλτιστα εντός ενός φυσιολογικού εύρους, με αποτέλεσμα την εύσταση του οργανισμού. Η υπερβολική

ποσότητα των γλυκοκορτικοειδών (νόσος ή σύνδρομο Cushing) ή η αυξημένη ενεργότητα του hGRα (παροδική υπερευαισθησία των ιστών στα γλυκοκορτικοειδή) οδηγεί σε αλλόσταση ή κακόσταση (Chrousos and Kino, 2005). Στη διαμετρικά αντίθετη πλευρά του ομοιοστατικού συστήματος, η ανεπαρκής ποσότητα των γλυκοκορτικοειδών οδηγεί στην επινεφριδιακή ανεπάρκεια (νόσος του Addison), ενώ η αντίσταση των ιστών στα γλυκοκορτικοειδή ένεκα μεταλλάξεων στο γονίδιο του hGR οδηγεί στο σύνδρομο «Χρούσος». Και οι δύο τελευταίες νοσολογικές οντότητες εμπίπτουν στην αλλόσταση ή κακόσταση με άλλοτε άλλου βαθμού παθολογία στον ανθρώπινο οργανισμό.



Εικόνα 1.17: Τα ομοιοστατικά συστήματα επάγουν τις δράσεις τους έχοντας ως ομοιοστατική απόκριση την ανάστροφη καμπύλη. Η βέλτιστη ενεργότητα προκαλεί την «εύσταση», ενώ η μικρή ή η μεγάλη ενεργότητα προκαλούν «αλλόσταση» ή «κακόσταση».

1.4 ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Επιπροσθέτως των γενωμικών δράσεων, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να επάγουν δράσεις εντός λεπτών ή έστω δευτερολέπτων από τη χορήγησή τους και αυτές οι δράσεις αναφέρονται ως «μη γενωμικές». Μη γενωμική αναφέρεται «οποιαδήποτε δράση, η οποία δεν επηρεάζει άμεσα και αρχικά τη γενωμική έκφραση, αλλά οδηγεί σε

ταχέα αποτελέσματα, όπως την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών» (Losel and Wehling, 2003). Ωστόσο, οι μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών έχουν κάποια διακριτά χαρακτηριστικά. Επιπροσθέτως του βραχέως χρόνου, κατά τον οποίο λαμβάνουν χώρα, αυτά τα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν:

- ένα διαφορετικό φαρμακολογικό προφίλ, διότι οι δράσεις αυτές δεν είναι ευαίσθητες σε αναστολείς μεταγραφής και πρωτεϊνοσύνθεσης,
- δράση σε απύρηνα κύτταρα, όπως αιμοπετάλια, ερυθροκύτταρα και σπερματοζωάρια,
- ικανότητα των στεροειδικών αναλόγων (όπως στεροειδών μορίων συζευγμένων με αλβουμίνη ορού χοίρου), τα οποία δεν έχουν πρόσβαση στο ενδοκυττάριο τμήμα, να προκαλούν απόκριση (Stellato, 2004).

Παραδείγματα μη γενωμικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών αποτελούν:

1. Υπόφυση: Άμεση καταστολή της έκκρισης της ACTH από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης σε ασθενείς που θεραπεύονται με γλυκοκορτικοειδή (Hinz and Hirschelmann, 2000; Keller-Wood and Dallman, 1984). Η ταχεία αυτή αναστολή της απελευθέρωσης της ACTH φαίνεται να διαμεσολαβείται από κλασικούς υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών μέσω εξωπυρηνικών σηματοδοτικών μονοπατιών.

2. Ιππόκαμπος: Ομοίως με τα ευρήματα στην υπόφυση, τα γλυκοκορτικοειδή πυροδοτούν ταχεία σηματοδότηση στον ιππόκαμπο. Η χορήγηση συγκεντρώσεων ως σε στρες κορτικοστερόνης στα CA1 πυραμιδικά κύτταρα ιπποκάμπου ποντικού έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία αύξηση των συχνοτήτων ευοδοτικών μετασυναπτικών δυναμικών (Karst et al., 2005).

3. Καρδιαγγειακό Σύστημα: Η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών σε ασθενείς με έμφραγμα μυοκαρδίου ή αγγειοεγκεφαλικό επεισόδιο οδηγεί σε ταχεία και παροδική πτώση της αρτηριακής πίεσης η οποία συνδέεται με παρεμπίπτουσα αύξηση της στεφανιαίας και εγκεφαλικής αιματικής ροής (Limbourg and Liao, 2003). Σε ποντίκια, η χορήγηση υψηλών δόσεων κορτικοστεροειδών μετά από παροδική ισχαιμία/επαναιμάτωση ελαττώνει τη φλεγμονή των αγγείων και το μέγεθος του εμφράκτου του μυοκαρδίου (Hafezi-Moghadam et al., 2002). Αυτή η δράση φαίνεται να διαμεσολαβείται από τους κλασικούς υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών, διότι μπλοκάρεται τόσο *in vitro* όσο και *in*

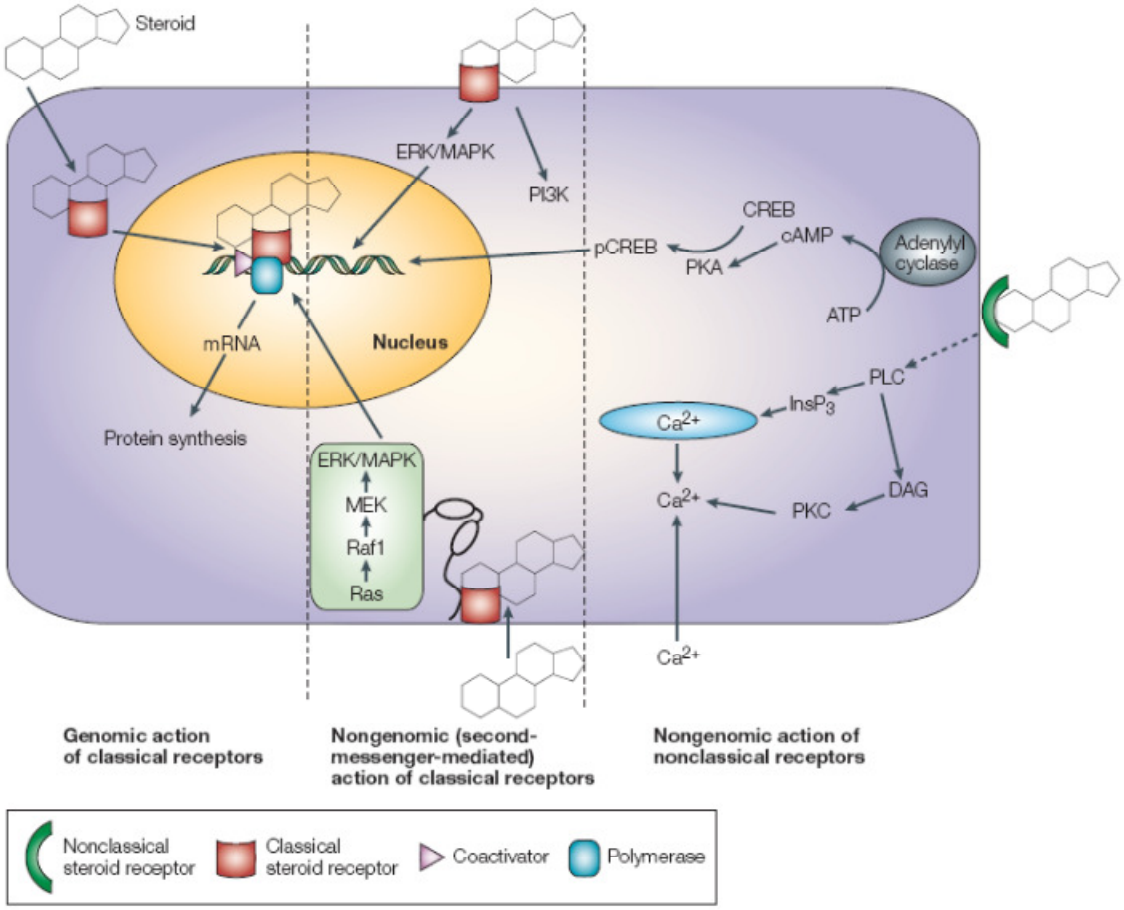
vivo από ανταγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Παρόμοια με τις δράσεις των οιστρογόνων στα αγγεία, τα γλυκοκορτικοειδή ενεργοποιούν ταχέως τις PI_3K και Akt με αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι δράσεις αυτές των γλυκοκορτικοειδών χάνονται σε ποντίκια που δεν έχουν eNOS, καταδεικνύοντας τη σημασία αυτού του ενζύμου στην επαγώμενη από γλυκοκορτικοειδή αγγειοδιαστολή.

4. Ανοσοποιητικό Σύστημα: Τα γλυκοκορτικοειδή έχουν γνωστές κατασταλτικές δράσεις των ανοσολογικών λειτουργιών. Παρά το γεγονός ότι οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν αυτές τις κατασταλτικές δράσεις είναι πιθανόν πολυπαραγοντικοί, η ταχεία σηματοδότηση από τα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των Τ κυττάρων. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών φαίνεται να σχετίζεται με τη σηματοδότηση από τον υποδοχέα των Τ κυττάρων (T cell receptor) (TCR) και η διέγερση των Τ κυττάρων με δεξαμεθαζόνη αναστέλλει τη σηματοδότηση από τον TCR διαμελίζοντας το σύμπλεγμα του τελευταίου με άλλες πρωτεΐνες (Lowenberg et al., 2006).

1.4.1 Μηχανισμοί μη γενωμικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών

Οι μη γενωμικές ταχείες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών διακρίνονται σε αρκετές κατηγορίες με βάση τους πολλαπλούς ετερογενείς μηχανισμούς που εμπλέκονται (Falkenstein et al., 2000). Η πλειοψηφία των ταχέων αυτών δράσεων έχει τεκμηριωθεί σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις. Οι μηχανισμοί δράσης διαφέρουν ως προς την ειδικότητα με βάση τον τύπο κυττάρου που μελετάται και συνήθως διαμεσολαβούνται από τη γένεση πολλών συστημάτων δευτερογενών μηνυτόρων, από αλλαγές στη ροή ιόντων και από την ενεργοποίηση διαφορετικών μονοπατιών κινασών (Stellato, 2004). Σε αρκετές περιπτώσεις, οι μη γενωμικές δράσεις διαμεσολαβούνται από τον κλασικό υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, όπως αποδεικνύεται από την ευαισθησία τους σε ανταγωνιστές πυρηνικών υποδοχέων. Όμως, μερικές από τις μη γενωμικές δράσεις φαίνεται να είναι μη εξαρτώμενες από τους ανταγωνιστές αυτούς, καταδεικνύοντας ότι ένας διαφορετικός συνδεόμενος με τη μεμβράνη υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών διαμεσολαβεί αυτές τις

μη γενωμικές δράσεις (σηματοδότηση από στεροειδή που ξεκινά από τη μεμβράνη) (membrane-initiated steroid signaling) (**26**). Πιο κάτω, αναφέρονται παραδείγματα μη γενωμικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών με βάση τον τρόπο δράσης που προτείνεται στην πρόσφατη κατάταξη (Falkenstein et al., 2000) (**Εικόνα 1.18**).



Εικόνα 1.18: Σχηματική αναπαράσταση των γενωμικών και μη γενωμικών δράσεων των στεροειδών ορμονών. Αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν να συμβούν σε ένα κοινό κύτταρο – σε κανένα κυτταρικό τύπο δεν έχει δειχθεί να συμβαίνουν όλες αυτές οι δράσεις. Τα μονοπάτια δράσης περιλαμβάνουν άμεση ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω κλασικών υποδοχέων (αριστερά), μονοπάτια κινασών που ενεργοποιούνται από κλασικούς υποδοχείς (μεσαίο τμήμα), καθώς και μονοπάτια κυκλικού AMP, λιπασών και κινασών, συμπεριλαμβανομένων των ροών ιόντων, τα οποία ενεργοποιούνται από μη κλασικούς υποδοχείς (δεξιά). Μερικά σηματοδοτικά μονοπάτια τελικά οδηγούν σε (έμμεση) ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω τροποποίησης μεταγραφικών παραγόντων. CREB: cyclic AMP response-element-binding protein, DAG: διακιλογλυκερόλη, ERK/MAPK: extracellular-signal regulated kinase/mitogen-activated

protein kinase. InsP3: τριφωσφορική ινοσιτόλη, MEK, MAPK και ERK κινάση. pCREB: φωσφορυλιωμένο CREB, PI3K: κινάση της φωσφατίδιλοϊνοσιτόλης 3. PKA: πρωτεϊνική κινάση A, PKC: πρωτεϊνική κινάση C. PLC: φωσφολιπάση C.

1.4.1.1 Μη γενωμικές δράσεις χωρίς την εμπλοκή υποδοχέα

Μερικές από τις μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών φαίνεται να διαμεσολαβούνται από αλλαγή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της κυτταρικής μεμβράνης χωρίς την εμπλοκή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Αυτές οι δράσεις έχουν παρατηρηθεί *in vitro* σε πολλούς κυτταρικούς τύπους (Falkenstein et al., 2000). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ανθρώπινα πρωτογενή επιθηλιακά κύτταρα βρόγχων στα οποία φυσιολογικές συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης προκαλούν μια ταχεία (μέσα σε 15 λεπτά) αντιεκκριτική απόκριση. Επιπρόσθετα, η θεραπεία με δεξαμεθαζόνη έχει ως αποτέλεσμα μια ταχεία ελάττωση στα βασικά και στα επαγώμενα από ATP επίπεδα ενδοκυτταρίου ασβεστίου ($[Ca^{2+}]_i$). Οι τελευταίες αυτές δράσεις δεν αναστέλλονται από κυκλοεξιμίδη ή RU486, αλλά εξαρτώνται από τη διέγερση μιας Ca^{2+}-ATPάσης μέσω αδενυλικής κυκλάσης και πρωτεϊνικής κινάσης A (Urbach et al., 2002) (**Εικόνα 1.18**).

1.4.1.2 Μη γενωμικές δράσεις μέσω κλασικών ενδοκυττάριων υποδοχέων

Αυτές οι δράσεις των γλυκοκορτικοειδών χαρακτηρίζονται από μη ευαισθησία σε αναστολείς μεταγραφής ή μετάφρασης, γεγονός το οποίο καταδεικνύει τη μη γενωμική φύση τους, σε συνδυασμό με την ευαισθησία τους σε ανταγωνιστές πυρηνικών υποδοχέων, το οποίο δείχνει την εμπλοκή μηχανισμών από κλασικούς (ή πυρηνικούς) υποδοχείς. Ένα παράδειγμα αποτελεί η δράση των γλυκοκορτικοειδών στην ενεργοποίηση της eNOS (Hafezi-Moghadam et al., 2002). Οι θεραπευτικές συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης επάγουν σημαντική ενεργοποίηση της eNOS στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσα σε 10 λεπτά και εως 24 ώρες μετά από διέγερση (Hafezi-Moghadam et al., 2002). Αυτή η απόκριση καταστελλόταν σημαντικά από

ειδικούς αναστολείς της PI_3K, όπως επίσης και από ένα ειδικό αναστολέα της eNOS. Σε αντίθεση, χρειάστηκαν τουλάχιστον 4 ώρες προκειμένου η ίδια συγκέντρωση δεξαμεθαζόνης να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή ενός πλασμιδίου αναφοράς με αλληλουχίες αποκρινόμενες στα γλυκοκορτικοειδή, μια δράση ευαίσθητη στο RU486 και στην ακτινομυκίνη D αλλά μη ευαίσθητη σε αναστολείς της PI_3K. Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση της eNOS από τη δεξαμεθαζόνη εμπλέκει ταχείς, μη μεταγραφικούς μηχανισμούς.

1.4.1.3 Μη γενωμικές δράσεις μέσω μη κλασικών υποδοχέων

Δύο σημαντικοί υποψήφιοι για τον συνδεόμενο με τη μεμβράνη υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών έχουν μελετηθεί ως τώρα: ο πρώτος είναι μια 63-kD όξινη γλυκοπρωτεΐνη, η οποία αναγνωρίστηκε σε κυτταροπλασματικές μεμβράνες νευρώνων του αμφιβίου Taricha granulose. Χαρακτηρίστηκε λειτουργικώς ως ένας θεωρούμενος μεμβρανικός υποδοχέας για γλυκοκορτικοειδή, με φαρμακολογικές ιδιότητες εντελώς διαφορετικές από το γνωστό υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Orchinik et al., 1991). Ευρήματα από *in vitro* και *in vivo* μοντέλα εισηγούνται ένα σημαντικό ρόλο αυτού του υποδοχέα στη διαμεσολάβηση τουλάχιστον ορισμένων νευροφυσιολογικών και συμπεριφορικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών (Falkenstein et al., 2000). Ο δεύτερος υποψήφιος έχει αναγνωρισθεί σε κύτταρα θηλαστικών ως τροποποιημένη μορφή του κλασικού υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και ο οποίος πιθανολογείται ότι λειτουργεί ως συνδεόμενος με μεμβράνη υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (mGR) (Gametchu et al., 1999). Αρκετές μελέτες έχουν προσδιορίσει διαφορές στην κυτταρική εντόπιση, στο μοριακό μέγεθος και στην ειδικότητα ως προς τα γλυκοκορτικοειδή μεταξύ του κλασικού GR και του mGR, αλλά έχουν επίσης καταδείξει αρκετές κοινές πτυχές των δύο υποδοχέων οι οποίες υποστηρίζουν την ταυτότητα του mGR ως τροποποιημένο GR: αναγνώριση κοινών επιτόπων από διαφορετικά αντισώματα έναντι του GR, παρόμοια ικανότητα πρόσδεσης στις συνοδές πρωτεΐνες θερμικού σοκ ή στο DNA και παρόμοια μοτίβα φωσφορυλίωσης (Loscalzo, 1995). Χρησιμοποιώντας κυτταρικούς πληθυσμούς με είτε υψηλή είτε χαμηλή έκφραση του mGR, η παρουσία αυτού του υποδοχέα έχει

λειτουργικώς συνδεθεί με την επαγώμενη από γλυκοκορτικοειδή λύση κυττάρων λεμφώματος και πιθανολογείται ότι παίζει ρόλο στην υποστροφή του θύμου και την απόπτωση (Gametchu, 1987; Gametchu et al., 1999). Η κλωνοποίηση του θεωρούμενου mGR θα είναι αναγκαία για την απόκτηση πιο διευκρινιστικών πληροφοριών που αφορούν στη φύση και, πιο σημαντικά, στις λειτουργίες που διαμεσολαβεί.

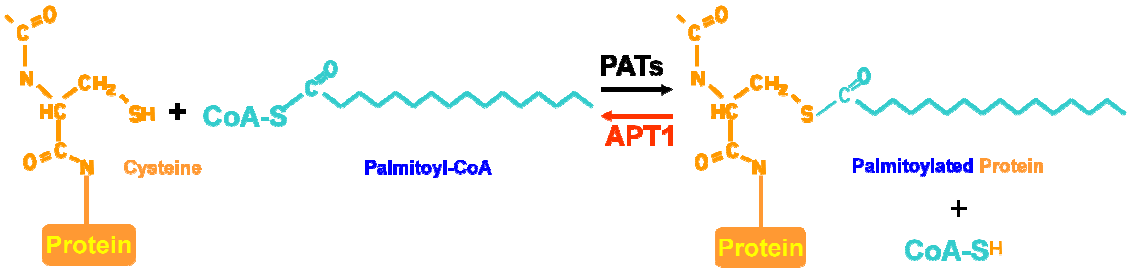
1.5 ΠΑΛΜΙΤΥΛΙΩΣΗ

1.5.1 Αγκυροβόληση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών στην κυτταρική μεμβράνη

Μηχανιστικά, μερικές ταχείες μη γενωμικές δράσεις των στεροειδών ορμονών συμβαίνουν μέσω της αγκυροβόλησης των συνηθισμένων υποδοχέων των στεροειδών ορμονών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Επιπλέον πληροφορίες συνηγορούν υπέρ της ιδέας ότι οι εντοπιζόμενοι στη μεμβράνη υποδοχείς των στεροειδών ορμονών είναι οι ίδιες πρωτεΐνες με τους πυρηνικούς υποδοχείς οι οποίοι μεταφέρονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με μη ξεκάθαρους μηχανισμούς. Ειδικότερα, η ανοσοϊστοχημεία ενδογενών μεμβρανικών υποδοχέων οιστρογόνων, υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών και υποδοχέα αλατοκορτικοειδών, χρησιμοποιώντας ένα σύνολο αντισωμάτων κατευθυνόμενων έναντι πολλαπλών επιτόπων πυρηνικών υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, υποστηρίζει ισχυρά την παρουσία τέτοιων υποδοχέων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Bartholome et al., 2004; Gametchu and Watson, 2002; Pappas et al., 1995; Younglai et al., 2006). Από την άλλη πλευρά, οι ταχείες μη γενωμικές δράσεις των στεροειδών ορμονών που αναφέρθηκαν σε κύτταρα που δεν έχουν τους κλασικούς υποδοχείς, έχουν οδηγήσει στην αναγνώριση νέων μη συνηθισμένων συνδεόμενων με οιστρογόνα, γλυκοκορτικοειδή και προγεστερόνη πρωτεϊνών, που συνδέονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Marino and Ascenzi, 2006).

1.5.2 Παλμιτυλίωση

Οι ομοιοπολικές λιπιδιακές τροποποιήσεις αγκυροβολούν πολλαπλές σηματοδοτικές πρωτεΐνες στην κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Ειδικότερα, η S-παλμιτυλίωση των πρωτεϊνών παίζει σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση της λειτουργίας των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια κύκλων ενεργοποίησης και απενεργοποίησης (Dunphy and Linder, 1998). Η S-παλμιτυλίωση αναφέρεται ως μια αντιστρεπτή σύνδεση μέσω θιεστερικού δεσμού του παλμιτικού οξέος (κορεσμένο λιπαρό οξύ με 16 άνθρακες) με κατάλοιπα κυστεΐνης διαλυτών πρωτεϊνών που φέρουν υδρόφοβα τμήματα (**Εικόνα 1.19**). Αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση καταλύεται από συνδεόμενες με τη μεμβράνη παλμιτόυλ-ακέτυλ-τρανσφεράσες (PATs) και αυξάνει την υδροφοβικότητα των πρωτεϊνών, επιτρέποντας κατά τον τρόπο αυτό στις πρωτεΐνες να συνδέονται με τη μεμβράνη. Λόγω της αντιστρεπτής της φύσης, η αντίδραση αυτή παρέχει ένα δυναμικό μηχανισμό δίκην διακόπτη ο οποίος επιτρέπει την αγκυροβόληση των πρωτεϊνών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η S-παλμιτυλίωση μπορεί να επηρεάσει τη σύνδεση των πρωτεϊνών στις μεμβράνες, την εντόπιση των πρωτεϊνών εντός του κυττάρου και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (Dunphy and Linder, 1998; Han et al., 2002; Patterson, 2002; Resh, 1999). Έτσι, η παλμιτυλίωση μπορεί να θεωρηθεί ως ένα δευτερογενές σήμα για τη σύνδεση με τη μεμβράνη, δεδομένου ότι άλλα πρωτογενή σήματα πρέπει να μεταφέρουν την πρωτεΐνη στη μεμβράνη για να δώσουν προσβασιμότητα στα ένζυμα (PATs). Όμως, η παλμιτυλίωση μπορεί επίσης να συμβεί σε πρωτεΐνες οι οποίες είναι ήδη ελαφρώς συνδεδεμένες με τη μεμβράνη, συμπεριλαμβανομένων των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, καταδεικνύοντας ότι το παλμιτικό οξύ είναι κάτι παραπάνω από ένα μεμβρανικό σημείο πρόσδεσης.

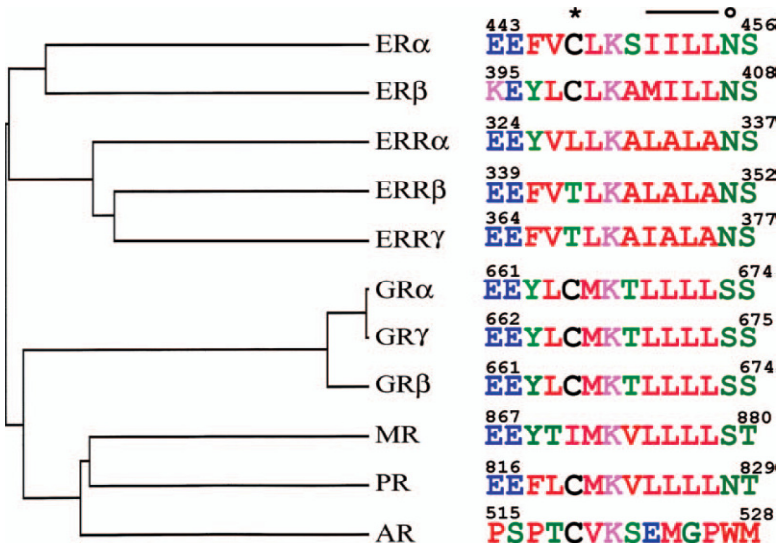


Εικόνα 1.19: Η προσθήκη παλμιτόυλ-ακέτυλο-συνενζύμου Α σε κατάλοιπο κυστεΐνης καταλύεται από τις παλμιτόυλ-ακέτυλ-τρανσφεράσες. Η αντίστροφη αντίδραση (αποπαλμιτυλίωση) καταλύεται από ένζυμα τα οποία δεν έχουν απομονωθεί, μέχρι στιγμής. PATs: palmitoyl-acetyl-transferases. APT1: αποπαλμιτοϋλάση 1

1.5.3 Παλμιτυλίωση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών

Πολλοί επτα-ελικώδεις υποδοχείς συνδεόμενοι με G πρωτεΐνες (GPCR) περιέχουν μια συντηρημένη αλληλουχία F(X6)LL, όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ, F φαινυλαλανίνη και L λευκίνη ή ισολευκίνη (Duvernay et al., 2004). Το F, LL και τα 6 κοντινά αμινοξέα μεταξύ F και LL είναι απαραίτητα για την έξοδο της πρωτεΐνης από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Ένα παρόμοιο με την αλληλουχία F(X6)LL, υψηλά συντηρημένο μοτίβο 9 αμινοξέων έχει αναγνωριστεί στις περιοχές σύνδεσης με τον προσδέτη (E domains) των περισσοτέρων υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, και ιδιαίτερα στον ERα και ERβ ανθρώπου και ποντικού, στους προγεστερονικούς υποδοχείς A και B και στον υποδοχέα των ανδρογόνων. Σε αντίθεση με τους τυπικούς GPCRs, το τρίτο αμινοξύ αυτού του μοτίβου σε όλους τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών, πλην του υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών, είναι κυστεΐνη (**Εικόνα 1.20**). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτό το μοτίβο παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην παλμιτυλίωση, στην εντόπιση στη μεμβράνη και στη σηματοδότηση των στεροειδών (Pedram et al., 2007). Μετάλλαξη της φαινυλαλανίνης ή της τυροσίνης στη θέση -2, της κυστεΐνης στη θέση 0 και των συνδυασμών των υδρόφοβων αμινοξέων ισολευκίνης/λευκίνης ή λευκίνης/λευκίνης στις θέσεις +5/6, σε σχέση με την κυστεΐνη, προκάλεσαν ελαττωμένη εντόπιση των υποδοχέων στη μεμβράνη, ελαττωμένη ενεργοποίηση των MAPK και PI_3K, ελαττωμένη ενσωμάτωση θυμιδίνης στο DNA και ελαττωμένη κυτταρική

βιωσιμότητα κατόπιν διέγερσης από προσδέτες των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών. Αυτή η αλληλουχία εντόπισης διαμεσολαβούσε την παλμιτυλίωση κάθε υποδοχέα των στεροειδών ορμονών, η οποία διευκόλυνε τη σύνδεση με την καβεολίνη-1, την επακόλουθη εντόπιση στη μεμβράνη και τη σηματοδότηση από στεροειδή. Έτσι, η S-παλμιτυλίωση στην περιοχή Ε είναι σημαντική τροποποίηση για τη μετανάστευση στη μεμβράνη και για τη λειτουργία των κλασικών υποδοχέων των στεροειδών του φύλου (Pedram et al., 2007).



Εικόνα 1.20: Φυλογενετική ανάλυση και ευθυγράμμιση των αλληλουχιών αμινοξέων των ανθρώπινων υποδοχέων των οιστρογόνων (ER), των υποδοχέων των σχετιζομένων με τους υποδοχείς των οιστρογόνων (ERR), των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών (GR), του υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών (MR), του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR) και του υποδοχέα της προγεστερόνης (PR). Το αστέρι, η οριζόντια γραμμή και ο κύκλος δείχνουν την παλμιτυλιούμενη κυστεΐνη, το υδρόφοβο τμήμα και την περιοχή της γλυκοζυλίωσης, αντίστοιχα. Τα κατάλοιπα αμινοξέων έχουν χρωματιστεί με βάση τις χημικές τους ιδιότητες. GenBank accession codes: ERa (NP_000116), ERb (NP_001428), ERRa (NP_004442), ERRb (NP_004443), ERRg (NP_001429), GRa (NP_001018087), GRg (NP_001019265), GRb (NP_001018661), MR (NP_000892), PR (NP_000917), and AR (NP_000035). Το φυλογενετικό δέντρο ελήφθη από AliBee (available from: http://www.genebee.msu.su/index.html). Η ευθυγράμμιση της αλληλουχίας των αμινοξέων έγινε με CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Οι αλληλουχίες των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών ευθυγραμμίστηκαν σύμφωνα με το σταθερό κατάλοιπο Αργινίνης (i.e.K).

Σε συνέχεια των αποτελεσμάτων αυτών και με σκοπό να ανευρεθούν και να μελετηθούν πρωτεΐνες που διευκολύνουν τη μετανάστευση στην κυτταρική μεμβράνη και την επακόλουθη παλμιτυλίωση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, ο Razandi και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η HSP27 αλληλεπιδρά και προσδένεται σε ένα μοτίβο του ERα και προωθεί την παλμιτυλίωση (Razandi et al., 2010). Η επαγώμενη από την HSP27 παλμιτυλίωση του ERα δείχθηκε ότι συμβαίνει στο μονομερές ERα και αυξάνει την αλληλεπίδραση με την καβεολίνη-1 με αποτέλεσμα τη μεμβρανική εντόπιση, την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών κινασών και τη σύνθεση DNA (Razandi et al., 2010). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν για τον PR και για τον AR, αναδεικνύοντας την HSP27 σε δυνητικό στόχο για τη διακοπή της μεμβρανικής ενάρξεως σηματοδότησης των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών στη βιολογία του καρκίνου σε ορμονοεξαρτώμενους όγκους.

Νεότερα δεδομένα επί της παλμιτυλίωσης των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών έδειξαν ότι οι παλμιτόυλ-ακέτυλ-τρανσφεράσες DHHC-7 και -21 καταλύουν την προσθήκη του παλμιτικού οξέος στις υψηλά συντηρημένες κυστεΐνες που εδράζονται στην LBD των υποδοχέων αυτών (Pedram et al., 2012). Τα ένζυμα αυτά αναδείχθηκαν αναγκαία για την παλμιτυλίωση των πρωτεϊνών αυτών, δεδομένου ότι η *in vitro* αποσιώπησή τους απέτρεψε τη μεμβρανική εντόπιση, την παλμιτυλίωση και την ταχεία σηματοδότηση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών που μελετήθηκαν. Συμπερασματικά, ακόμη ένας μοριακός στόχος αναδεικνύεται για την αναστολή της σηματοδότησης από την κυτταρική μεμβράνη των υποδοχέων αυτών (Pedram et al., 2012).

Τα *in vitro* αποτελέσματα της παλμιτυλίωσης των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών ενισχύθηκαν περαιτέρω με *in vivo* μελέτες από την ίδια ερευνητική ομάδα, η οποία δημιούργησε τον διαγονιδιακό ποντικό που εκφράζει μόνο την LBD του ERα στην κυτταρική μεμβράνη [Membrane Only Estrogen Receptor (MOER)] (Pedram et al., 2009). Η μήτρα και οι σάλπιγγες του MOER ήταν εξαιρετικά ατροφικές, ενώ παρατηρήθηκαν πολλαπλές αιμορραγικές κύστεις στις ωοθήκες. Η επιμήκυνση του γαλακτοφόρου πόρου ήταν εξαιρετικά καθυστερημένη και τα τελικά άκρα ήταν μικρά με υποτυπώδη ανάπτυξη (Pedram et al., 2009). Επιπρόσθετα, ο ποντικός MOER εμφάνισε

αυξημένη εναπόθεση λίπους στον κορμό σε σύγκριση με τον φυσικού τύπου ER ποντικό. Πρόκειται για την πρώτη *in vivo* μελέτη του ρόλου της παλμιτυλίωσης του ERα στη φυσιολογία των θηλαστικών (Pedram et al., 2009).

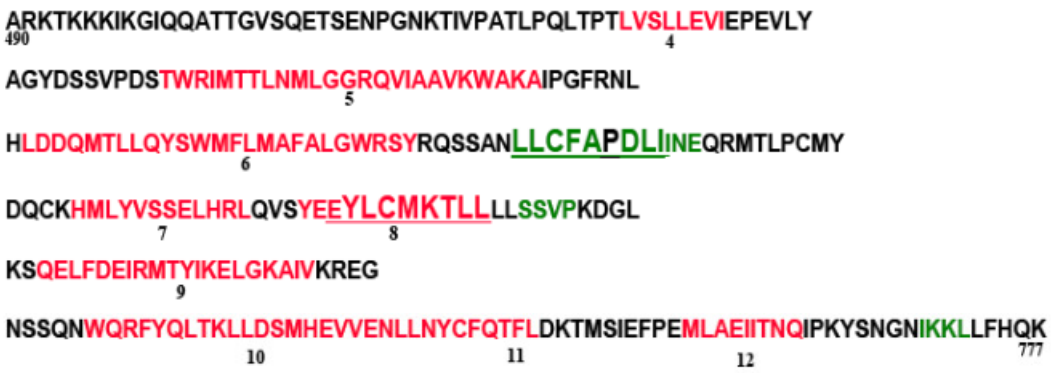
Η ίδια ερευνητική ομάδα, χρησιμοποιώντας ποντικούς που εκφράζουν τον φυσικού τύπου ERα, ποντικούς στους οποίους έχει απαλειφθεί το γονίδιο του ERα και ποντικούς MOER, σύγκρινε το μεταγραφωμικό προφίλ των εκχυλισμάτων των ηπατικών ιστών των ποντικών αυτών μετά από χορήγηση του αγωνιστή του ERα propyl-pyrazole-triol (PPT) (Pedram et al., 2013). Έδειξαν ότι η έκφραση των γονιδίων που σχετίζεται με τη σύνθεση λιπιδίων είναι συγκριτικά ελαττωμένη στον ποντικό MOER σε σχέση με τον ποντικό που εκφράζει τον φυσικού τύπου ERα, ενώ δεν παρατηρήθηκε ελάττωση στον ποντικό στον οποίο έχει απαλειφθεί το γονίδιο του ERα. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι ο mERα ευθύνεται αποκλειστικά για τον φαινότυπο αυτό (Pedram et al., 2013). Τα επίπεδα της χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων και των λιπαρών οξέων ήταν χαμηλότερα στον ποντικό MOER. Η ενεργοποίηση του mERα από το PPT είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της AMPK, η οποία φωσφορυλιώνει τον sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1), αποτρέποντας την πρωτεολυτική αποδόμηση του τελευταίου από την site-1 protease. Έτσι, ο Srebf1 παραμένει στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη σύνθεση των λιπιδίων (Pedram et al., 2013).

1.5.4 Μοτίβο παλμιτυλίωσης στον hGRα

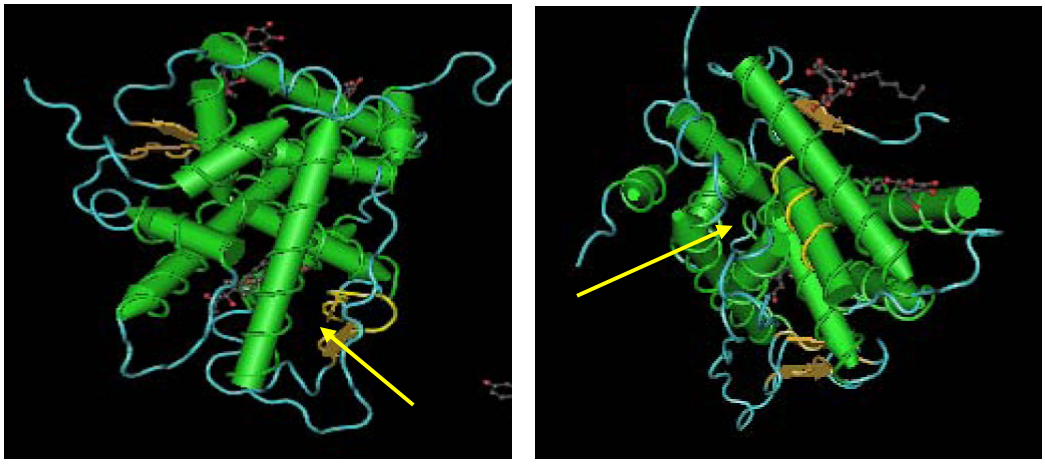
Είναι ενδιαφέρον ότι στην LBD της πρωτεΐνης hGRα, είναι παρούσα μια αλληλουχία υψηλά ομόλογη με την F(X6)LL (663**YLCMKTLLL**671) (**Εικόνα 1.20**), πιθανολογώντας ότι ο hGRα μπορεί να υφίσταται S-παλμιτυλίωση. Η χημική αυτή τροποποίηση μπορεί να είναι υπεύθυνη για τη μεμβρανικής έναρξης ταχεία σηματοδότηση από γλυκοκορτικοειδή. Η αλληλουχία του hGRα η οποία απεικονίζεται στην **εικόνα 1.20** έχει επιπλέον επιβεβαιωθεί ότι παλμιτυλιώνεται με ανάλυση με το CSS-Palm (πρόσβαση: *http://bioinformatics.lcd-ustc.org/css_palm/*) (Zhou et al., 2006). Παρά το γεγονός ότι οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών μπορεί να περιέχουν

συνηθισμένες περιοχές με μεγαλύτερη πιθανότητα παλμιτυλίωσης (υψηλότερο σκορ) όταν αναλύθηκαν με το CSS-Palm, οι περιοχές αυτές απορρίφθηκαν λόγω διαμόρφωσης της πρωτεΐνης, σχηματισμού του δισουλφιδικού δεσμού και προσβασιμότητας της κυστεΐνης. Ομοίως, ο hGRα περιέχει 20 κατάλοιπα κυστεΐνης: 5 απ' αυτά βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο (Cys223, Cys245, Cys287, Cys302, Cys367), 10 στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) (Cys421, Cys424, Cys431, Cys438, Cys441, Cys457, Cys463, Cys473, Cys476, Cys481) και 5 στην περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη (LBD) (Cys622, Cys638, Cys643, Cys665, Cys736). Οκτώ από τα δέκα κατάλοιπα κυστεΐνης παρόντα στη DBD του hGRα εμπλέκονται στα κέντρα των δύο δαχτύλων ψευδαργύρου (Cys421, Cys424, Cys438, Cys441 και Cys457, Cys463, Cys473, Cys476, αντίστοιχα). Επιπρόσθετα της αλληλουχίας 663**YLCMKTLLL**671, ακόμη ένα μοτίβο 9 αμινοξέων στη LBD του hGRα (620**LLCFAPDLI**628) φαίνεται πιθανό να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξαρτώμενη από παλμιτυλίωση σύνδεση με τη μεμβράνη. Η θέση των δύο αυτών μοτίβων στην κρυσταλλική δομή της LBD του hGRα απεικονίζεται στην **εικόνα 1.21**.

A



B



Εικόνα 1.21: (A) Κρυσταλλική δομή της περιοχής σύνδεσης με τον προσδέτη (LBD) του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών-άλφα (hGRα). Οι έλικες έχουν κόκκινο χρώμα, ενώ οι β-πτυχωτές δομές έχουν πράσινο χρώμα. Οι δύο αλληλουχίες 9 αμινοξέων είναι έντονες. **(B)** Στερεοτακτική διαμόρφωση της υπό αγωνιστή μορφής της LBD του hGRα. Τα κίτρινα βέλη δείχνουν τις αλληλουχίες των 9 αμινοξέων 620**LLCFAPDLI**628 (αριστερά) και 663**YLCMKTLLL**671 (δεξιά).

Παρά το γεγονός ότι η S-παλμιτυλίωση αγκυροβολεί πολλές σηματοδοτικές πρωτεΐνες στην κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης (Bijlmakers and Marsh, 2003; Smotrys and Linder, 2004), αυτή η λιπιδιακή τροποποίηση πρέπει να θεωρείται ως κάτι περισσότερο από ένα απλό μηχανισμό μεμβρανικής σύνδεσης για διαφορετικές διαλυτές πρωτεΐνες. Στην πραγματικότητα, λόγω της αντιστρεπτής της φύσης, η S-παλμιτυλίωση είναι ιδιαιτέρως σημαντική για την τροποποίηση της ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των πρωτεϊνών (Dunphy and Linder, 1998; Smotrys and Linder, 2004). Έτσι, η προσθήκη ή η αποσύνδεση του παλμιτικού είναι μια δυναμική τροποποίηση η οποία είναι συνεχώς ανακυκλούμενη στις κυτταρικές πρωτεΐνες (Marino et al., 2006). Συμπερασματικά, η S-παλμιτυλίωση φαίνεται να είναι κοινό γνώρισμα ορισμένων υποδοχέων των στεροειδών ορμονών. Έχοντας υπόψιν ότι όλες οι στεροειδείς ορμόνες έχουν υποδοχείς ικανούς να δημιουργήσουν ταχείες αποκρίσεις, οι σημειακές μεταλλάξεις στους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών και ο χαρακτηρισμός της

παλμιτουλ-ακετυλοτρανσφεράσης θα βοηθήσουν ώστε να εστιάσουμε στο ρόλο που παίζουν η/οι χημική/ές τροποποίηση/ποιήσεις στην ενεργότητα και στην εντόπιση των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών. **Αυτές οι μελέτες θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη δημιουργία ειδικών αγωνιστών και ανταγωνιστών με καλά χαρακτηρισμένες δράσεις ικανές να τροποποιήσουν διακριτές επαγώμενες από στεροειδείς ορμόνες κυτταρικές λειτουργίες με ιδιαίτερη έμφαση στην υγεία του ανθρώπου.**

2. Υλικά και Μέθοδοι

ΥΛΙΚΑ

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή προήλθαν από τους ακόλουθους οίκους:

Κυτταροκαλλιέργειες

Είδος	Οίκος
Θρεπτικό κυττάρων DMEM	GIBCO
Τρυψίνη-EDTA	GIBCO
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-ορού pH7.4 (PBS)	GIBCO
Ορός εμβρύου βοός (FBS)	GIBCO
Ορός εμβρύου βοός χωρίς στεροειδή (charcoal dextran treated FBS)	PIERCE
Διάλυμα πενικιλλίνης-στρεπτομυκίνης (Pen/Strept Solution)	GIBCO
Θρεπτικό με μειωμένο ορό (OPTIMEM I)	GIBCO
Λιποφεκτίνη (Lipofectin)	INVITROGEN
Λιποφεκταμίνη (Lipofectamine)	INVITROGEN
Αντιδραστήριο διαμόλυνσης κυττάρων FUGENE	ROCHE
Διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO)	SIGMA

Υγρά Χημικά

Είδος	Οίκος
NNN'N'-τετραμεθυλο-αιθυλενοδιαμίνη (TEMED)	SIGMA ALDRICH
Οξικό οξύ 100%	APPLICHEM
Απόλυτη αιθανόλη	SIGMA ALDRICH
TWEEN® 20	APPLICHEM
Οκτυλο-φαινοξυ-πολυαιθοξυαιθανόλη (Nonidet P40)	APPLICHEM
Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30%	BIORAD
Διάλυμα αιθυλοβρωμιδίου 1%	INVITROGEN
Παραφορμαλδεΰδη	USB CORPORATION

Διάλυμα φαινόλης	SIGMA
N, N-Διμεθυλφορμαμίδιο	SIGMA
Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 3M	SIGMA
Υδροχλωρικό οξύ	SIGMA ALDRICH
Γλυκερόλη	SIGMA ALDRICH
β-Μερκαπτοαιθανόλη	SIGMA
Τριαιθανολαμίνη	SIGMA
Ισοπροπανόλη	SCHARLAU
Μεθανόλη	FISHER CHEMICAL
Κλίμακα μοριακών μεγεθών DNA	FERMENTAS
Κλίμακα μοριακών βαρών για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	FERMENTAS
Δίαλυμα χρώσης πρωτεϊνών	FERMENTAS
Θρεπτικό υλικό S.O.C. για βακτήρια	INVITROGEN
EDTA	APPLICHEM
NP-40	APPLICHEM

Χημικά σε Σκόνη

Είδος	**Οίκος**
Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)	SIGMA
Υπερθειικό αμμώνιο (Ammonium persulfate)	APPLICHEM
Θρεπτικό υλικό LB (Luria Broth)	APPLICHEM
Κυανό της βρωμοφαινόλης	APPLICHEM
HEPES	APPLICHEM
Ισοπροπυλο-β-D-θειογαλακτο-πυρανοζίδιο (IPTG)	SIGMA
Δεξαμεθαζόνη	SIGMA ALDRICH
Χλωριούχο νάτριο	SIGMA ALDRICH
5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλο- β-D-γαλακτοπυρανοζίδιο X-Gal	SIGMA ALDRICH
LB-άγαρ	APPLICHEM
Δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS)	SIGMA
Φαινυλο-μεθανο-σουλφονυλο-φθορίδιο (PMSF)	SIGMA

2-Βρωμοεξαδεκανοϊκό οξύ (2-Bromohexadecanoic acid)	SIGMA
Γλυκίνη	SIGMA
Ponceau S	SIGMA
Τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο Trizma	SIGMA
Αγαρόζη	LONZA
Αμπικιλίνη	SIGMA
HEPES	APPLICHEM
$MgCl_2$	FLUKA
KCl	CARLERBA

Κιτ

Είδος	**Οίκος**
Quick Change Site-Directed Mutagenesis	STRATAGENE
Κιτ απομόνωσης πλασμιδιακού DNA mini	PROMEGA
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Plasmid Mega Kit	QIAGEN
Dual-Luciferase Reporter Assay System	PROMEGA
Complete Lysis, mammalian	ROCHE
Subcellular Protein Fractionation Kit	THERMO SCIENTIFIC
ECL Prime Western Blotting Detection	AMERSHAM

Πρωτογενή Αντισώματα

Είδος	**Οίκος**
Μονοκλωνικό αντίσωμα Caveolin-1 (7C8)	SANTA CRUZ
Πολυκλωνικό αντίσωμα Caveolin-1 (N-20)	SANTA CRUZ
Πολυκλωνικό αντίσωμα p44/42 MAPK (ERK1/2) (thr202/tyr204)	CELL SIGNALING
Πολυκλωνικό αντίσωμα pAkt (Ser473)	CELL SIGNALING
Πολυκλωνικό αντίσωμα ERK1/2	CELL SIGNALING

Πολυκλωνικό αντίσωμα Akt	CELL SIGNALING
Μονοκλωνικό αντίσωμα GR (2F8)	DIAGENODE
Πολυκλωνικό αντίσωμα GR (P-20)	SANTA CRUZ
Πολυκλωνικό αντίσωμα GR (P-20) X	SANTA CRUZ
Πολυκλωνικό αντίσωμα GRα	THERMO SCIENTIFIC

Δευτερογενή Αντισώματα

Είδος	**Οίκος**
Ανοσοσφαιρίνη ποντικού συνδεδεμένη με υπεροξειδάση (polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin HRP)	DAKOCYTOMATION
Ανοσοσφαιρίνη κονίκλου συνδεδεμένη με υπεροξειδάση (polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin HRP)	DAKOCYTOMATION
Ανοσοσφαιρίνη κονίκλου συνδεδεμένη με Alexa Fluor® 594 (Alexa Fluor® 594 donkey anti-rabbit IgG)	INVITROGEN
Ανοσοσφαιρίνη ποντικού συνδεδεμένη με Fluorescein (Fluorescein goat anti-mouse IgG)	INVITROGEN

Ραδιενεργά

Είδος	**Οίκος**
(9,10-3H(N)) Παλμιτικό Οξύ	PERKIN ELMER

2. Υλικά και Μέθοδοι

ΜΕΘΟΔΟΙ

Α. Πλασμίδια

Το πλασμίδιο **pRShGRα** εκφράζει τον hGRα υπό τον έλεγχο του υποκινητή Rous Sarcoma Virus (RSV). Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για τη δημιουργία μεταλλάξεων με σημειακή κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), καθώς και ως πλασμίδιο που εκφράζει τον φυσικού τύπου υποδοχέα σε όλα τα πειράματα.

Το πλασμίδιο **pF25GFPhGRα** εκφράζει τον hGRα συζευγμένο με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για τη δημιουργία του μεταλλαγμένου υποδοχέα pF25GFPhGRαC665A, καθώς και για τις δοκιμασίες μετατόπισης του υποδοχέα στον πυρήνα μετά από προσθήκη δεξαμεθαζόνης.

Το πλασμίδιο **pMMTV-luc** εκφράζει τη λουσιφεράση υπό τον έλεγχο του επαγώμενου από τα γλυκοκορτικοειδή υποκινητή mouse mammary tumor virus (MMTV). Το πλασμίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμασίες ενεργοποίησης γονιδίων.

Το πλασμίδιο **pGL4.73[hRluc/SV40]** εκφράζει τη λουσιφεράση *Renilla* υπό τον έλεγχο του ενισχυτή SV40 και χρησιμοποιήθηκε ως ενδογενές πλασμίδιο αναφοράς στις δοκιμασίες ενεργοποίησης γονιδίων από τον φυσικού τύπου υποδοχέα και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς.

Β. Κυτταρικές Σειρές

Τα **CV-1** νεφρικά εμβρυονικά κύτταρα Αφρικανικού πιθήκου, τα οποία δεν εκφράζουν ενδογενώς τον hGRα, χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες ενεργοποίησης γονιδίων από τον φυσικού τύπου υποδοχέα και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς και στο στύπωμα κατά Western. Πρόκειται για προσκολλητική κυτταρική σειρά (adherent cells).

Τα **COS-7** νεφρικά εμβρυονικά κύτταρα Αφρικανικού πιθήκου, τα οποία επίσης δεν εκφράζουν ενδογενώς τον hGRα, χρησιμοποιήθηκαν στο στύπωμα κατά Western,

στα πειράματα ανοσοφθορισμού, στα πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης, στα πειράματα ενεργοποίησης κινασών και στα πειράματα παλμιτυλίωσης. Πρόκειται για προσκολλητική κυτταρική σειρά (adherent cells).

Τα **HeLa** ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου τραχήλου μήτρας, τα οποία εκφράζουν ενδογενώς τον hGRα, χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες μετατόπισης του υποδοχέα στον πυρήνα μετά από έκθεση σε δεξαμεθαζόνη. Πρόκειται για προσκολλητική κυτταρική σειρά (adherent cells).

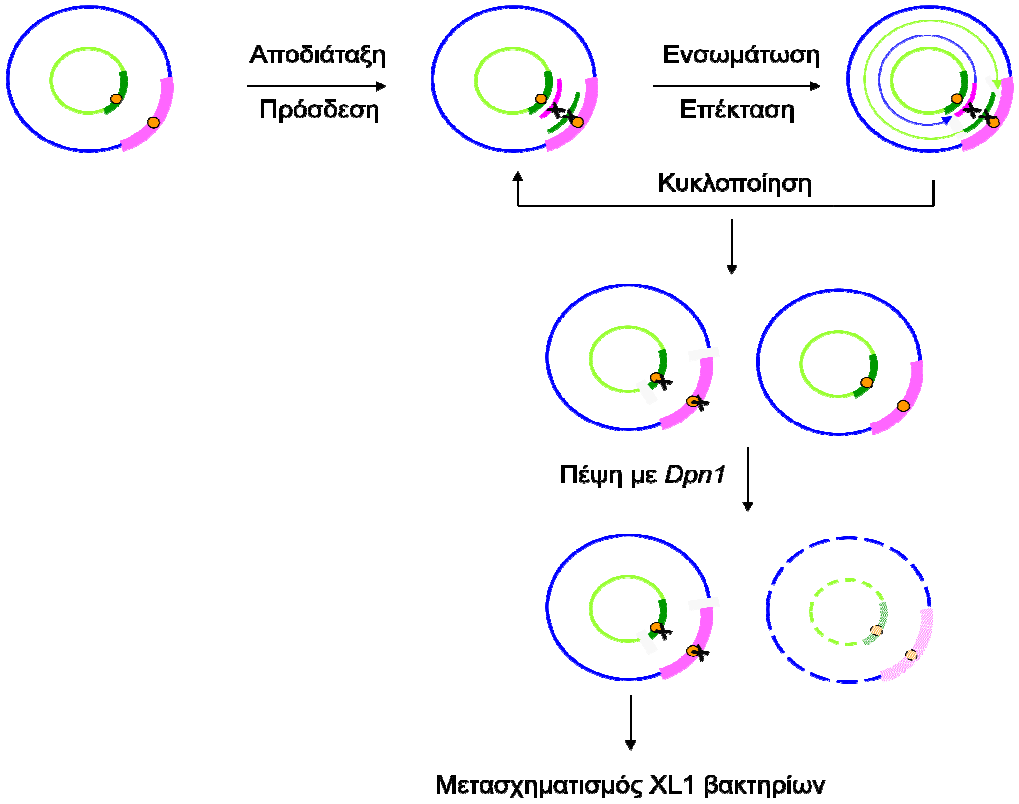
Γ. Τεχνικές

1. Σημειακή Κατευθυνόμενη Μεταλλαξιγένεση με Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR-assisted Site-Directed Mutagenesis) με βάση το πρωτόκολο από την εταιρεία Stratagene (QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis, Catalog ≠200518).

Βασικές αρχές μεθόδου

Η σημειακή κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση είναι μια μέθοδος μοριακής βιολογίας, η οποία εξυπηρετεί τη μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας μιας πρωτεΐνης και χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό μεταλλάξεων και την αντικατάσταση, απαλειφή ή ενσωμάτωση ενός ή περισσοτέρων βάσεων σε δίκλωνο πλασμίδιο. Κατά τη διεξαγωγή της μεθόδου αυτής, χρησιμοποιείται η *PfuTurbo*® DNA πολυμεράση, η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό και των δύο κλώνων του πλασμιδίου με υψηλή πιστότητα, χωρίς τη μετατόπιση των εκκινητών που προκαλούν τη μεταλλαξιγένεση. Οι εκκινητές (forward και reverse), συμπληρωματικοί ως προς τους αντίθετους κλώνους του πλασμιδίου, επεκτείνονται με τη δράση της *PfuTurbo*® DNA πολυμεράσης κατά τη διάρκεια του προγράμματος θερμικής κυκλοποίησης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλαγμένου πλασμιδίου, αλλά και την παραμονή του μητρικού πλασμιδίου στο προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Ακολουθεί πέψη του προϊόντος με την ενδονουκλεάση *Dpn* I, με αποτέλεσμα την καταστροφή του μεθυλιωμένου μητρικού πλασμιδίου και τη διατήρηση του μεταλλαγμένου πλασμιδίου. Το τελευταίο εισάγεται σε χημειοδεκτικά βακτήρια XL-1 με μετασχηματισμό θερμικής ώσης. Στη συνέχεια, τα

βακτήρια επιστρώνονται σε τρυβλία με θρεπτικό LB, αμπικιλλίνη, IPTG και X-gal, επωάζονται για 18 ώρες στους 37°C και ελέγχονται για τον σχηματισμό αποικιών.



Εικόνα 2.1: Βασικές αρχές σημειακής κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης. Μετά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, το προϊόν υπόκειται σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Dpn1* και ακολουθεί μετασχηματισμός χημειοδεκτικών βακτηρίων.

Στη σημειακή κατευθυνόμενη μεταλαξιγένεση χρησιμοποιείται το πλασμίδιο pWhitescript™ ως πλασμίδιο αναφοράς για τον έλεγχο του επιτυχούς σχηματισμού του μεταλλαγμένου πλασμιδίου. Το πλασμίδιο αυτό φέρει ένα κωδικόνιο λήξης (TAA) στο σημείο όπου θα εμφανιζόταν φυσιολογικά ένα κωδικόνιο γλουταμίνης (CAA) στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης του πλασμιδίου pBluescript® II SK(-). Ο μετασχηματισμός των XL1 βακτηρίων με το pWhitescript™ δίνει λευκές αποικίες σε τρυβλία με θρεπτικό LB, αμπικιλλίνη, IPTG και X-gal, επειδή η β-γαλακτοσιδάση δεν εκφράζεται, λόγω του κωδικονίου λήξης. Οι εκκινητές ελέγχου (control primers) δημιουργούν μια σημειακή μετάλλαξη στο πλασμίδιο pWhitescript™ κατά την οποία

αντικαθίσταται η βάση Τ του κωδικονίου λήξης (TAA) από τη βάση C (CAA) στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μπλε αποικιών στο τρυβλίο ελέγχου.

Πρωτόκολο μεθόδου

Σχεδιασμός εκκινητών: Για τον σχεδιασμό των εκκινητών, εντοπίστηκε στο cDNA του hGRα η θέση στην οποία θα προκαλείτο η συγκεκριμένη μετάλλαξη και ακολούθως σχεδιάστηκαν οι εκκινητές (forward και reverse) έτσι ώστε να έχουν μήκος 40-45 βάσεις, να περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη περίπου στο μέσο του μήκους, να έχουν ~40% περιεκτικότητα σε γουανίνη ή/και κυτοσίνη (G ή/και C) και να έχουν Tm (melting temperature, δηλαδή θερμοκρασία κατά την οποία προσδένεται το 50% των εκκινητών στο εκμαγείο) άνω των 78°C. Με βάση τις αρχές αυτές, σχεδιάστηκαν οι εκκινητές για τα ακόλουθα πλασμίδια: pRShGRαY663A, pRShGRαC665A, pRShGRαLL670/671AA και pF25GFPhGRαC665A, όπως φαίνονται στον **πίνακα 1**.

Πίνακας 1: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σημειακή κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση.

Εκκινητής	Αλληλουχία
665 Forward (5'→3')	CTTATGAAGAGTATCTCGCCATGAAAACCTTACTGC
665 Reverse (5'→3')	GCAGTAAGGTTTTCATGGCGAGATACTCTTCATAAG
663 Forward (5'→3')	GGCTTCAGGTATCTTATGAAGAGGCCCTCTGTATGAAAACC
663 Reverse (5'→3')	GGTTTTCATACAGAGGGCCTCTTCATAAGATACCTGAAGCC
670/671 Forward (5'→3')	CTCTGTATGAAAACCTTAGCGGCGCTCTCTTCAGTTCCTAAGG
670/671 Reverse (5'→3')	CCTTAGGAACTGAAGAGAGCGCCGCTAAGGTTTTCATACAGAG

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης: Για τη σύνθεση των μεταλλαγμένων κλώνων χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Πρόκειται για μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο της μοριακής βιολογίας, κατά την οποία επιτυγχάνεται *in vitro* ο πολλαπλασιασμός τμήματος DNA με τη δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση. Το ένζυμο συναρμολογεί ένα νέο κλώνο DNA, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τον ένα εκ των αποδιαταχθέντων κλώνων του μητρικού DNA, καθώς και ολιγονουκλεοτίδια DNA (εκκινητές) στο αρχικό στάδιο.

Η μέθοδος περιλαμβάνει τρία στάδια: 1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, 2. Πρόσδεση των εκκινητών στο εκμαγείο. 3. Επιμήκυνση.

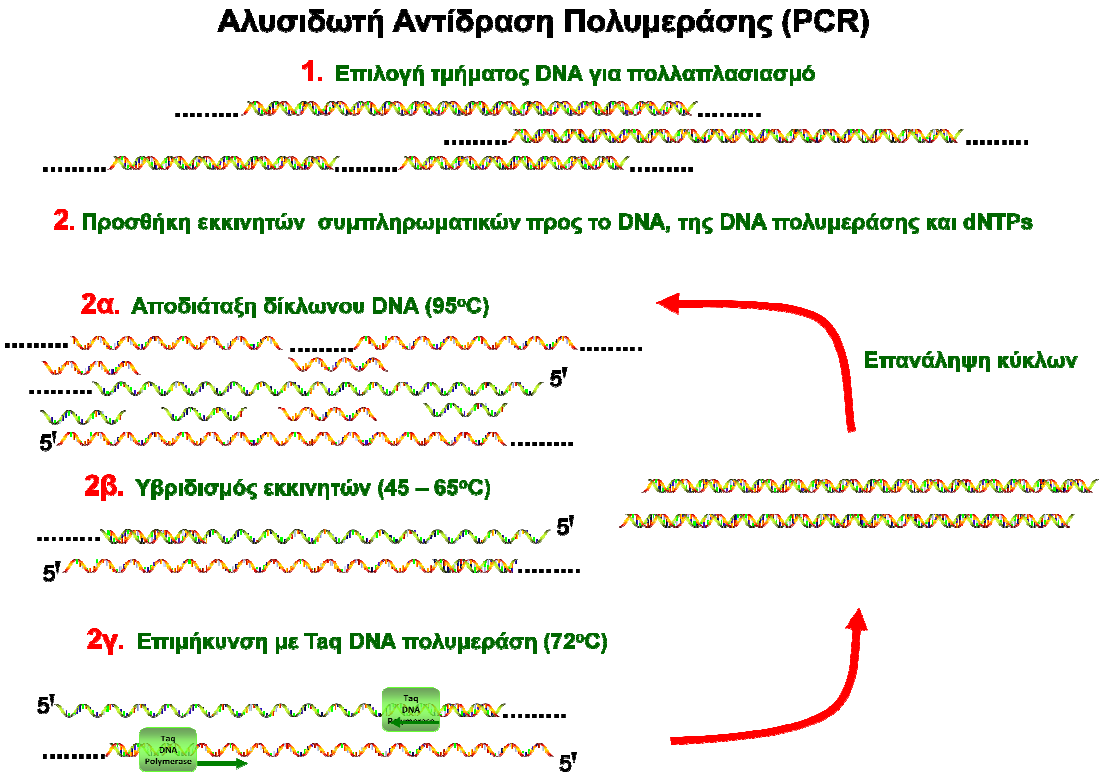
1. **Αποδιάταξη (93-96°C):** Κατά το πρώτο στάδιο, αποδιατάσσεται το δίκλωνο DNA προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ο κάθε κλώνος ως εκμαγείο για τα επόμενα δύο στάδια της μεθόδου.
2. **Πρόσδεση των εκκινητών στο εκμαγείο (45-65°C):** Μετά την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, η θερμοκρασία της αντίδρασης κατεβαίνει σε επίπεδο που επιτρέπει στους εκκινητές να προσδεθούν στους συμπληρωματικούς μονούς κλώνους DNA. Το μήκος, καθώς και η αλληλουχία των εκκινητών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχεδιασμό των παραμέτρων ενός επιτυχούς πολλαπλασιασμού. Η θερμοκρασία τήξης (Tm) επηρεάζεται τόσο από το μήκος ενός εκκινητή όσο και από την περιεκτικότητά του σε γουανίνη και κυτοσίνη. Ο τύπος υπολογισμού της Tm είναι ο ακόλουθος:

   $$Tm = 4(G + C) + 2(A + T)^{o}C$$

   Κατά συνέπεια, η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature, Ta) επηρεάζεται από το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών και θα πρέπει να είναι κατά $5^{o}C$ χαμηλότερη από την κατώτερη Tm των εκκινητών.
3. **Επιμήκυνση (68-72°C):** Στο στάδιο αυτό, η θερμοκρασία της αντίδρασης ανεβαίνει για να επιτρέψει στη DNA πολυμεράση να προσθέσει νουκλεοτίδια στο 3’ άκρο του εκκινητή που έχει υβριδοποιηθεί με το μονόκλωνο εκμαγείο DNA.

Σημαντικές παράμετροι που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν κατά τον σχεδιασμό της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι οι ακόλουθες: 1. Μικροί

χρόνοι αποδιάταξης, έτσι ώστε να αποφεύγεται η απενεργοποίηση του ενζύμου ή/και η φθορά του εκμαγείου. 2. Επαρκής χρόνος επιμήκυνσης για να επιτυγχάνεται η πλήρης σύνθεση της αλληλουχίας-στόχου. 3. Θερμοκρασίες υβριδισμού πλησίον των θερμοκρασιών τήξης για την αύξηση της ειδικότητας του προϊόντος της αντίδρασης.



Εικόνα 2.2: Βήματα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης.

Οι αντιδράσεις ετοιμάστηκαν ως ακολούθως:

Αντίδραση Ελέγχου (Control Reaction)		**Αντίδραση Δείγματος (Sample Reaction)**	
Reaction Buffer (10X)	5μL	Reaction Buffer (10X)	5μL
pWhitescript (5ng/μL)	2μL	pRShGRαWT (10ng/μL)	5μL
Control primer 1 (100ng/ μL)	1.25μL	Mutant forward primer (125ng)	XμL
Control primer 2 (100ng/ μL)	1.25μL	Mutant reverse primer (125ng)	XμL
dNTP mix	1μL	dNTP mix	1μL
ddH_2O	εως 50μL	ddH_2O	εως 50μL

Η έναρξη του προγράμματος έγινε στους 96°C για 5min ακολουθούμενη από 16 κύκλους αποδιάταξης του δίκλωνου DNA στους 96°C για 1min, πρόσδεσης των εκκινητών στους δύο κλώνους στους 50°C για 1min και επέκτασης των νεοσχηματισθέντων κλώνων στους 68°C για 16min. Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης παρέμενε στους 4°C μέχρι το επόμενο βήμα.

Πέψη μητρικού κλώνου με ενδονουκλεάση *Dpn* I: Ακολούθησε η πέψη του μητρικού κλώνου με την προσθήκη περιοριστικού ενζύμου *Dpn* I για 1 ώρα στους 37°C. Το περιοριστικό αυτό ένζυμο έχει ως στόχο την αλληλουχία 5'-Gm^6ATC-3', η οποία εντοπίζεται αποκλειστικά στο μητρικό κλώνο, με αποτέλεσμα την εκλεκτική καταστροφή του.

Μετασχηματισμός των χημειοδεκτικών XL-1 βακτηρίων: Τα χημειοδεκτικά βακτήρια XL-1 (στελέχη *E. Coli*) (50μL) μετασχηματίστηκαν με τους μεταλλαγμένους κλώνους (2μL) καθώς και με το πλασμίδιο pUC18 (ως μάρτυρας επιτυχίας του μετασχηματισμού των βακτηρίων) με τη μέθοδο της θερμικής ώσης (**heat pulse**): 30min παραμονή στον πάγο, 45sec στους 42°C και ακολούθως 2min στον πάγο. Μετά την προσθήκη ειδικού θρεπτικού (S.O.C.), τα δείγματα ανακινήθηκαν στις 220rpm για 2 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε επάλειψη τρυβλίων, που φέρουν θρεπτικό υλικό (LB Agar), αμπικιλλίνη, X-gal και IPTG, με τα μετασχηματισθέντα βακτήρια και τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστή για 18 ώρες στους 37°C για ανάπτυξη αποικιών. Την επόμενη μέρα παρατηρήθηκε το χρώμα των σχηματισθέντων αποικιών στα τρυβλία (μπλε αποικίες στο control ως ένδειξη επιτυχίας της μεταλλαξιγένεσης και λευκές αποικίες στα δείγματα). Απομονώθηκαν τυχαία 5 αποικίες από κάθε τρυβλίο για ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών στις 220rpm για 18 ώρες στους 37°C.

2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή συγκέντρωση (Miniprep) με βάση το πρωτόκολο από την εταιρεία Promega (Wizard^R Plus SV Minipreps DNA Purification System, Catal. ≠1470). Ακολουθήθηκε το πρωτόκολο με τη χρήση κενού (Vacuum Protocol).

2. Υλικά και Μέθοδοι

Βασικές αρχές μεθόδου

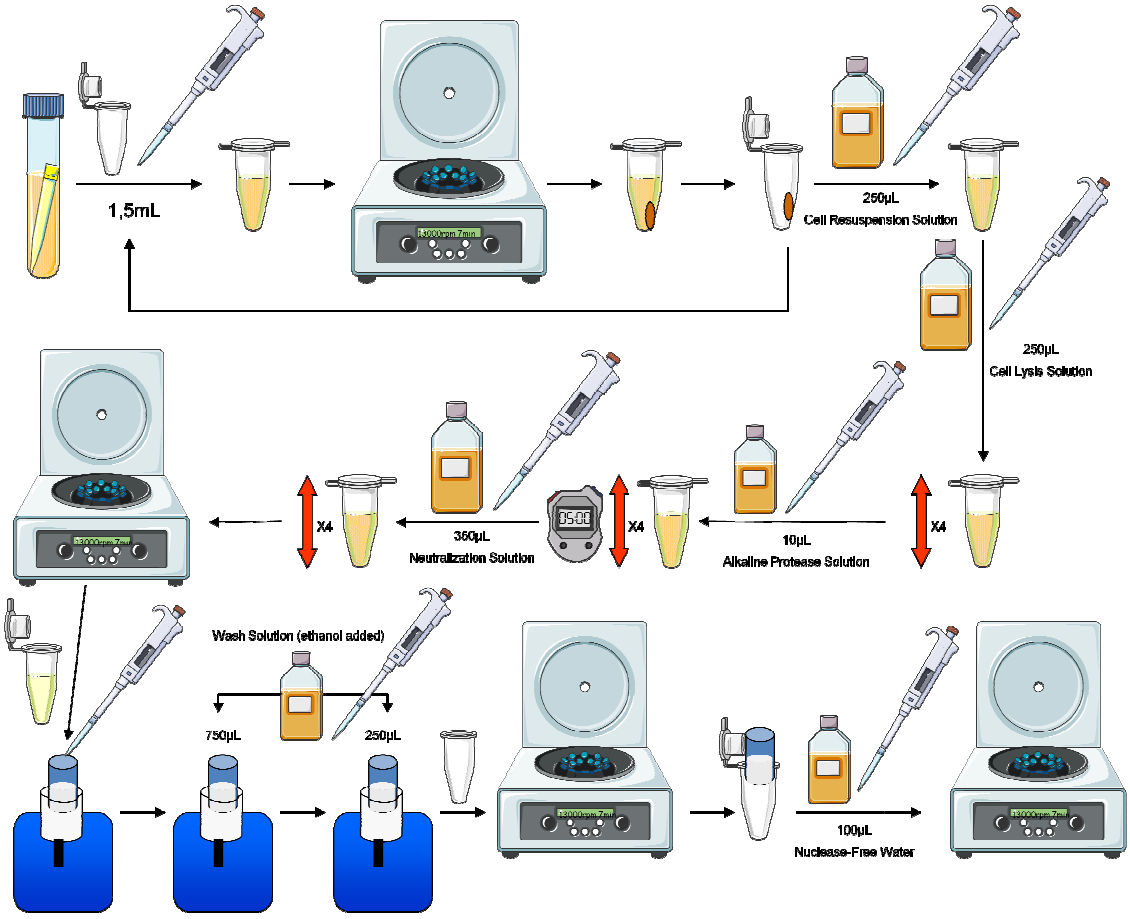
Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή συγκέντρωση (miniprep) από βακτήρια στηρίζεται στην αρχή της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων. Η έκθεση των βακτηρίων σε διάλυμα υψηλού pH έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των μεμβρανών των βακτηρίων και την επακόλουθη απελευθέρωση του πλασμιδιακού DNA, του βακτηριακού DNA, καθώς και άλλων δομικών στοιχείων του βακτηρίου. Το πλασμιδιακό DNA δεσμεύεται επιλεκτικά σε ειδικές κολόνες, διαχωρίζεται από το βακτηριακό DNA και κατακρημνίζεται με διάλυμα που περιέχει αιθανόλη.

Πρωτόκολο μεθόδου

Αρχικά φυγοκεντρήθηκε 1,5mL από το περιεχόμενο της κάθε υγρής καλλιέργειας σε 13000rpm για 7min. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν εκ νέου 1,5mL από το περιεχόμενο της κάθε υγρής καλλιέργειας και επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση. Ακολούθησε προσθήκη 250μL διαλύματος για ανάδευση του ιζήματος (Cell Resuspension Solution), προσθήκη 250μL διαλύματος για λύση των βακτηρίων (Cell Lysis Solution), προσθήκη 10μL διαλύματος αλκαλικής φωσφατάσης και παραμονή των δειγμάτων για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 350μL διαλύματος για ουδετεροποίηση του pH (Neutralization Solution) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000rpm για 10min για να κατακαθίσουν τα μεμβρανώδη στοιχεία. Το υπερκείμενο του κάθε δείγματος μεταφέρθηκε σε ειδικές κολόνες, οι οποίες προσαρμόστηκαν σε υποδοχές στη συσκευή κενού (vacuum). Με τη χρήση κενού (vacuum), το πλασμιδιακό DNA κατακρατήθηκε στην κολόνα. Προστέθηκαν 750μL διαλύματος πλύσης (Wash Solution) στις κολόνες, εφαρμόστηκε κενό και επαναπροστέθηκαν 250μL του ιδίου διαλύματος με εφαρμογή κενού για 10min. Ακολούθησε έκλουση του πλασμιδιακού DNA σε αποστειρωμένα σωληνάρια ependorf με την προσθήκη 100μL νερού χωρίς νουκλεάσες (Nuclease-Free Water).

Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20°C μέχρι τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του DNA.

Οι υγρές καλλιέργειες των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πρωτόκολλο αυτό τοποθετήθηκαν στους 4°C μέχρι την αλληλούχηση των δειγμάτων DNA. Το χρονικό διάστημα αυτό δεν υπερέβαινε τις 2 εβδομάδες.



Εικόνα 2.3: Πρωτόκολο εταιρίας PROMEGA για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή συγκέντρωση (miniprep).

3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης πλασμιδιακού DNA

Βασικές αρχές μεθόδου

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του πλασμιδιακού DNA έγινε με τη φασματομετρική μέθοδο. Η απορρόφηση DNA λαμβάνει χώρα στα 260nm, ενώ η απορρόφηση στα 280nm αποδίδεται στην παρουσία πρωτεΐνης στο υπό μελέτη δείγμα. Η

ποιότητα του DNA είναι αποδεκτή όταν ο λόγος OD_{260}/OD_{280} είναι μεγαλύτερος ή ίσος με 1.8.

Πρωτόκολο μεθόδου

Τα δείγματα πλασμιδιακού DNA αραιώθηκαν σε αναλογία 1:100 με τελικό όγκο 500μL και τοποθετήθηκαν κατά σειρά σε κυβέτα χαλαζία προς μέτρηση. Η συγκέντρωση του DNA στα υπό μελέτη δείγματα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

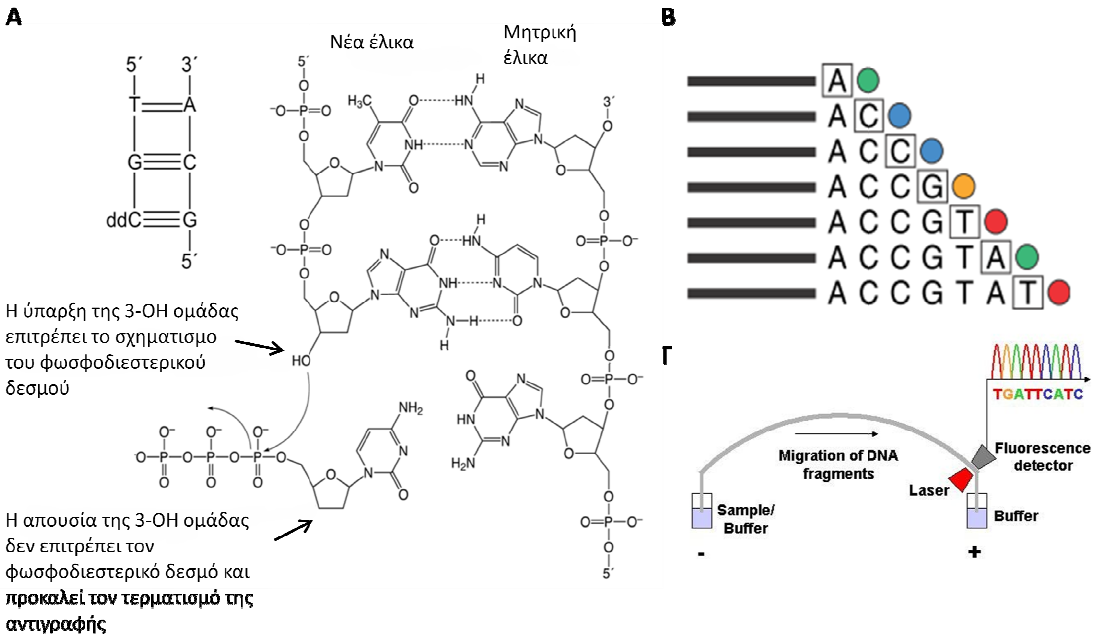
$$\mathbf{c = OD_{260} \text{ x Αραίωση } (100) \text{ x } 50 \text{ μg/mL}}$$

4. Αλληλούχηση επιλεγμένων δειγμάτων πλασμιδιακού DNA

Βασικές αρχές μεθόδου

Η αλληλούχηση των επιλεγμένων δειγμάτων πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Sanger με τη χρήση του Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit. Η μέθοδος Sanger στηρίζεται στην ευχέρεια της DNA πολυμεράσης να χρησιμοποιεί τόσο νουκλεοτίδια (dNTPs) όσο και φθορίζοντα δι-δεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) με την ίδια ειδικότητα κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού του μητρικού κλώνου DNA. Τα δι-δεοξυνουκλεοτίδια δεν διαθέτουν την 3’ υδροξυλική ομάδα με αποτέλεσμα να αποτρέπεται ο σχηματισμός φωσφοδιεστερικού δεσμού και να τερματίζεται η διαδικασία της αντιγραφής. Τα προκύπτοντα θραύσματα DNA διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές με ειδικό πολυμερές ανάλογα με το μοριακό βάρος. Ακολούθως, τα προϊόντα της ηλεκτροφόρησης διέρχονται από σημείο όπου ακτινοβολούνται με λέιζερ, με αποτέλεσμα το εκάστοτε φθορίζον σεσημασμένο νουκλεοτίδιο που συναντά την ακτίνα λέιζερ, να εκπέμπει φως σε διαφορετικό μήκος κύματος ανάλογα με το είδος του νουκλεοτιδίου. Η εκπομπή φωτός συλλέγεται από ειδικό επεξεργαστή, ο οποίος αναγνωρίζει την Αδενίνη με πράσινο χρώμα, την Θυμίνη με κόκκινο χρώμα, την Γουανίνη με μαύρο χρώμα και την Κυτοσίνη με μπλε χρώμα. Μετά την επεξεργασία των δεδομένων, παράγεται ένα χρωματογράφημα που περιέχει σειρά επαρμάτων διαφορετικού χρώματος, ανάλογα με την θέση του κάθε νουκλεοτιδίου.

Η αλληλούχηση στοιχίζεται με ειδικό πρόγραμμα βιοπληροφορικής και ελέγχεται για την ορθότητα της ανάγνωσης των νουκλεοτιδίων.



Εικόνα 2.4: Αλληλούχηση με τη μέθοδο Sanger.

Πρωτόκολο μεθόδου

Το πρώτο βήμα της αλληλούχησης είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις για το σύνολο των μεταλλαγμένων κλώνων είχε την αλληλουχία: 5’-TTCCTTCCCTCTTGACAATGGC-3’.

Αντίδραση Δείγματος (Sample Reaction)

Sequencing Reaction Buffer (5X)	2μL
Δείγμα	1μL
Εκκινητής (3.2pmol/μL)	1μL
Big Dye Terminator	0.5μL
ddH_2O	εως 10μL

Η έναρξη του προγράμματος έγινε στους 96°C για 1min, ακολουθούμενη από 25 κύκλους αποδιάταξης του δίκλωνου DNA στους 96°C για 10sec, πρόσδεσης των εκκινητών στους δύο κλώνους στους 50°C για 5sec και επέκτασης των νεοσχηματισθέντων κλώνων στους 60°C για 4min. Το προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης παρέμεινε στους 4°C μέχρι το επόμενο βήμα.

Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε το πρωτόκολο της κατακρήμνισης του DNA με αιθανόλη/ακετοξικό νάτριο (Ethanol/NaOAc precipitation).

NaOAc/Eth

NaOAc 3M pH 4.4 75μL

Αιθανόλη 100% 1562.5μL

ddH_2O 362.5μL

Προστέθηκαν 40μL σε κάθε αντίδραση, τα δείγματα ανακινήθηκαν για 15sec και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 30min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 3000rpm στους 4°C για 30min, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 70μL αιθανόλης 70%. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 2000rpm στους 4°C για 3min και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 10min. Στο τέλος προστέθηκαν 10μL φορμαμίδης σε κάθε αντίδραση και τα δείγματα φυλάχθηκαν στους 4°C. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε η αλληλούχηση.

5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη συγκέντρωση (Maxiprep και Megaprep) με βάση το πρωτόκολο από την εταιρεία Qiagen (QIAGEN^R Plasmid Purification Handbook, Catal. ≠12183 & 12165).

Βασικές αρχές μεθόδου

Η απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη συγκέντρωση (maxiprep και megaprep) από βακτήρια στηρίζεται στην αρχή της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων, όπως αυτή αναπτύχθηκε στη μέθοδο miniprep.

Πρωτόκολο μεθόδου

Αρχικά τοποθετήθηκε υγρή καλλιέργεια (500mL LB Broth και 1mL αμπικιλλίνη) για το επιλεγμένο δείγμα του μεταλλαγμένου πλασμιδιακού DNA που προέκυψε μετά την ανάγνωση της αλληλούχησης. Την επόμενη μέρα φυγοκεντρήθηκε το περιεχομένο της υγρής καλλιέργειας στις 4000rpm στους 4°C για 30min. Ακολούθως, προστέθηκαν 50mL διαλύματος για ανάδευση του ιζήματος (Cell Resuspension Solution), 50mL διαλύματος για λύση των βακτηρίων (Cell Lysis Solution) και 50mL διαλύματος για ουδετεροποίηση του pH (Neutralization Solution). Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000rpm στους 4°C για 30min για να κατακαθίσουν τα μεμβρανώδη στοιχεία και μετά προστέθηκαν 35mL διαλύματος για την ετοιμασία κολόνας (Equilibration Solution) για να κατακρατηθεί το πλασμιδιακό DNA. Μετά την κατακράτηση του πλασμιδιακού DNA προστέθηκαν 200mL διαλύματος πλύσης (Wash Solution) και ακολούθησε η έκλουση του πλασμιδιακού DNA. Στη συνέχεια, το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίστηκε με 25mL διαλύματος ισοπροπανόλης, φυγοκέντρηση στις 13000rpm στους 4°C για 30min, απομάκρυνση του υπερκειμένου με διατήρηση του ιζήματος και προσθήκη 20mL διαλύματος αιθανόλης 70% ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση στις 13000rpm στους 4°C για 30min. Το ίζημα διαλύθηκε σε αποστειρωμένο νερό. Ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας και η φύλαξη των δειγμάτων έγινε στους -20°C.

6. Πάγωμα υγρών καλλιεργειών βακτηρίων με μεταλλαγμένο πλασμιδιακό DNA

Προστέθηκε θρεπτικό υλικό (LB Broth) εως 5mL και 5μL αμπικιλλίνης στο δείγμα της υγρής καλλιέργειας βακτηρίων με μεταλλαγμένο πλασμιδιακό DNA για ανακαλλιέργεια με ολονύκτια περιστροφή του δείγματος στις 250rpm στους 37°C. Την επόμενη μέρα προστέθηκαν 1,2mL γλυκερόλης 100% και ακολούθησε ανάδευση και διαμοιρασμός σε κρυοσωληνάρια. Η φύλαξη των δειγμάτων έγινε στους -80°C.

7. Κυτταρικές Καλλιέργειες

Βασικές αρχές κυτταρικών καλλιεργειών

- **Ανακαλλιέργεια κυτταρικών σειρών**

  Οι προσκολλητικές κυτταρικές σειρές CV-1, COS-7 και HeLa αναπτύχθηκαν σε καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) εμπλουτισμένο με ορό εμβρύου βοός (10% FBS) και αντιβιοτικά (πενικιλλίνη και στρεπτομυκίνη). Τα κύτταρα επωάσθηκαν σε συνθήκες υγρασίας 95%, με 5% CO_2, σε θερμοκρασία 37°C και η αλλαγή θρεπτικού υλικού πραγματοποιείτο κάθε 2-3 μέρες. Η ανακαλλιέργεια των τριών κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της τρυψινοποίησης. Η τρυψίνη έχει την ιδιότητα να διασπά ενζυματικά τους δισουλφιδικούς δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ των προσκολλητικών κυττάρων και της επιφάνειας της φλάσκας/του καλλιεργητικού τρυβλίου, με αποτέλεσμα την ανασήκωση των κυττάρων και τη δυνατότητα μεταφοράς τους σε νέα φλάσκα/καλλιεργητικό τρυβλίο.

  Πρωτόκολο μεθόδου

  Υπό στείρες συνθήκες, απομακρύνθηκε το ήδη υπάρχον θρεπτικό υλικό από τις φλάσκες και ξεπλύθηκε η επιφάνεια των κυττάρων με 5mL PBS. Ακολούθως, προστέθηκαν 2mL τρυψίνης και οι φλάσκες επανατοποθετήθηκαν στον επωαστή για 5min στους 37°C. Η επιτυχής ανασήκωση των κυττάρων επιβεβαιώθηκε με μικροσκόπηση. Η απενεργοποίηση της τρυψίνης έγινε με προσθήκη 8mL θρεπτικού υλικού (η παρουσία ορού στο θρεπτικό υλικό ευθύνεται για την απενεργοποίηση του ενζύμου). Με σκοπό την απομάκρυνση της τρυψίνης, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 1200rpm για 8min, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύθηκε σε 10mL θρεπτικού υλικού. Ακολούθησε διαμοιρασμός των κυττάρων, ανάλογα με την κυτταρική σειρά, σε νέες φλάσκες. Το πρωτόκολο της τρυψινοποίησης εφαρμοζόταν κάθε 3-4 μέρες.

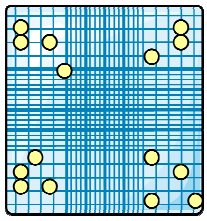
- **Πάγωμα κυτταρικών σειρών**

Το πάγωμα των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση καλλιεργητικού θρεπτικού υλικού Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) εμπλουτισμένου με ορό εμβρύου βοός (20% FBS), αντιβιοτικά (πενικιλλίνη και στρεπτομυκίνη) και διμεθυλσουλφοξείδιο (10% DMSO).

Πρωτόκολο μεθόδου

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολο της τρυψινοποίησης, όπως αναπτύχθηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Μετά την απενεργοποίηση της τρυψίνης, ο αριθμός των κυττάρων μετρήθηκε με τη χρήση της πλάκας Neubauer. Μετρήθηκαν τα κύτταρα στα 4 τετράγωνα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

Μέσος όρος κυττάρων x 10^4 x Όγκο θρεπτικού (σε mL)



Εικόνα 2.5: Μέτρηση κυττάρων με την πλάκα Neubauer. Τα κύτταρα (κίτρινοι μικροί κύκλοι) μετρώνται στα 4 τετράγωνα και ακολούθως υπολογίζεται ο μέσος όρος.

Ακολούθως, διαμοιράστηκαν $2x10^6$ κύτταρα σε κρυοσωληνάρια κατάψυξης κυτταρικών σειρών. Τα κρυοσωληνάρια παρέμειναν στον πάγο για 30min, στους -20°C για 2 ώρες, στους -80°C ολονύχτια και την επόμενη μέρα μεταφέρθηκαν στο θάλαμο του υγρού αζώτου (-145°C).

- **Ξεπάγωμα κυτταρικών σειρών**

Κατά το ξεπάγωμα των κυτταρικών σειρών, πρέπει να απομακρύνεται επιμελώς το διμεθυλσουλφοξείδιο (DMSO).

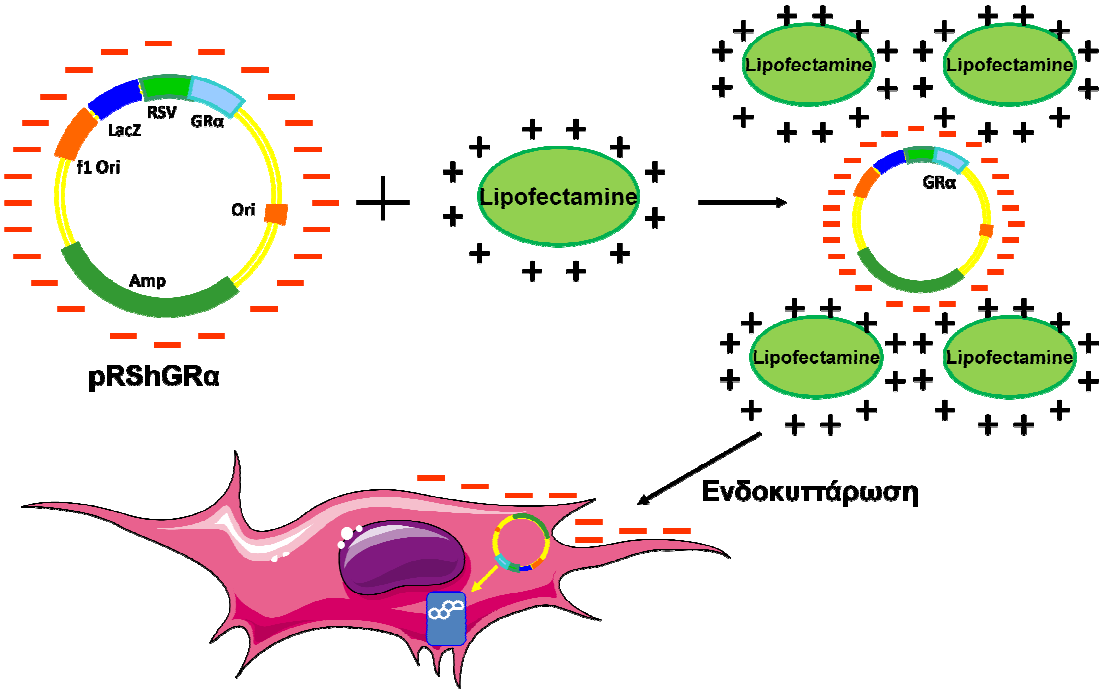
Πρωτόκολο μεθόδου

Τα κρυοσωληνάρια των κυτταρικών σειρών μεταφέρθηκαν σε πάγο από το θάλαμο του υγρού αζώτου. Μετά το ξεπάγωμα, το περιεχόμενο των

κρυοσωληναρίων μεταφέρθηκε σε σωληνάρια στα οποία προστέθηκαν 3mL θρεπτικού υλικού. Τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν στις 1200rpm για 5min, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύθηκε σε 2mL θρεπτικού υλικού και μεταφέρθηκε σε φλάσκες, στις οποίες προστέθηκαν 14mL θρεπτικού υλικού. Ακολούθησε μικροσκόπηση των κυττάρων τόσο πριν την τοποθέτησή τους στον επωαστή, όσο και την επόμενη μέρα.

- **Παροδική διαμόλυνση κυτταρικών σειρών**

  Η παροδική διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών έγινε με τη μέθοδο των κατιονικών σωματίων (λιποφεκτίνη, λιποφεκταμίνη). Τα κατιονικά σωμάτια, λόγω του θετικού φορτίου, έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν σύμπλεγμα με το αρνητικά φορτισμένο DNA, ένεκα της παρουσίας των φωσφορικών ομάδων των βάσεων. Το σύμπλεγμα, επωφελούμενο του αρνητικού φορτίου της εξωτερικής επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης, ενδοκυτταρώνεται και απελευθερώνει το πλασμίδιο έκφρασης.



Εικόνα 2.6: Παροδική διαμόλυνση των κυττάρων με τη μέθοδο των κατιονικών σωματίων. Αρχικά, σχηματίζεται σύμπλεγμα μεταξύ της λιποφεκταμίνης (λιπιδιακό κατιόν σωμάτιο) και του

αρνητικά φορτισμένου DNA. Στη συνέχεια, το εξωτερικά περιβαλλόμενο με θετικά φορτία σύμπλεγμα ενδοκυτταρώνεται επωφελούμενο του αρνητικού φορτίου της εξωτερικής πλευράς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

Πρωτόκολο μεθόδου

Τα κύτταρα CV-1 ή COS-7 καλλιεργήθηκαν σε συγκεκριμένο αριθμό, ανάλογα με τη μέθοδο, σε καλλιεργητικά τρυβλία ή φλάσκες που περιείχαν καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό. Είκοσι-τέσσερεις ώρες αργότερα, η υπολογισθείσα ποσότητα DNA διαλύθηκε σε 750μL θρεπτικού χωρίς ορό και χωρίς αντιβιοτικά (OPTI-MEM). Η απαραίτητη ποσότητα λιποφεκτίνης/λιποφεκταμίνης προστέθηκε σε 750μl OPTI-MEM και επωάσθηκε υπό στείρες συνθήκες για 30min (λιποφεκτίνη) ή για 5min (λιποφεκταμίνη). Η διαλυθείσα λιποφεκτίνη ή λιποφεκταμίνη προστέθηκε στο DNA και το σύμπλεγμα επωάστηκε για 20min υπό στείρες συνθήκες. Στο διάστημα αυτό, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό των κυττάρων και ακολούθησε ξέπλυμα με PBS. Μετά την πάροδο των 20min, στα κύτταρα προστέθηκε το υλικό διαμόλυνσης (σύμπλεγμα DNA-λιποφεκτίνης/λιποφεκταμίνης διαλυμένο σε OPTI-MEM) για 18 ώρες (λιποφεκτίνη) ή για 5 ώρες (λιποφεκταμίνη). Ακολούθησε αντικατάσταση του υλικού διαμόλυνσης με καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό.

8. Δοκιμασίες ενεργοποίησης (Transactivation Assays)

Πρωτόκολο μεθόδου

Κύτταρα CV-1 καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικά τρυβλία 6 θέσεων (6-well plates) σε συγκέντρωση $1.5x10^5$ κύτταρα/well. Είκοσι-τέσσερεις ώρες αργότερα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pRShGRαWT, pRShGRαY663A, pRShGRαC665A, pRShGRαLL670/671AA (0.05 μg/well), με pMMTV-luc (0.5 μg/well) και pGL4.73[hRluc/SV40] (0.1 μg/well) με τη μέθοδο της λιποφεκταμίνης (10μL/well).

Σαράντα-οκτώ ώρες μετά την διαμόλυνση, τα κύτταρα επωάσθηκαν με δεξαμεθαζόνη σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 10^{-12} M έως 10^{-5} M.

Εβδομήντα-δύο ώρες μετά την διαμόλυνση, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS (500μL/well) και υπέστηκαν λύση χρησιμοποιώντας ειδικό διάλυμα λύσης κυττάρων (Passive Lysis Buffer, 500/well). Ακολούθησε φυγοκέντρηση των εκχυλισμάτων στις 13000rpm για 15min στους 4°C. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν 20μL από το ολικό κυτταρικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα σε σωληνάρια λουμινομέτρου. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης και της *Renilla* μετρήθηκαν με τα αντιδραστήρια LARII (40μL/αντίδραση) και Stop&Glo (επιπλέον 40μL/αντίδραση), αντίστοιχα, σε λουμινόμετρο. Ο λόγος της απόλυτης τιμής ενεργότητας της λουσιφεράσης προς την απόλυτη τιμή της ενεργότητας της *Renilla* υπολογίστηκε ως σχετική ενεργότητα της λουσιφεράσης.

9. Στύπωμα κατά Western (Western Blotting)

Βασικές αρχές μεθόδου

Το στύπωμα κατά Western περιλαμβάνει τον προσδιορισμό συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford, την ηλεκτροφόρηση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμίδης (SDS-PolyAcrylamide Gel, SDS-PAGE κατά Laemmli), την ανοσοαποτύπωση, την ανοσοχημική ανίχνευση των πρωτεϊνών και την ανίχνευση μέσω χημειοφωταύγειας.

- **Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford**

  Σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford, η σύνδεση της χρωστικής Coomassie brilliant blue G-250 (Bradford reagent) με τις πρωτεΐνες έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μέγιστου της απορρόφησης του χρώματος από τα 465nm (χωρίς πρωτεΐνη) στα 595nm (με πρωτεΐνη). Πρόκειται για μια αντίδραση που εξελίσσεται γρήγορα, ολοκληρώνεται μετά από 5min και λαμβάνει χώρα σε όξινο περιβάλλον.

- **Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE κατά Laemmli).**

  Κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες μετακινούνται σε ηλεκτρικό πεδίο και διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Αρχικά, το πρωτεϊνικό εκχύλισμα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS), ενός ανιοντικού απορρυπαντικού που καταστρέφει όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας πρωτεΐνης, προσθέτοντας στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα τη μετακίνηση από την άνοδο στην κάθοδο. Η β-μερκαπτοαιθανόλη, που εμπεριέχεται στο sample buffer/Laemmli buffer/loading buffer, προκαλεί αναγωγή στους δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται σε πολυακρυλαμίδιο με τη μορφή κατακόρυφης λεπτής στοιβάδας. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα μέσω του πηκτώματος, ενώ οι μεγαλύτερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες μένουν στην κορυφή. Ως εκ τούτου, η μετακίνηση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων είναι απολύτως ανάλογη με τον λογάριθμο του μοριακού τους βάρους.

- **Ανοσοαποτύπωση**

  Κατά την ανοσοαποτύπωση, συντελείται η ηλεκτρική μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα SDS/πολυακρυλαμιδίου σε μια μεμβράνη πολυβινυλυδενοδιφθωριδίου (PVDF) ή νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά αυτή καθιστά πιο εύκολη την αντίδραση των πρωτεϊνικών-αντιγονικών επιτόπων με το αντίσωμα που προστίθεται στο επόμενο στάδιο.

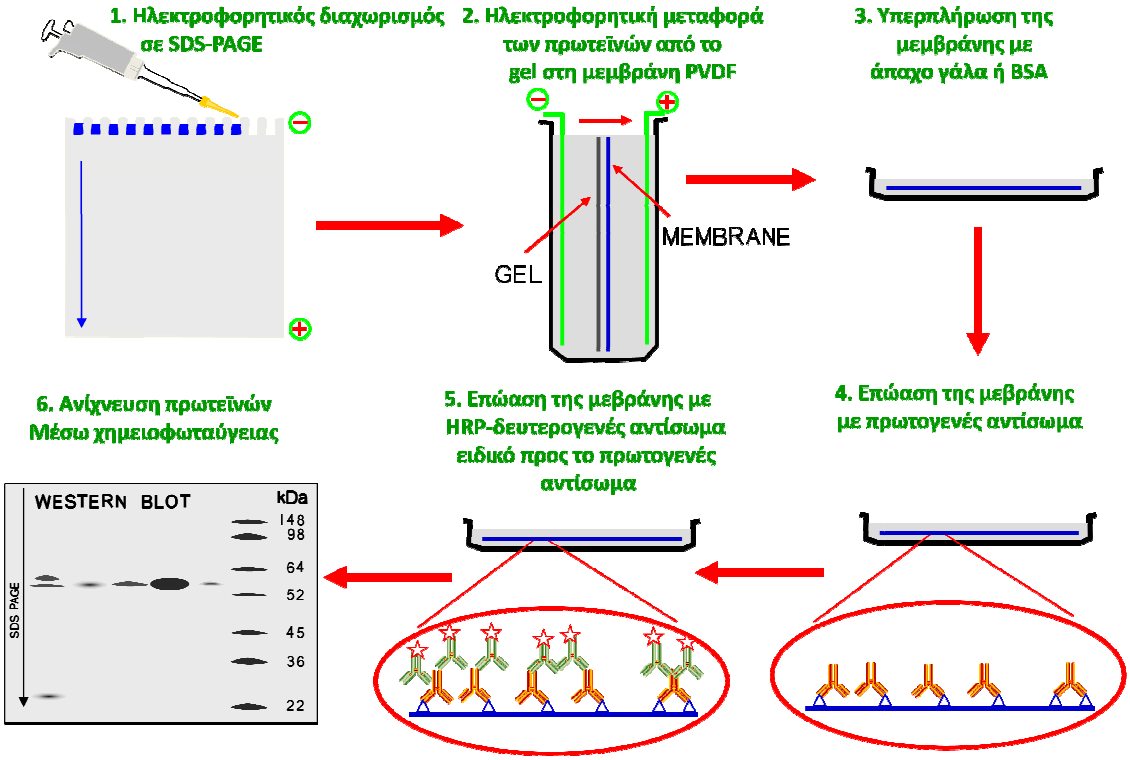
- **Ανοσοχημική ανίχνευση πρωτεϊνών**

  Η ανοσοχημική ανίχνευση πρωτεϊνών στηρίζεται στη χρήση αντισωμάτων. Πριν από την επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, η μεμβράνη εκτίθεται σε ένα παρεμποδιστή (π.χ. άπαχο γάλα). Η υπερπλήρωση αυτή συντελεί στον κορεσμό των πρωτεϊνικών θέσεων σύνδεσης της μεμβράνης που βρίσκονται σε περίσσεια και στην παρεμπόδιση μιας μη-ειδικής σύνδεσης των αντιδραστηρίων ανίχνευσης. Ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα και η δημιουργία συμπλόκου με τον αντιγονικό επίτοπο

που αναγνωρίζει με ειδικότητα. Στη συνέχεια, γίνεται έκπλυση του μη δεσμευμένου πρωτογενούς αντισώματος και η μεμβράνη επωάζεται με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό προς άλλες σταθερές περιοχές του πρωτογενούς αντισώματος και το οποίο ανιχνεύεται λόγω της σύζευξής του με υπεροξειδάση. Η ποσότητα του δευτερογενούς αντισώματος που δεσμεύεται στην επιφάνεια της μεμβράνης είναι ανάλογη με την ποσότητα του αντιγόνου στο υπό εξέταση δείγμα.

- **Ανίχνευση μέσω χημειοφωταύγειας**

  Χημειοφωταύγεια είναι η εκπομπή φωτός όταν ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας μεταπίπτουν σε στάθμη χαμηλής ενέργειας. Το σύστημα χημειοφωταύγειας είναι μη-ραδιενεργό σύστημα εκπομπής φωτός, που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πρωτεϊνών που έχουν δεσμευθεί στην επιφάνεια της μεμβράνης. Ένα από τα περισσότερο κατανοητά συστήματα χημειοφωταύγειας είναι η HRP/υπεροξείδιο του υδρογόνου-καταλυόμενη οξείδωση της λουμινόλης σε αλκαλικές συνθήκες. Τα συζευγμένα με υπεροξειδάση δευτερογενή αντισώματα καταλύουν την οξείδωση της λουμινόλης και ελευθερώνουν χημειοφωταύγεια. Αναλυτικότερα, η λουμινόλη, οξειδούμενη, βρίσκεται σε μια κατάσταση διέγερσης, η οποία φθίνει στη θεμελιώδη κατάσταση μέσω ενός μονοπατιού εκπομπής φωτός. Η μέγιστη εκπομπή φωτός παρατηρείται σε ένα μήκος κύματος 428nm, το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί μέσω μιας σύντομης έκθεσης σε ένα φιλμ αυτοακτινογραφίας ευαίσθητο στο μπλε-φως.



Εικόνα 2.7: Βήματα πρωτοκόλλου στυπώματος κατά Western.

Πρωτόκολο μεθόδου

Κύτταρα CV-1 και COS-7 καλλιεργήθηκαν σε 75cm^2-φλάσκες σε συγκέντρωση 2x10^6 κύτταρα/φλάσκα. Είκοσι-τέσσερεις ώρες αργότερα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pRShGRαWT, pRShGRαY663A, pRShGRαC665A, pRShGRαLL670/671AA (15μg/φλάσκα) σε διάλυμα OPTI-MEM (10mL/φλάσκα) χρησιμοποιώντας λιποφεκταμίνη (30μL/φλάσκα). Έξι ώρες αργότερα, το διάλυμα διαμόλυνσης αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) εμπλουτισμένο με ορό εμβρύου βοός (10% FBS) και αντιβιοτικά (πενικιλλίνη και στρεπτομυκίνη). Σαράντα ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 5mL PBS, αποκολλήθηκαν από τις φλάσκες με ελαφρύ scraping και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια ependorf. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 2000rpm/min για 8 λεπτά, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 600μL διαλύματος λύσης (Complete Lysis-M). Το εκχύλισμα παρέμεινε στον πάγο για 15 λεπτά και ακολούθησε

φυγοκέντρηση στις 13000rpm/min για 15 λεπτά στους 4°C. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέα σωληνάρια ependorf και οι συγκεντρώσεις των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων προσδιορίστηκαν με τη **μέθοδο Bradford**. Η πρότυπη καμπύλη Bradford σχηματίστηκε με το ακόλουθο πρωτόκολο: Σε πλαστικές κυβέτες αναμίχθηκαν 200μL αντιδραστηρίου Bradford με 800μL H_2O και προστέθηκαν 0-5μg BSA (η τιμή 0 αντιστοιχεί στο τυφλό δείγμα). Προσδιορίστηκαν οι απορροφήσεις στα 595nm και οι τιμές τοποθετήθηκαν σε γραφική παράσταση. Από την προκύπτουσα εξίσωση της γραφικής παράστασης, η κάθε τιμή απορρόφησης στα 595nm αντιστοιχούσε σε μία τιμή συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε ως ακολούθως: Για κάθε αντίδραση, 200μL αντιδραστηρίου Bradford αναμίχθηκαν με 800μL H_20 σε πλαστική κυβέτα. Μετά την ανάμιξη, προστέθηκαν 4μL δείγματος και μετρήθηκαν οι τιμές των απορροφήσεων στα 595nm. Με βάση τη γραφική παράσταση της πρότυπης καμπύλης Bradford, προσδιορίστηκε η τιμή της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων για κάθε δείγμα.

Τα ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν με κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκε πήκτωμα με διαβάθμιση συγκέντρωσης (8% πηκτή διαχωρισμού και 4% πηκτή επιστοίβασης) ως ακολούθως:

	Πηκτή διαχωρισμού 8%	**Πηκτή επιστοίβασης 4%**
H_20	4.6mL	2.7mL
30% Ακρυλαμίδη	2.7mL	0.67mL
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5mL	
1.0M Tris-HCl (pH 6.8)		0.5mL
10% SDS	0.1mL	0.04mL
10% APS	0.1mL	0.04mL
TEMED	0.006mL	0.004mL

Τα δείγματα των πρωτεϊνών (15μg) ανακατεύτηκαν με διάλυμα laemmli 5X και μετουσιώθηκαν με βρασμό στους 95°C για 5 λεπτά.

Laemmli 5x (Loading Buffer 5x)

0.5M Tris-HCl (pH 6.8)	500μL
β-μερκαπτοαιθανόλη	200μL
100% Γλυκερόλη	800μL
10% SDS	800μL
1% Βρωμοφαινόλη	400μL
H_20	1300μL

Στη συνέχεια, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο σύστημα της πηκτής και υπέστηκαν κάθετη ηλεκτροφόρηση στα 130V για 1 ώρα σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer).

Running Buffer 5x

Tris	15.1gr
Γλυκίνη	72gr
20% SDS	25mL
H_2O	1L

Ως πρότυπη πρωτεΐνη (marker) χρησιμοποιήθηκε ένα μείγμα από 10 ανασυνδυασμένες με υψηλή καθαρότητα χρωματισμένες πρωτεΐνες με ένα φαινομενικό μοριακό βάρος από 10kDa εως 170kDa. Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου (395mA) για 90 λεπτά στους 4°C σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer). Το διάλυμα μεταφοράς παρασκευάστηκε ως εξής:

Transfer Buffer

Transfer Buffer 5x	200mL
Μεθανόλη	200mL
H_2O	600mL

Transfer Buffer 5x

Tris	15.1gr
Γλυκίνη	72gr
H_2O	1L

Για τη δέσμευση των μη ειδικών επιτόπων, η μεμβράνη επωάσθηκε σε διάλυμα TBS-Tween20 με 5% κατά όγκο σκόνη γάλατος ολονύχτια. Το διάλυμα TBS-Tween20 παρασκευάστηκε ως ακολούθως:

TBS-Tween20	
TBS 10x	50mL
H_2O	450mL
Tween20	0,5mL

TBS 10x (pH 7.6-8)	
Tris	12,2gr
NaCl	87,75gr
H_2O	1L
Σταγόνες HCl	

Την επομένη, η μεμβράνη επωάσθηκε με πρωτογενές αντίσωμα (monoclonal anti-mouse immunoglobulin HRP, Diagenode, Mab-010-050) έναντι του hGRα σε αραίωση 1:200 σε 5%Γάλα-TBS-Tween20 για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 3 πλυσίματα της μεμβράνης με TBS-Tween20 διαρκείας 10 λεπτών/πλύσιμο και στη συνέχεια η μεμβράνη επωάσθηκε με δευτερογενές αντίσωμα (polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin HRP) σε αραίωση 1:5000 σε 5%Γάλα-TBS-Tween20 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη ξεπλύθηκε 3 φορές με TBS-Tween20 διαρκείας 10 λεπτών/πλύσιμο και στη συνέχεια επωάσθηκε με ECL Plus για 2 λεπτά. Ακολούθησε η εμφάνιση στο σκοτεινό θάλαμο με την εναπόθεση Fuji film πάνω στη μεμβράνη. Μετά την εμφάνιση, η μεμβράνη φυλάχθηκε σε διάλυμα TBS στους 4°C.

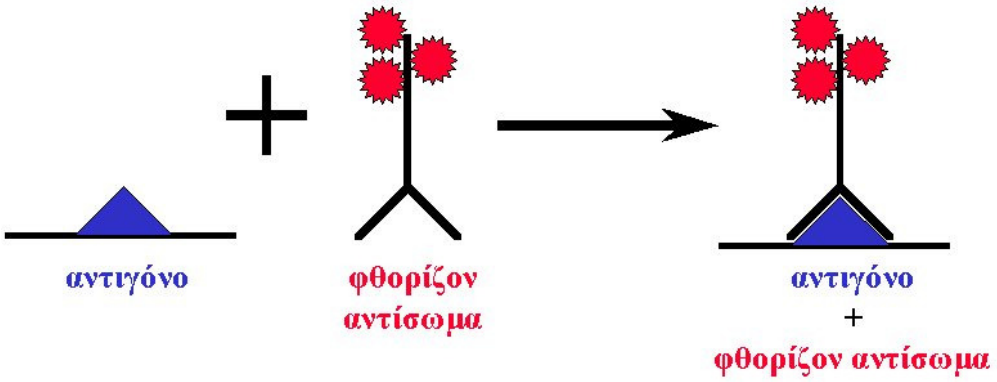
Σε μεταγενέστερο στάδιο, η ίδια μεμβράνη επωάσθηκε με πρωτογενές αντίσωμα (monoclonal anti-mouse immunoglobulin HRP) έναντι της β-ακτίνης σε αραίωση 1:1000 σε 5%Γάλα-TBS-Tween20 για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία ως ανωτέρω με δευτερογενές αντίσωμα (polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin HRP) σε αραίωση 1:5000 σε 5%Γάλα-TBS-Tween20. Τα πλυσίματα και η εμφάνιση της μεμβράνης έγιναν όπως περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο.

10. Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence)

Βασικές αρχές μεθόδου

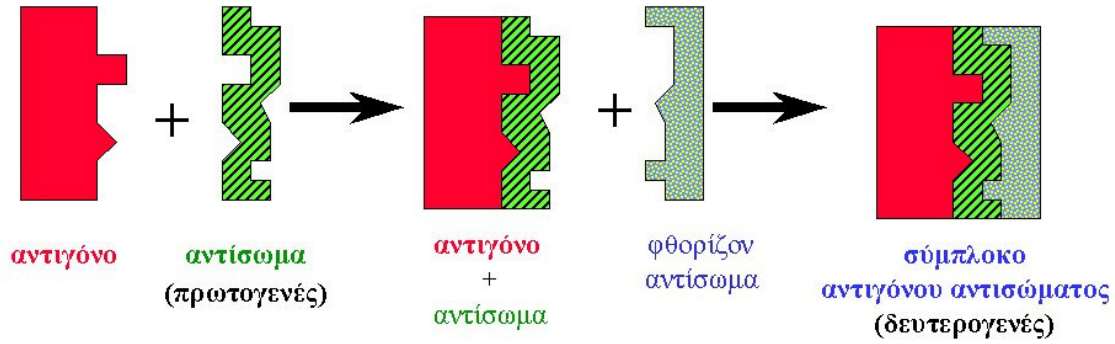
Φθορισμός είναι το φαινόμενο κατά το οποίο ορισμένα σώματα εκπέμπουν φως όταν αυτά διεγείρονται από κάποια ακτινοβολία. Η εκπομπή φωτός σταματάει αμέσως με την παύση της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Μικροσκοπία φθορισμού είναι η μελέτη ουσιών που μπορούν να διεγερθούν και να φθορίσουν. Αν και είναι αρκετές δεκαετίες από τότε που πρωτοχρησιμοποιήθηκαν αυτά τα μικροσκόπια, τα τελευταία χρόνια η χρήση τους έχει δώσει μια νέα ώθηση στις επιστήμες που τα χρησιμοποιούν.

Σύμφωνα με το νόμο του Stokes, το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που παράγεται (φθορισμός) είναι μεγαλύτερο από εκείνο της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Κατά συνέπεια, μια φθορίζουσα ουσία μπορεί να διεγερθεί με μια ακτινοβολία της περιοχής του υπεριώδους που είναι αόρατη και να παραχθεί μια ακτινοβολία που να είναι ορατή. Το φαινόμενο αυτό χρησιμοποιείται στη μικροσκοπία φθορισμού για τη παρατήρηση ουσιών ή κυτταρικών δομών που είτε φθορίζουν από τη φύση τους είτε γίνονται φθορίζουσες με τη χρήση χημικών ουσιών, "χρωστικών", που φθορίζουν, τα οποία λέγονται φθοριοχρώματα. Όταν το φθοριόχρωμα έχει συνδεθεί με κάποιο αντίσωμα που στη συνέχεια συνδέεται με το αντιγόνο και έτσι κάνει το τελευταίο ορατό, τότε η τεχνική αναφέρεται ως ανοσοφθορισμός. Η τεχνική αυτή, αν και όχι τόσο νέα, επινοήθηκε το 1950 από τους Coons και Kaplan και έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις βιοϊατρικές επιστήμες κυρίως για διαγνωστικούς σκοπούς, λόγω της δημιουργίας καθαρών και μονοκλωνικών αντισωμάτων.



Εικόνα 2.8: Σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ αντιγονικού επιτόπου και φθορίζοντος αντισώματος.

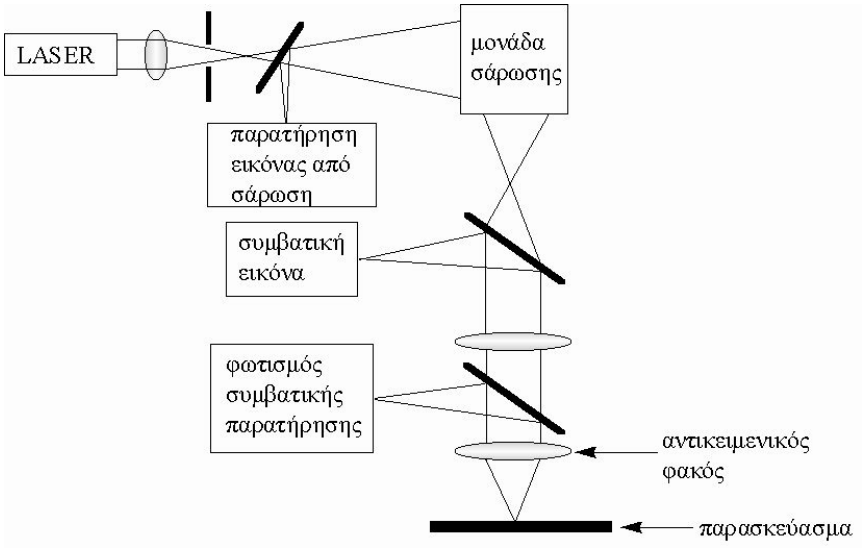
Μια παραλλαγή της μεθόδου του ανοσοφθορισμού είναι και η τεχνική sandwich όπου το φθοριόχρωμα είναι ήδη συνδεδεμένο με ένα δευτερογενές αντίσωμα το οποίο στη συνέχεια προσκολλάται στο σύμπλοκο αντιγόνο / πρωτογενές αντίσωμα.



Εικόνα 2.9: Τεχνική sandwich.

Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με ακτίνες Laser (Confocal Laser Scanning Microscopy).

Η αρχή λειτουργίας της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης πρωτοπεριγράφηκε από τον Minski το 1961. Αντίθετα με το κλασικό τρόπο φωτισμού και παρατήρησης που γίνεται στο κοινό μικροσκόπιο, η συνεστιακή μικροσκοπία στηρίζεται στο γεγονός ότι και ο φωτισμός και η παρατήρηση είναι περιορισμένα σε ένα σημείο του παρασκευάσματος. Αυτό επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση ενός πολύ μικρού διαφράγματος, που μπορεί να είναι μικρότερο από 10 μm, στους οπτικούς άξονες του αντικειμενικού και του συγκεντρωτή φακού. Η εικόνα σχηματίζεται με σάρωση όλων των σημείων του πεδίου του μικροσκοπίου. Αρχικά το παρασκεύασμα παρατηρείται με φως ορατού μήκους κύματος ή με υπεριώδες και στη συνέχεια επιλέγεται η ακτίνα Laser αργού (με πιο χρήσιμα peaks στα 488 και 514 nm που συμπίπτουν με το μήκος κύματος που διεγείρει στο μέγιστο τη φλουορεσκίνη και τη ροδαμίνη) ή ηλίου-νέου (με peak στα 633 nm για άλλα φθοριοχρώματα) ή και με τα δυο συγχρόνως. Οι εικόνες δεν είναι άμεσα ορατές (real time), αλλά η παρατήρηση γίνεται στην οθόνη του μικροϋπολογιστή του μικροσκοπίου και μπορούν να ψηφιοποιηθούν για αποθήκευση ή εκτύπωση.



Εικόνα 2.10: Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με ακτίνες laser.

Το σημαντικότερο πλεονεκτήματα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι ότι σε αυτό ελαττώνονται κατά πολύ τα μηνύματα από τα μη εστιασμένα σημεία του παρασκευάσματος με αποτέλεσμα να ενισχύεται η αντίθεση (contrast) του παρασκευάσματος. Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει τη σάρωση του παρασκευάσματος όχι μόνο ως προς τους άξονες x και y αλλά και ως προς τον z (βάθος) με αποτέλεσμα να λαμβάνονται καλά εστιασμένες τρισδιάστατες εικόνες που όμως δεν παρατηρούνται άμεσα, αλλά μέσω μικροϋπολογιστή με ειδικά προγράμματα (software) που κάνουν ψηφιοποίηση και ανακατασκευή της εικόνας.

Πρωτόκολο μεθόδου

Κύτταρα COS-7 καλλιεργήθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες σε καλλιεργητικά δοχεία 6 θέσεων (well) σε συγκέντρωση $3x10^5$ κύτταρα/well. Είκοσι-τέσσερεις ώρες αργότερα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pRShGRαWT, pRShGRαY663A, pRShGRαC665A, pRShGRαLL670/671AA (4μg/well) σε διάλυμα OPTI-MEM (2mL/well) χρησιμοποιώντας λιποφεκταμίνη (8μL/well). Έξι ώρες αργότερα, το διάλυμα διαμόλυνσης αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) εμπλουτισμένο με ορό εμβρύου βοός (10% FBS) και αντιβιοτικά (πενικιλλίνη

και στρεπτομυκίνη). Σαράντα ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 1mL PBS και μονιμοποιήθηκαν με 1mL παραφορμαλδεϋδης για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 2 πλυσίματα με 1mL PBS προστέθηκαν 1mL 0,2%Triton-X100 για 10 δευτερόλεπτα και ακολούθησαν πλυσίματα με 1mL PBS. Η δέσμευση μη ειδικών επιτόπων πραγματοποιήθηκε με 1mL 2%BSA-PBS για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάσθηκαν με πρωτογενές αντίσωμα (polyclonal anti-rabbit immunoglobulin) έναντι του hGRα σε αραίωση 1:100 σε 0,5%BSA-PBS για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν πλυσίματα με 1mL PBS και ακολούθησε επώαση με δευτερογενές αντίσωμα (Alexa Fluor® 594 donkey anti-rabbit IgG) σε αραίωση 1:500 σε 0,5%BSA-PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από διαδοχικά πλυσίματα με 1mL PBS, στις καλυπτρίδες εναποτέθηκαν 5μL Dapi. Ακολούθως, οι καλυπτρίδες εφαρμόσθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και παρέμειναν στους 4°C. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκαν λήψεις αντιπροσωπευτικών εικόνων για κάθε δείγμα με ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica).

Σε ορισμένα wells προστέθηκε ο αναστολέας της παλμιτυλίωσης 2-βρωμοπαλμιτικό σε συγκέντρωση 100μm για 150 λεπτά, ενώ σε άλλα wells τα κύτταρα επωάσθηκαν με/και με δεξαμεθαζόνη σε συγκέντρωση 10^{-6}M.

Για τα πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού, τα κύτταρα συνεπωάσθηκαν με πρωτογενές αντίσωμα (monoclonal anti-mouse immunoglobulin) έναντι της καβεολίνης-1 σε αραίωση 1:200 σε 0,5%BSA-PBS και με πρωτογενές αντίσωμα (polyclonal anti-rabbit immunoglobulin) έναντι του hGRα σε αραίωση 1:100 σε 0,5%BSA-PBS για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 3 πλυσίματα με 1mL PBS, τα κύτταρα συνεπωάσθηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με 150μL 0,5% BSA-PBS που περιείχαν συνδυασμό δευτερογενών αντισωμάτων (αραίωση 1:500 για το κάθε δευτερογενές αντίσωμα) (Alexa Fluor® 594 donkey anti-rabbit IgG, Invitrogen, Cat No A21207 και Fluorescein goat anti-mouse IgG, Invitrogen, Cat No F2761). Ακολούθησαν 3 πλυσίματα με 1mL PBS και στις καλυπτρίδες εναποτέθηκαν 5μL Dapi. Ακολούθως, οι καλυπτρίδες εφαρμόσθηκαν σε αντικειμενοφόρους και παρέμειναν στους 4°C. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκαν λήψεις αντιπροσωπευτικών εικόνων για κάθε δείγμα

με ανάστροφο συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica). Τα κύτταρα κατελάμβαναν την επιφάνεια της καλυπτρίδας σε ποσοστό 60-70%.

11. Υποκυτταρική Κλασμάτωση

Πρωτόκολο μεθόδου

Τα πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης υλοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το Subcellular Protein Fractionation Kit (Thermo Scientific).

Κύτταρα COS-7 ($2X10^6$) καλλιεργήθηκαν σε 75-cm^2 flasks. Είκοσι-τέσσερεις ώρες αργότερα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pRShGRαWT, pRShGRαY663A, pRShGRαC665A, pRShGRαLL670/671AA (15μg/flask) σε διάλυμα OPTI-MEM (10mL/flask) χρησιμοποιώντας λιποφεκταμίνη (lipofectamine 2000) (30 μL/flask). Πέντε ώρες αργότερα, το διάλυμα διαμόλυνσης αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) εμπλουτισμένο με ορό εμβρύου βοός (10% FBS) και αντιβιοτικά (πενικιλλίνη και στρεπτομυκίνη). Σαράντα ώρες μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα ανασηκώθηκαν από τις φλάσκες με τρυψινοποίηση και μετρήθηκαν με πλάκα Neubauer. Εξ αυτών, $5X10^6$ ξεπλύθηκαν με 1mL PBS και φυγοκεντρήθηκαν στα 2300 rpm για 3 λεπτά. Το PBS απομακρύνθηκε με προσοχή και τα ιζήματα των κυττάρων αναμείχθηκαν ομαλά. Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε το πρωτόκολο Subcellular Protein Fractionation Kit. Στα κυτταρικά ιζήματα προστέθηκαν αρχικά 500μL Cytoplasmic Extraction Buffer και ακολούθησε κυκλική επώαση στους 4°C για 20 λεπτά. Τα ομογενοποιήματα φυγοκεντρήθηκαν στα 2300rpm στους 4°C για 5 λεπτά. Τα υπερκείμενα (κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα) μεταφέρθηκαν σε νέα ependorf tubes. Στα εναπομείναντα ιζήματα προστέθηκαν 500μL Membrane Extraction Buffer και ακολούθησε ανάδευση (vortex) για 5 δευτερόλεπτα και κυκλική επώαση στους 4°C για 10 λεπτά. Τα ομογενοποιήματα φυγοκεντρήθηκαν στα 5600rpm στους 4°C για 5 λεπτά. Τα υπερκείμενα (μεμβρανικά εκχυλίσματα) μεταφέρθηκαν σε νέα ependorf tubes. Στα εναπομείναντα ιζήματα προστέθηκαν 250μL Nuclear Extraction Buffer και ακολούθησε ανάδευση (vortex) για 15 δευτερόλεπτα και κυκλική επώαση

στους 4°C για 30 λεπτά. Τα ομογενοποιήματα φυγοκεντρήθηκαν στα 7300rpm στους 4°C για 5 λεπτά. Τα υπερκείμενα (πυρηνικά εκχυλίσματα) μεταφέρθηκαν σε νέα ependorf tubes. Ακολούθησε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και στη συνέχεια στύπωμα κατά Western φορτώνοντας 20μg από κάθε κυτταροπλασματικό, μεμβρανικό και πυρηνικό εκχύλισμα. Ως αρνητικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκαν μη διαμολυνθέντα COS-7 κύτταρα.

12. Δοκιμασίες μετατόπισης του υποδοχέα στον πυρήνα (Nuclear Translocation Studies)

Βασικές αρχές μεθόδου

Η διαμόλυνση των κυττάρων HeLa στο πρωτόκολο που ακολουθεί, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο διαμόλυνσης FuGene. Πρόκειται για μη λιπιδιακό κατιονικό σωμάτιο το οποίο σχηματίζει δεσμούς με το αρνητικά φορτισμένο DNA διευκολύνοντας την εισδοχή του στο κύτταρο-στόχος. Είναι λιγότερο κυτταροτοξικό σε σύγκριση με τη λιποφεκτίνη/λιποφεκταμίνη και η διαμόλυνση λαμβάνει χώρα στο ήδη υπάρχον θρεπτικό υλικό των κυττάρων στην παρουσία ορού και αντιβιοτικών.

Πρωτόκολο μεθόδου

Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία σε συγκέντρωση $2x10^5$ κύτταρα/τρυβλίο. Είκοσι-τέσσερεις ώρες αργότερα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pF25GFPhGRαWT και pF25GFPhGRαC665A (2μg/well) με τη χρήση FuGene (6μL/τρυβλίο). Τριάντα ώρες μετά τη διαμόλυνση, το θρεπτικό αντικαταστάθηκε με καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό phenol red free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) εμπλουτισμένο με charcoal dextran treated FBS (10% FBS) και αντιβιοτικά (πενικιλλίνη και στρεπτομυκίνη). Το θρεπτικό υλικό αυτό στερείται στεροειδών, οπότε αποτρέπει τη μετατόπιση του υποδοχέα στον πυρήνα χωρίς την προσθήκη δεξαμεθαζόνης. Δεκαοχτώ ώρες αργότερα, στα κύτταρα προστέθηκε δεξαμεθαζόνη σε

συγκέντρωση 10^{-6}M και ελήφθησαν εικόνες με ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού ανά 3min.

13. Μελέτες ενεργοποίησης κινασών

Πρωτόκολο μεθόδου

Κύτταρα COS-7 καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικά δοχεία 6 θέσεων (well) σε συγκέντρωση $3x10^5$ κύτταρα/well. Είκοσι-τέσσερεις ώρες αργότερα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pRShGRαWT, pRShGRαY663A, pRShGRαC665A, pRShGRαLL670/671AA (2μg/well) σε διάλυμα OPTI-MEM (2mL/well) χρησιμοποιώντας λιποφεκταμίνη (lipofectamine 2000) (4μL/well). Πέντε ώρες αργότερα, το διάλυμα διαμόλυνσης αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) εμπλουτισμένο με ορό εμβρύου βοός (10% FBS) και αντιβιοτικά (πενικιλλίνη και στρεπτομυκίνη). Είκοσι-τέσσερεις ώρες αργότερα, στο 50% των wells προστέθηκε ο αναστολέας 2-Br (100μM αραιωμένο σε 100% DMSO). Δεκαέξι ώρες αργότερα τα κύτταρα επωάσθηκαν με δεξαμεθαζόνη 10^{-6} M για διαφορετικούς χρόνους (0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min και 120 min). Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 1mL PBS και λύθηκαν με 150μL Complete Lysis-M στο οποίο προστέθηκαν οι αναστολείς φωσφατασών Na_2VO_4 (0,2mM) και NaF (1mM). Τα ομογενοποιήματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm στους 4°C για 15 λεπτά. Οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Bradford. Ακολούθησε στύπωμα κατά Western. Οι προκύπτουσες μεμβράνες επωάσθηκαν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με τα ακόλουθα πρωτογενή αντισώματα: mouse anti-p-ERK (1:1000, αραιωμένο σε 5%γάλα-TBS-Tween20) ή rabbit anti-p-Akt (1:1000, αραιωμένο σε 5%γάλα-TBS-Tween20). Ακολούθησαν 3 δεκάλεπτα πλυσίματα με TBS-Tween20 και στη συνέχεια οι μεμβράνες επωάσθηκαν με τα ακόλουθα δευτερογενή αντισώματα: polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin HRP (1:5000, αραιωμένο σε 5%γάλα-TBS-Tween20) ή με polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulin HRP (1:5000, αραιωμένο σε 5%γάλα-TBS-Tween20) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε εμφάνιση. Ως δείκτες ισόποσης φόρτωσης χρησιμοποιήθηκαν η ERK και η Akt με τα αντίστοιχα

πρωτογενή αντισώματα: rabbit anti-ERK antibody (1:1000, αραιωμένο σε 5%γάλα-TBS-Tween20) ή rabbit anti-Akt antibody (1:250, αραιωμένο σε 5%γάλα-TBS-Tween20).

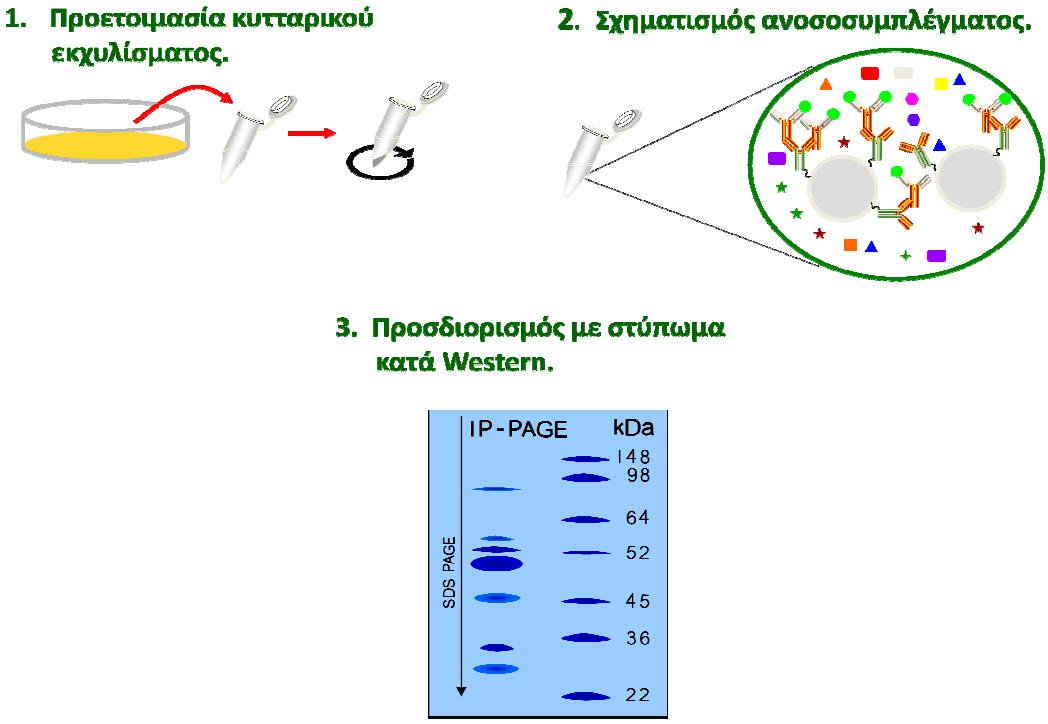
14. Μελέτες παλμιτυλίωσης

Βασικές αρχές μεθόδου

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε στις μελέτες παλμιτυλίωσης είναι η επώαση των κυττάρων με ραδιενεργά σημασμένο παλμιτικό οξύ [9,10-^{3}H(N) παλμιτικό οξύ] και ακολούθως ανοσοκατακρήμνιση των υπό εξέταση πρωτεϊνών.

- **Ανοσοκατακρήμνιση**

  Πρόκειται για μια μέθοδο της μοριακής βιολογίας κατά την οποία είναι εφικτή η απομόνωση και η κατακρήμνιση ενός αντιγόνου από μια πληθώρα αντιγόνων ενός πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, με τη χρήση αντισώματος έναντι του αντιγόνου και σφαιριδίων πρωτεΐνης A/G. Στα σφαιρίδια προσδένεται το αντίσωμα και στη συνέχεια το αντίσωμα αναγνωρίζει και προσδένει το αντιγόνο. Το ανοσοσύμπλεγμα σφαιριδίων πρωτεΐνης A/G-αντισώματος-αντιγόνου απομονώνεται ως ίζημα της ανοσοκατακρήμνισης. Ακολούθως, το αντιγόνο εκλούεται και αποδεσμεύεται από το λοιπό ανοσοσύμπλεγμα.



Εικόνα 2.11: Βασικές αρχές ανοσοκατακρήμνισης.

Πρωτόκολο μεθόδου

Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα HENG-KCl 0mM, HENG-KCl 150mM και HENG-KCl 300mM ως ακολούθως:

	HENG-KCl 0mM	HENG-KCl 150mM	HENG-KCl 300mM
HEPES 1M pH 7.9	2mL	2mL	2mL
$MgCl_2$ 1M	0,3mL	0,3mL	0,3mL
EDTA 0,5M	0,1mL	0,1mL	0,1mL
Γλυκερόλη 100%	40mL	40mL	40mL
NP-40 100%	0,6mL	0,6mL	0,6mL
KCl 1M	-	30mL	30mL

Κύτταρα COS-7 ($2x10^6$) καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικά τρυβλία 100mm. Είκοσι-τέσσερεις ώρες αργότερα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα πλασμίδια pRShGRαWT και $erbA^{-1}$ (15μg/τρυβλίο) σε διάλυμα OPTI-MEM (10mL/τρυβλίο) χρησιμοποιώντας λιποφεκταμίνη (30μL/τρυβλίο). Πέντε ώρες αργότερα, το διάλυμα διαμόλυνσης αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) εμπλουτισμένο με ορό εμβρύου βοός (10% FBS) και αντιβιοτικά (πενικιλλίνη και στρεπτομυκίνη). Σαράντα ώρες μετά τη διαμόλυνση, το καλλιεργητικό θρεπτικό των κυττάρων αντικαταστάθηκε με θρεπτικό χωρίς FBS και αντιβιοτικά για 1 ώρα. Ακολούθως, τα κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες με 5mL θρεπτικό χωρίς FBS και αντιβιοτικά, στο οποίο προστέθηκαν 50μL DMSO (1%) και 100μL 9,10-^{3}H(N) παλμιτικό οξύ (0,1mCi/mL). Στη συνέχεια, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 10mL PBS, ανασηκώθηκαν με πλαστικά ξύστρα, φυγοκεντρήθηκαν στις 2000rpm για 10 λεπτά και λύθηκαν με 500μL Complete Lysis-M. Τα ομογενοποιήματα φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm στους 4°C για 15 λεπτά και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε νέα σωληνάρια ependorf. Οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο Bradford. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων (Dynabeads Protein G). Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα τρία δείγματα (control, GR, $erbA^{-1}$) διαμοιράστηκαν σε σωληνάρια ependorf (300μg/σωληνάριο) και αναμείχθηκαν με 5μL μαγνητικών σφαιριδίων σε διάλυμα που περιείχε HENG-KCl 150mM, αναστολείς πρωτεασών και PMSF. Τα δείγματα επωάστηκαν κυκλικά στους 4°C για 1 ώρα. Παράλληλα, τα αντισώματα έναντι της καβεολίνης-1 (για το control δείγμα), έναντι του hGR (για τα δείγματα hGR και $erbA^{-1}$) και έναντι της IgG (5μg/αντίδραση) αναμείχθηκαν με 15μL μαγνητικών σφαιριδίων σε διάλυμα που περιείχε HENG-KCl 150mM και επωάστηκαν κυκλικά στους 4°C για 1 ώρα. Ακολούθως, τα εκχυλίσματα των δειγμάτων αναμείχθηκαν με τα μαγνητικά σφαιρίδια στα οποία προσκολλήθηκαν τα αντίστοιχα αντισώματα και συνεπωάστηκαν στους 4°C ολονύχτια. Την επόμενη μέρα, τα μαγνητικά σφαιρίδια υπέστησαν 6 πλυσίματα διάρκειας 5 λεπτών με διάλυμα HENG-KCl 300mM. Μετά το τελευταίο πλύσιμο, τα μαγνητικά σφαιρίδια αναδιαλύθηκαν σε 20μL Laemmli 2x και θερμάνθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 1 λεπτό. Τα 10μL αναμείχθηκαν με 4mL scintillation fluid σε ειδικά σωληνάρια μέτρησης ραδιενέργειας. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε β-counter.

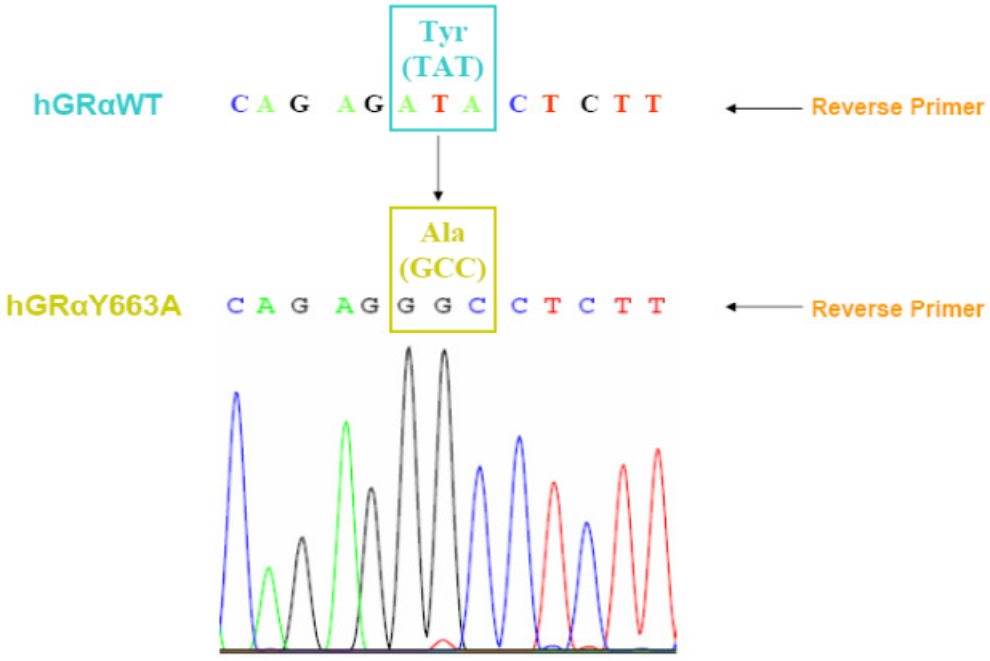
3. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να διαλευκάνει τους μοριακούς μηχανισμούς των μη γενωμικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών και να διερευνήσει το ενδεχόμενο παλμιτυλίωσης του hGRα ως πιθανού μηχανισμού διαμεσολάβησης της ταχείας σηματοδότησης των γλυκοκορτικοειδών μετά από μετανάστευση και πρόσδεση του hGRα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αναλυτικότερα, προσδιορίσαμε κατά πόσο οι μεταλλάξεις στις θέσεις -2, 0 και +5/6, σε σχέση με την κυστεΐνη, στο υπό εξέταση μοτίβο 663YLCMKTLLL671, επηρεάζουν τις γενωμικές δράσεις του υποδοχέα, τη μεμβρανική εντόπιση, τον συνεντοπισμό με την καβεολίνη-1 και την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK και PI_3K. Τέλος, εξετάσαμε εάν ο hGRα υφίσταται παλμιτυλίωση στο μοτίβο αυτό.

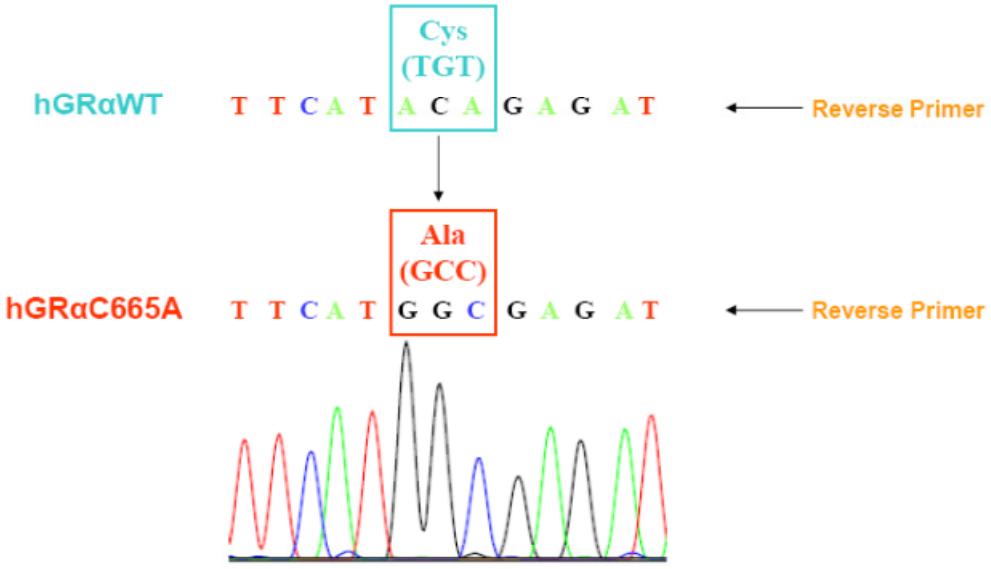
4. Αποτελέσματα

4.1 Επιβεβαίωση των μεταλλάξεων με αλληλούχηση.

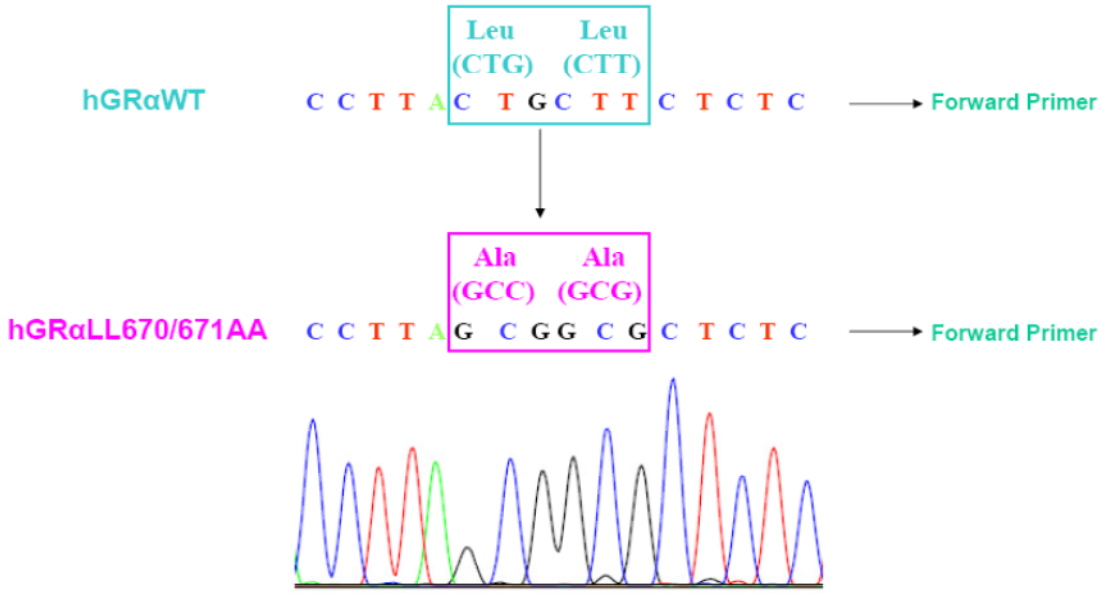
Με σκοπό να μελετήσουμε το ρόλο του υψηλά συντηρημένου μοτίβου των 9 αμινοξέων στις γενωμικές και μη γενωμικές δράσεις του hGRα, πραγματοποιήσαμε σημειακή κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο τον pRShGRαWT, για τη δημιουργία των μεταλλάξεων στις θέσεις -2, 0 και +5/6, σε σχέση με την κυστεΐνη, στο υπό εξέταση μοτίβο. Προέκυψαν οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς hGRαY663A, hGRαC665A και hGRαLL670/671. Οι αντικαταστάσεις των νουκλεοτιδίων επιβεβαιώθηκαν με αλληλούχηση και τα χρωματογραφήματα παρατίθενται στις **εικόνες 4.1, 4.2** και **4.3**.



Εικόνα 4.1: Χρωματογράφημα αλληλούχησης στο οποίο επιβεβαιώνεται η αντικατάσταση της τυροσίνης σε αλανίνη στη θέση 663 (hGRαY663A).



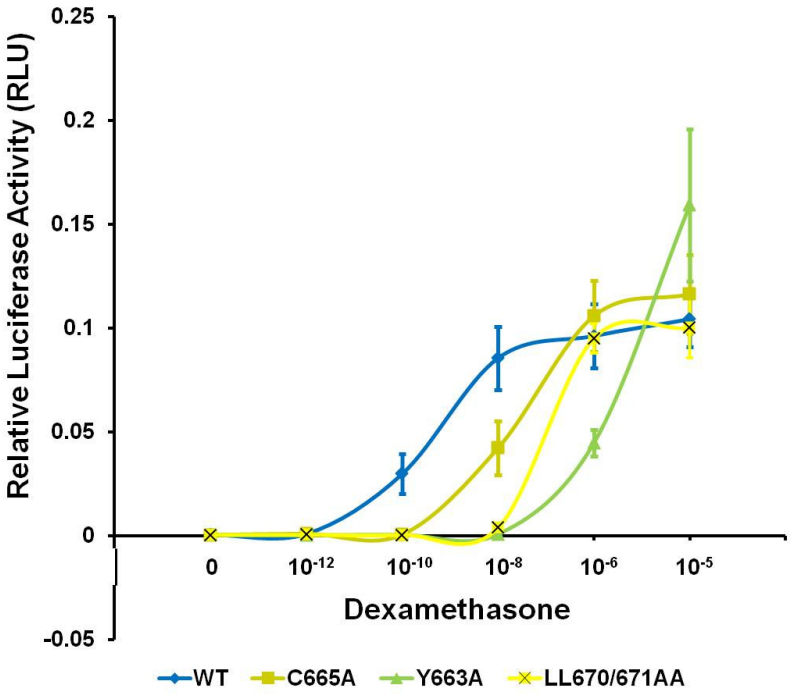
Εικόνα 4.2: Χρωματογράφημα αλληλούχησης στο οποίο επιβεβαιώνεται η αντικατάσταση της κυστεΐνης σε αλανίνη στη θέση 665 (hGRαC665A).



Εικόνα 4.3: Χρωματογράφημα αλληλούχησης στο οποίο επιβεβαιώνεται η αντικατάσταση της λευκίνης σε αλανίνη στις θέσεις 670 και 671 (hGRαLL670/671AA).

4.2 Συγκριτικά με τον φυσικού-τύπου υποδοχέα hGRαWT, οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς hGRαC665A και hGRαLL670/671AA παρουσιάζουν ελαττωμένη ικανότητα ενεργοποίησης του επαγώμενου από γλυκοκορτικοειδή υποκινητή του MMTV σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης (< 10^{-6}M) και την ίδια ικανότητα ενεργοποίησης του υποκινητή αυτού σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης (10^{-6}M, 10^{-5}M). Ο υποδοχέας hGRαY663A παρουσιάζει ελάττωση της ικανότητας ενεργοποίησης του υποκινητή MMTV σε όλες τις συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης.

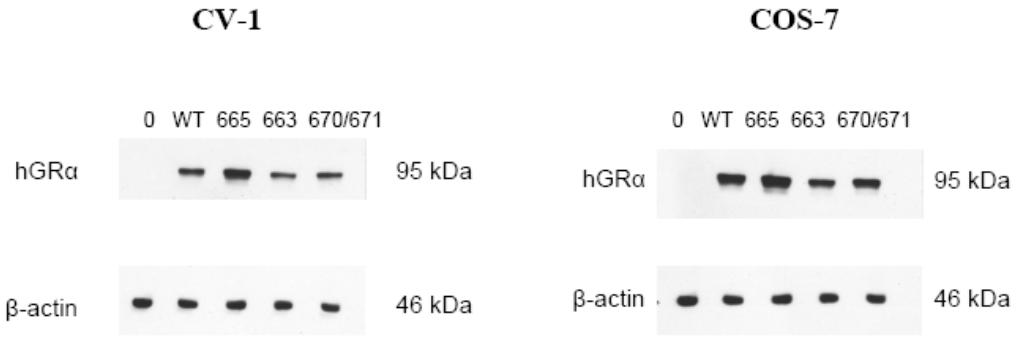
Με σκοπό να εξετάσουμε την ικανότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής γονιδίων-στόχων των υπό μελέτη μεταλλαγμένων υποδοχέων, διερευνήσαμε την ικανότητά τους να ενεργοποιούν ένα υποκινητή επαγώμενο σε γλυκοκορτικοειδή, τον υποκινητή του mouse mammary tumor virus (MMTV), σε προοδευτικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης. Δείξαμε ότι συγκριτικά με τον hGRαWT, οι υποδοχείς hGRαC665A και hGRαLL670/671AA παρουσιάζουν ελαττωμένη ικανότητα ενεργοποίησης του υποκινητή του MMTV σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης (< 10^{-6}M) και την ίδια ικανότητα ενεργοποίησης του υποκινητή αυτού σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης (10^{-6}M, 10^{-5}M). Ο υποδοχέας hGRαY663A παρουσίασε ελάττωση της ικανότητας ενεργοποίησης του υποκινητή MMTV σε όλες τις συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης (**Εικόνα 4.4**). Τα αποτελέσματα αυτά λαμβάνουν υπόψη τους τις διαφορές στην πρωτεϊνική έκφραση που παρατηρήθηκε μεταξύ των υποδοχέων στο στύπωμα κατά Western.



Εικόνα 4.4: Δοκιμασίες ενεργοποίησης του υποκινητή MMTV από τα πλασμίδια pRShGRαWT, pRShGRαY663A, pRShGRαC665A και pRShGRαLL670/671AA.

4.3 Ο υποδοχέας hGRαC665A εμφανίζει αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση σε σχέση με τον hGRαWT, ο υποδοχέας hGRαY663A εμφανίζει μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση και ο hGRαLL670/671AA παρουσιάζει την ίδια έκφραση με τον hGRαWT.

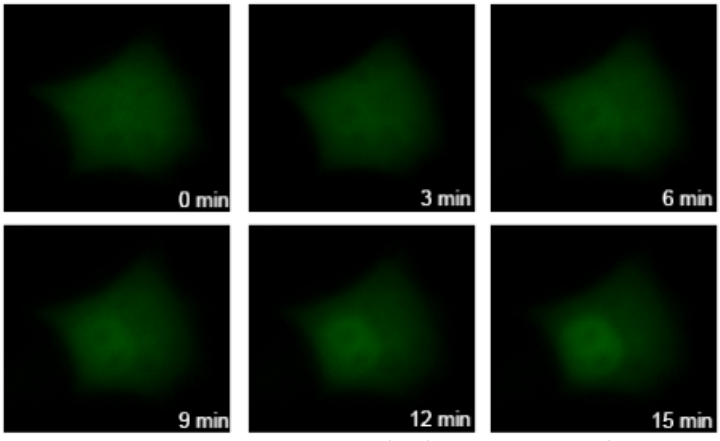
Στη συνέχεια, διερευνήσαμε την πρωτεϊνική έκφραση των υπό μελέτη μεταλλαγμένων υποδοχέων με στύπωμα κατά Western των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των CV-1 και COS-7 κυττάρων μετά από διαμόλυνση. Δείξαμε ότι ο υποδοχέας hGRαC665A εμφανίζει αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση σε σχέση με τον hGRαWT, ο υποδοχέας hGRαY663A εμφανίζει μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση και ο υποδοχέας hGRαLL670/671AA παρουσιάζει την ίδια έκφραση με τον hGRαWT (**Εικόνα 4.5**).



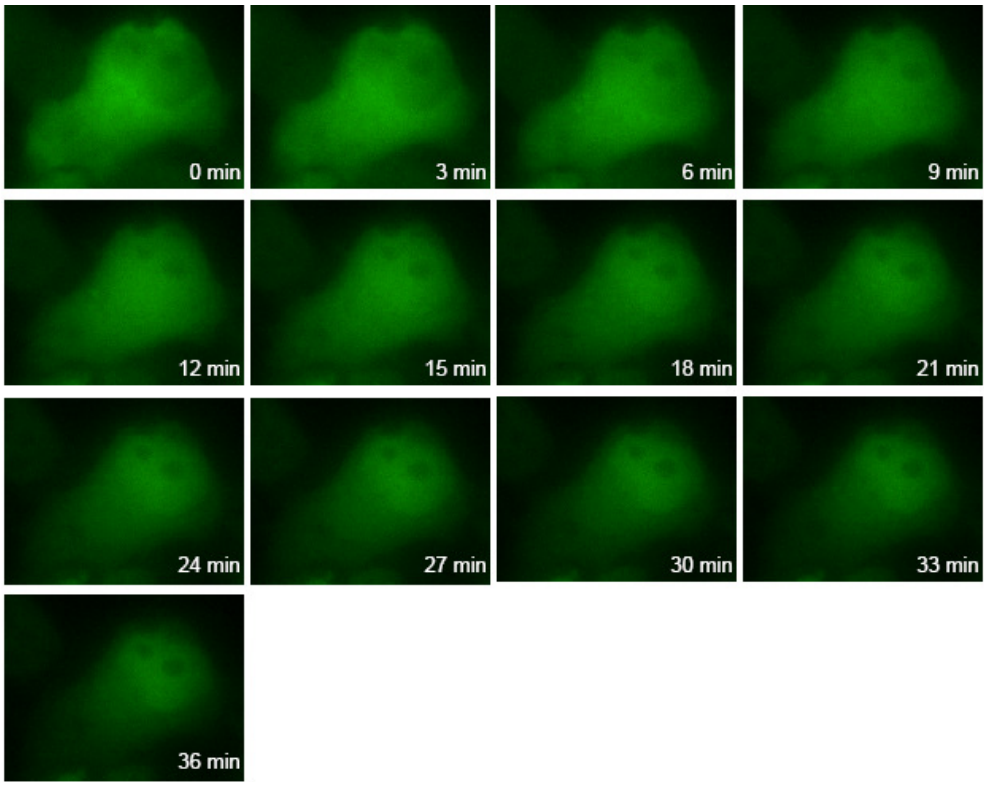
Εικόνα 4.5: Στύπωμα κατά Western των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων σε CV-1 και COS-7 κύτταρα.

4.4 Η μετατόπιση του hGRαC665A στον πυρήνα μετά από έκθεση σε δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M καθυστερεί σε σχέση με το hGRαWT.

Στα πλαίσια διερεύνησης των γενωμικών δράσεων και προκειμένου να μελετήσουμε το χρόνο που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η μετατόπιση στον πυρήνα του μεταλλαγμένου υποδοχέα hGRαC665A μετά από έκθεση σε δεξαμεθαζόνη, διαμολύναμε HeLa κύτταρα με pF25GFPhGRαWT και pF25GFPhGRαC665A σε ξεχωριστά τρυβλία. Ακολούθως, εκθέσαμε τα κύτταρα σε δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M και πήραμε εικόνες σε διαφορετικούς χρόνους με ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού. Δείξαμε ότι η μετατόπιση του hGRαWT στον πυρήνα ολοκληρώνεται σε 15 λεπτά (**Εικόνα 4.6**), ενώ η μετάλλαξη hGRαC665A απαιτεί 36 λεπτά για την επιτυχή ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής (**Εικόνα 4.7**).



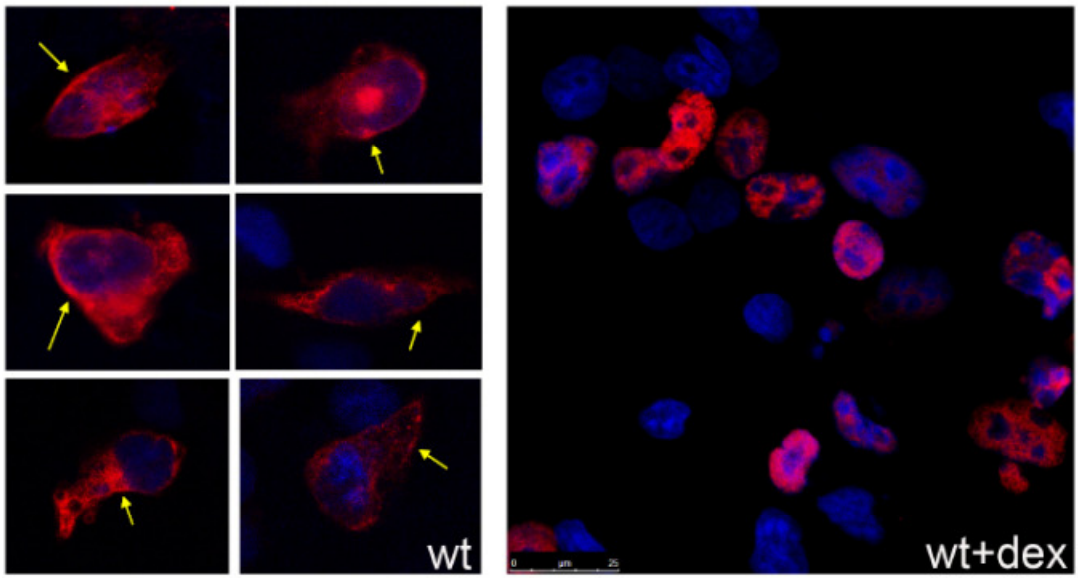
Εικόνα 4.6: Η μετατόπιση στον πυρήνα του hGRαWT ολοκληρώνεται σε 15 λεπτά.



Εικόνα 4.7: Η μετατόπιση στον πυρήνα του hGRαC665A ολοκληρώνεται σε 36 λεπτά.

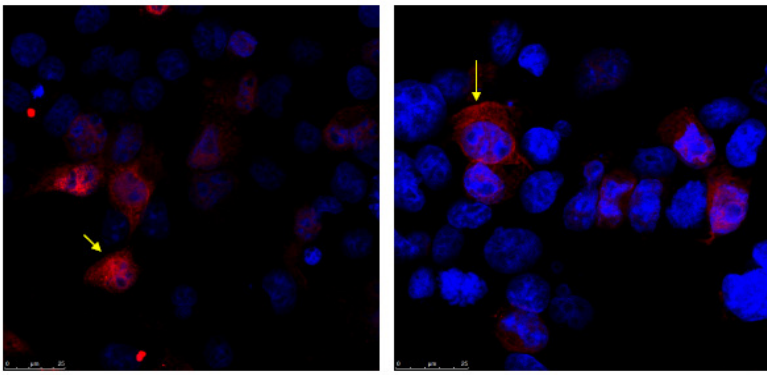
4.5 Μεμβρανική εντόπιση του hGRα σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαWT, pRShGRαC665A, pRShGRαY663A και pRShGRαLL670/671AA. Η προσθήκη του αναστολέα της παλμιτυλίωσης 2-Βρωμοπαλμιτικού δεν απέτρεψε τη μεμβρανική εντόπιση του hGRα. Η προσθήκη δεξαμεθαζόνης 10^{-6}M δίνει αποκλειστικά πυρηνικό σήμα

Μελετώντας τις μη γενωμικές δράσεις του hGRα και προκειμένου να εξετάσουμε τη μεμβρανική εντόπιση του hGRα, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοφθορισμού σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαWT, pRShGRαC665A, pRShGRαY663A και pRShGRαLL670/671AA. Στην περίπτωση του hGRαWT, παρατηρήσαμε κύτταρα με μεμβρανική εντόπιση, ενώ η προσθήκη δεξαμεθαζόνης 10^{-6}M οδήγησε τον υποδοχέα στον πυρήνα (**Εικόνα 4.8**).

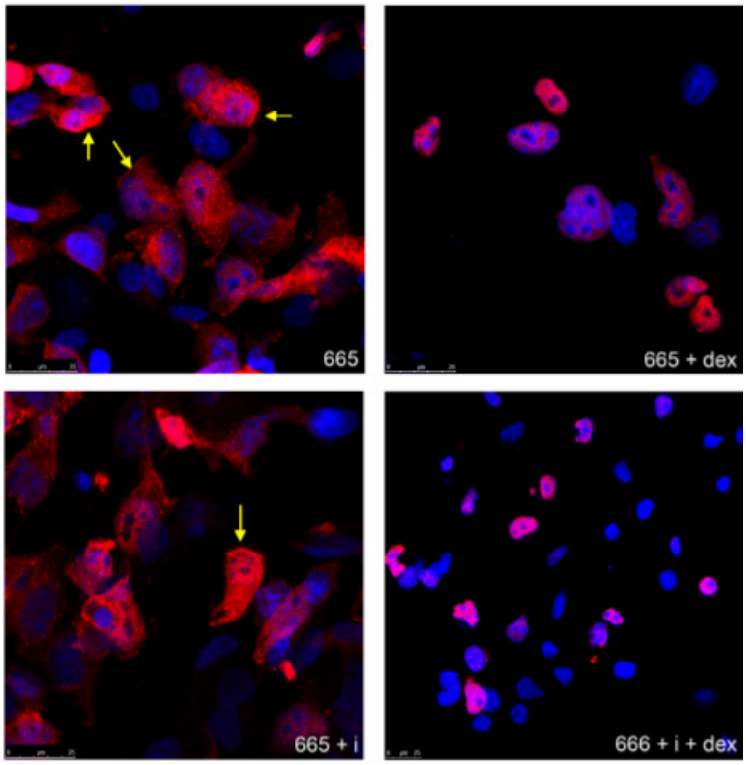


Εικόνα 4.8: Ανοσοφθορισμός σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαWT. Με κίτρινα βέλη δείχνουμε τη μεμβρανική εντόπιση. Η προσθήκη δεξαμεθαζόνης δίνει αποκλειστικά πυρηνικό σήμα.

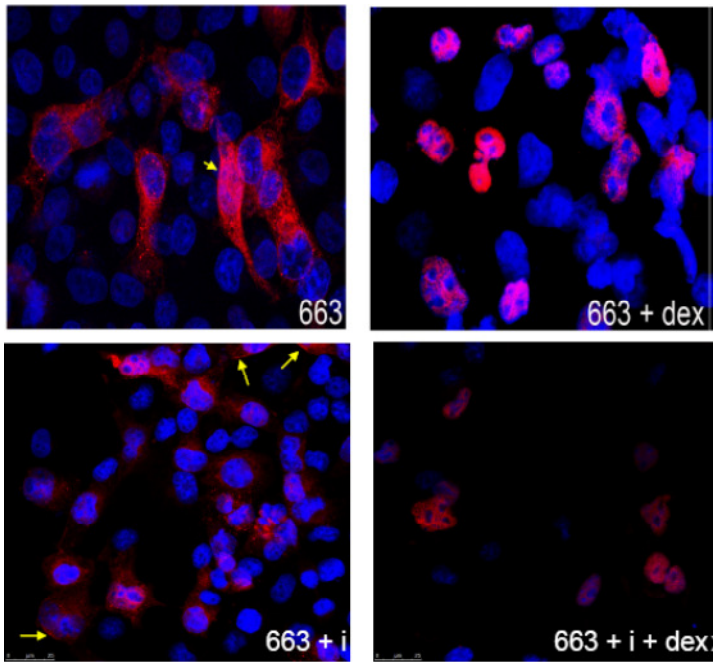
Η χορήγηση του αναστολέα της παλμιτυλίωσης 2-Βρωμοπαλμιτικού, δεν απέτρεψε τη μεμβρανική εντόπιση του hGRα σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαWT (**Εικόνα 4.9**). Παρόμοιες εικόνες παρατηρήσαμε σε όλους τους μεταλλαγμένους υποδοχείς (**Εικόνες 4.10, 4.11 και 4.12**).



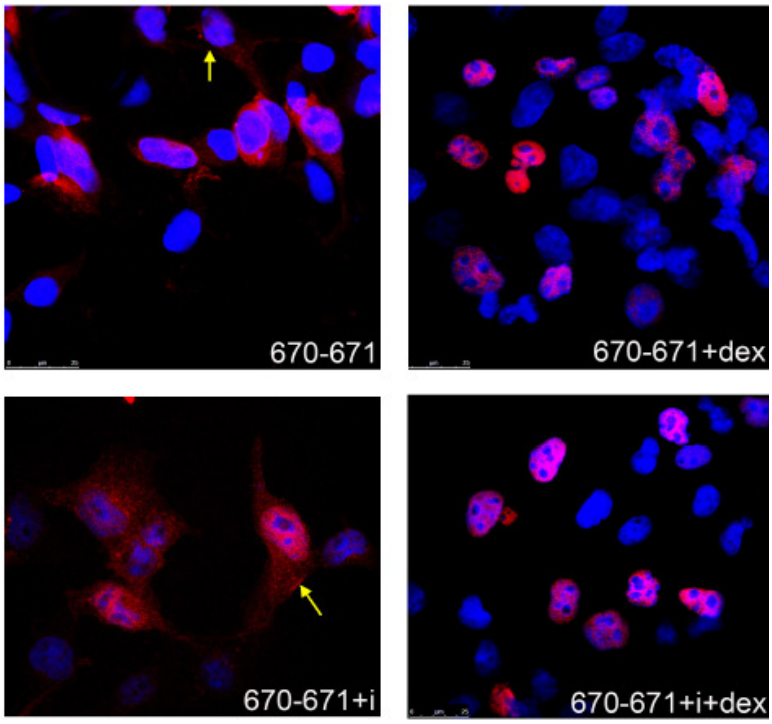
Εικόνα 4.9: Η χορήγηση 2-Βρωμοπαλμιτικού δεν απέτρεψε τη μεμβρανική εντόπιση (κίτρινα βέλη) του hGRαWT.



Εικόνα 4.10: Ανοσοφθορισμός σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαC665A. Με κίτρινα βέλη δείχνουμε τη μεμβρανική εντόπιση.

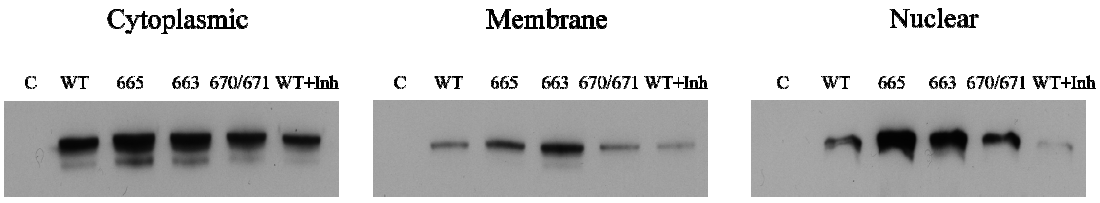


Εικόνα 4.11: Ανοσοφθορισμός σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαY663A.



Εικόνα 4.12: Ανοσοφθορισμός σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαLL670/671AA. Με κίτρινα βέλη δείχνουμε τη μεμβρανική εντόπιση.

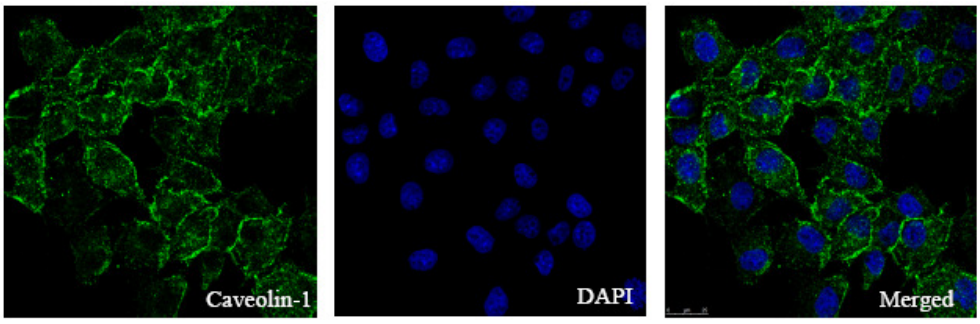
Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού, υλοποιήσαμε πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης για να μελετήσουμε την έκφραση του hGRα σε κυτταροπλασματικά, μεμβρανικά και πυρηνικά εκχυλίσματα κυττάρων που διαμολύνθηκαν είτε με τον φυσικού τύπου υποδοχέα είτε με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν μη διαμολυνθέντα κύτταρα COS-7. Ούτε οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς ούτε η προσθήκη του 2-Br απέτρεψαν τη μεμβρανική εντόπιση του hGRα (**Εικόνα 4.13**).



Εικόνα 4.13: Στύπωμα Western μετά από υποκυτταρική κλασμάτωση. Στα μεμβρανικά εκχυλίσματα παρατηρείται εντόπιση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.

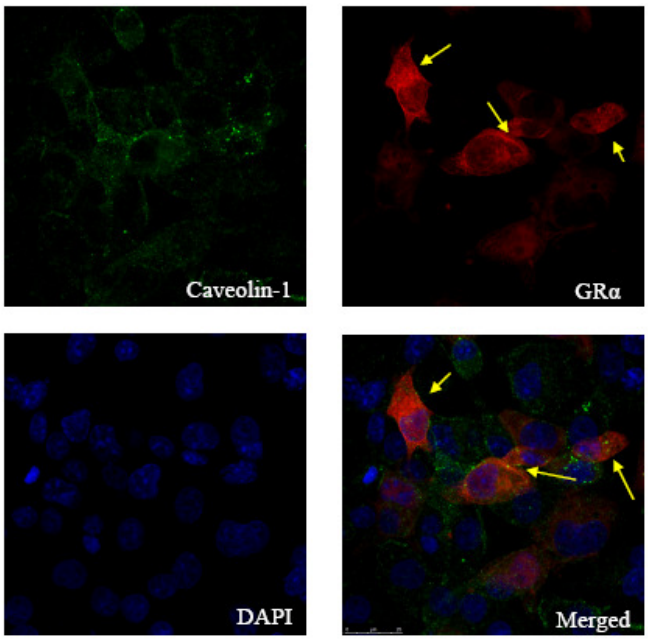
4.6 Συνεντοπισμός του hGRα με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη COS-7 κυττάρων που διαμολύνθηκαν με pRShGRαWT, pRShGRαC665A, pRShGRαY663A και pRShGRαLL670/671AA. Η προσθήκη του αναστολέα της παλμιτυλίωσης 2-Βρωμοπαλμιτικού δεν απέτρεψε τον μεμβρανικό συνεντοπισμό του hGRα με την καβεολίνη-1. Η προσθήκη δεξαμεθαζόνης 10^{-6}M οδηγεί τον υποδοχέα στον πυρήνα.

Με σκοπό να μελετήσουμε πιθανό συνεντοπισμό του hGRα με την καβεολίνη-1, πραγματοποιήσαμε πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού. Αρχικά, μελετήσαμε την εντόπιση της καβεολίνης-1 σε COS-7 μη διαμολυνθέντα κύτταρα. Παρατηρήσαμε ότι η καβεολίνη-1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη με τη μορφή στιγμάτων (dots) (**Εικόνα 4.14**).



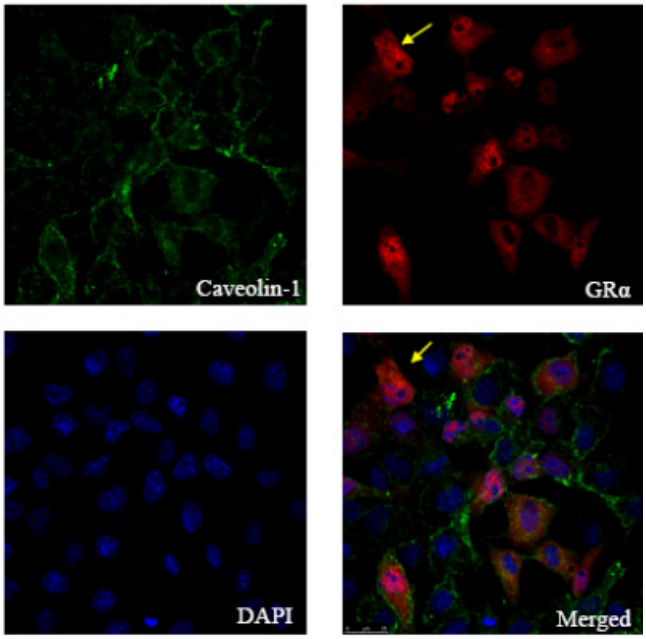
Εικόνα 4.14: Εντόπιση της καβεολίνης-1 στο κυτταρόπλασμα και τη μεμβράνη μη-διαμολυνθέντων COS-7.

Στα COS-7 κύτταρα, που διαμολύνθηκαν με pRShGRαWT, παρατηρήσαμε συνεντοπισμό του hGRα με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (κίτρινο χρώμα στην εικόνα merged) (**Εικόνα 4.15**).

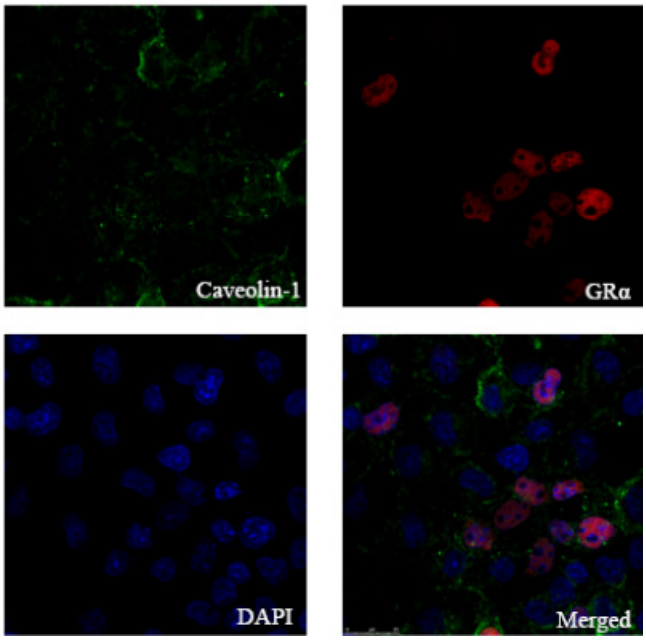


Εικόνα 4.15: Συνεντοπισμός του hGRαWT με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Η χορήγηση του αναστολέα 2-Βρωμοπαλμιτικού δεν απέτρεψε τον συνεντοπισμό, όπως δείχνει η **Εικόνα 4.16**, ενώ η επώαση των κυττάρων, που διαμολύνθηκαν με pRShGRαWT, με δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M έδειξε πυρηνική εντόπιση του υποδοχέα (**Εικόνα 4.17**).

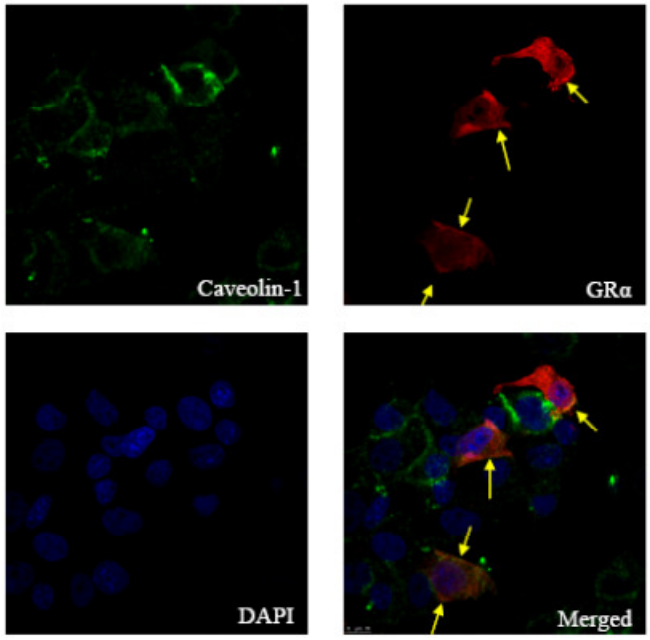


Εικόνα 4.16: Συνεντοπισμός του hGRα με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαWT στα οποία χορηγήθηκε ο αναστολέας 2-Βρωμοπαλμιτικό.

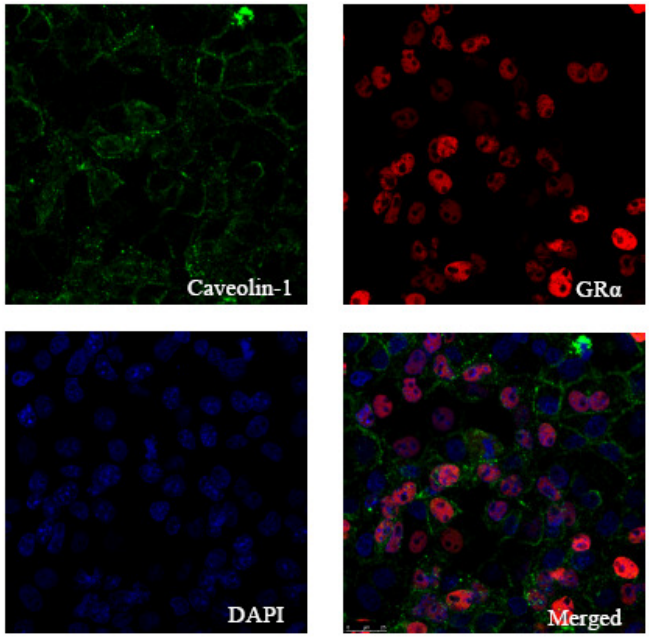


Εικόνα 4.17: Πυρηνική εντόπιση του hGRαWT μετά από επώαση με δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M.

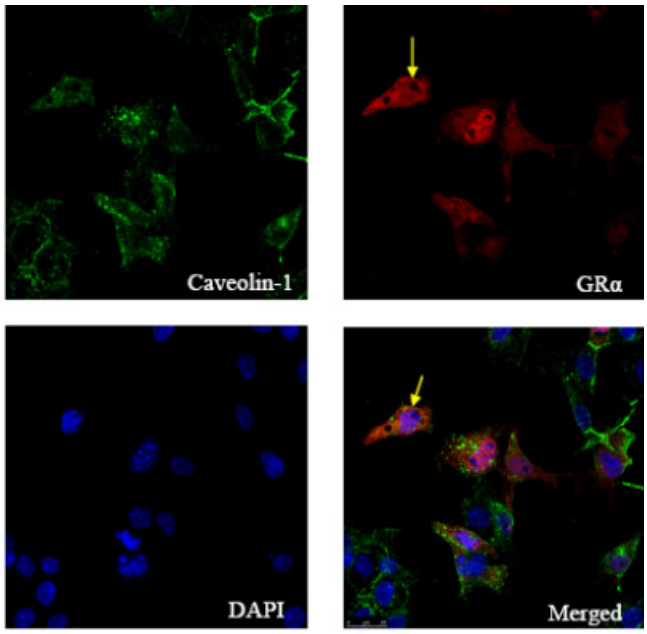
Παρόμοιες εικόνες παρατηρήσαμε σε όλους τους μεταλλαγμένους υποδοχείς που μελετήσαμε (**Εικόνες 4.18-4.23**). Η επώαση των διαμολυνθέντων κυττάρων με δεξαμεθαζόνη έδειχνε αποκλειστικά πυρηνική εντόπιση του υποδοχέα.



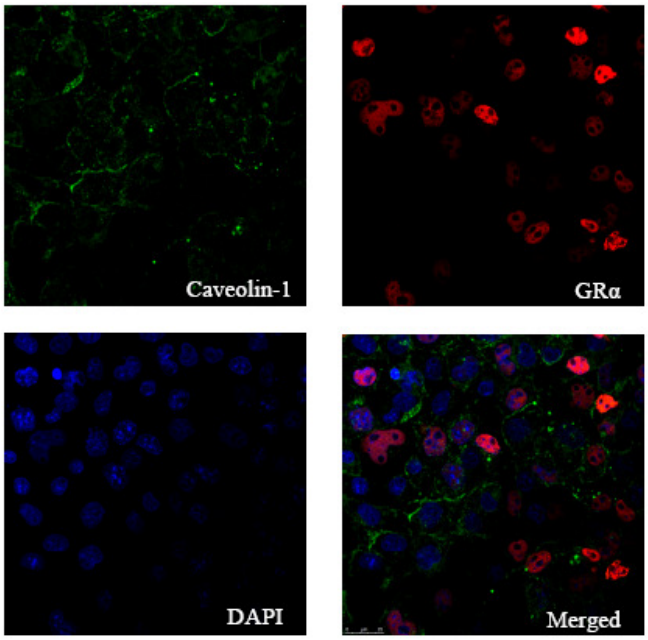
Εικόνα 4.18: Συνεντοπισμός του hGRα με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαC665A.



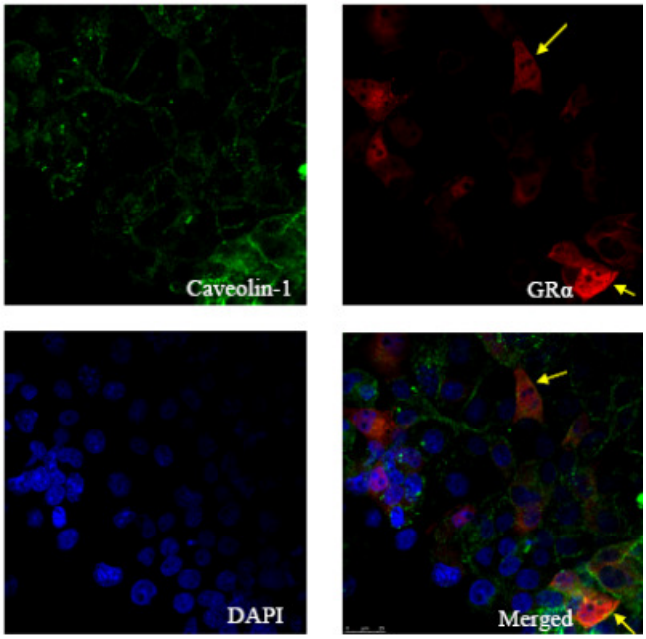
Εικόνα 4.19: Πυρηνική εντόπιση του hGRαC665A μετά από επώαση με δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M.



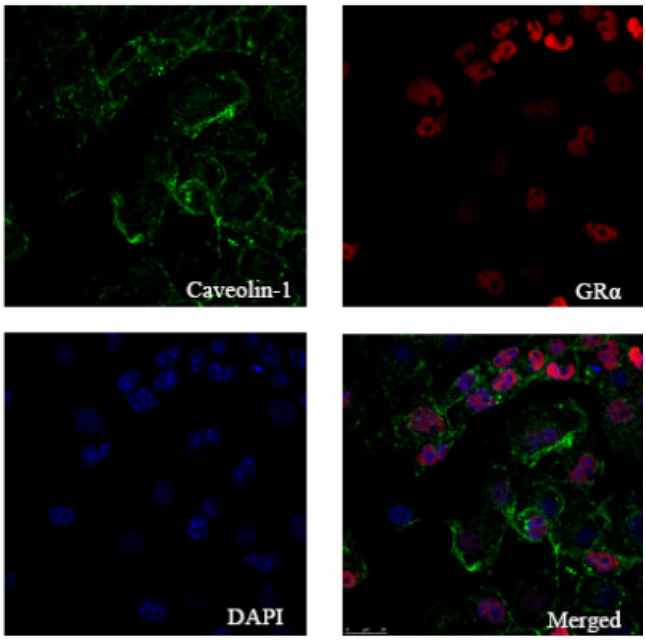
Εικόνα 4.20: Συνεντοπισμός του hGRα με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαY663A.



Εικόνα 4.21: Πυρηνική εντόπιση του hGRαY663A μετά από επώαση με δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M.



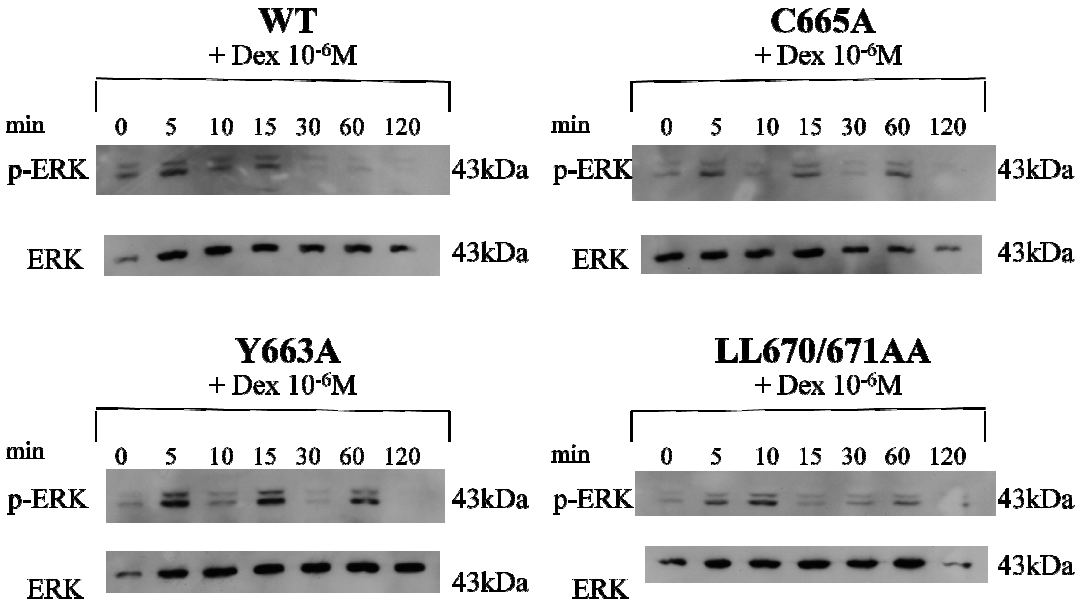
Εικόνα 4.22: Συνεντοπισμός του hGRα με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σε COS-7 κύτταρα διαμολυνθέντα με pRShGRαLL670/671AA.



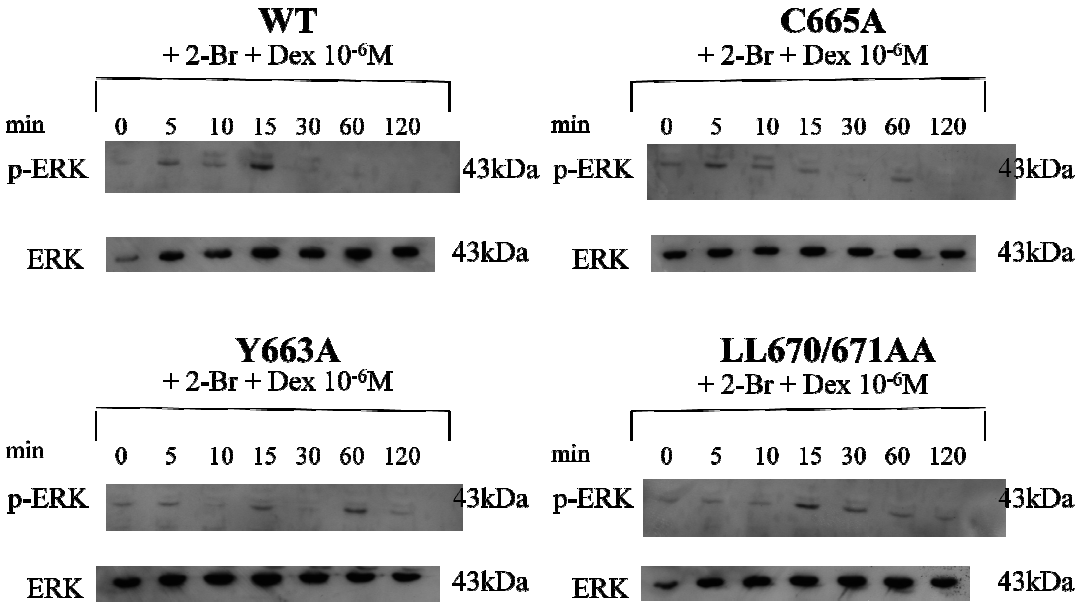
Εικόνα 4.23: Πυρηνική εντόπιση του hGRαLL670/671AA μετά από επώαση με δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M.

4.7 Τόσο ο φυσικού τύπου υποδοχέας όσο και οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς επάγουν διφασικά την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK. Η προσθήκη του αναστολέα 2-Br δεν απέτρεψε την ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI_3K δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τον φυσικού τύπου υποδοχέα ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς στην παρουσία ή απουσία του αναστολέα 2-Br.

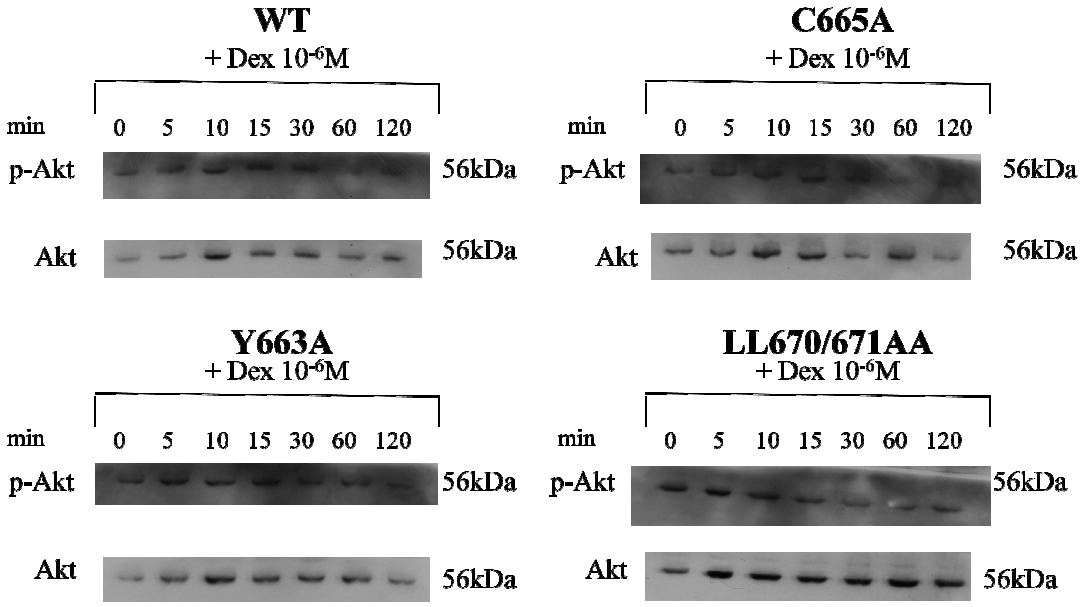
Με σκοπό να προσδιορίσουμε κατά πόσο η ενδεχόμενη παλμιτυλίωση του hGRα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις ταχείες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών, προχωρήσαμε σε μελέτες ενεργοποίησης των κινασών σε κύτταρα COS-7, τα οποία διαμολύνθηκαν είτε με τον φυσικού τύπου υποδοχέα είτε με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς. Παρατηρήσαμε ότι τόσο ο φυσικού τύπου υποδοχέας όσο και οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς επάγουν διφασικά την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK σε χρόνο 5 και 15 λεπτών. (**Εικόνα 4.24**). Η προσθήκη του αναστολέα 2-Br δεν απέτρεψε την ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού (**Εικόνα 4.25**). Αξίζει να σημειωθεί ότι η επίδραση αυτή ήταν ειδική για το μονοπάτι των MAPK, δεδομένου ότι δεν υπήρξε ουσιώδης διαφορά στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI_3K, τόσο στην παρουσία όσο και στην απουσία του αναστολέα 2-Br (**Εικόνες 4.26 και 4.27**).



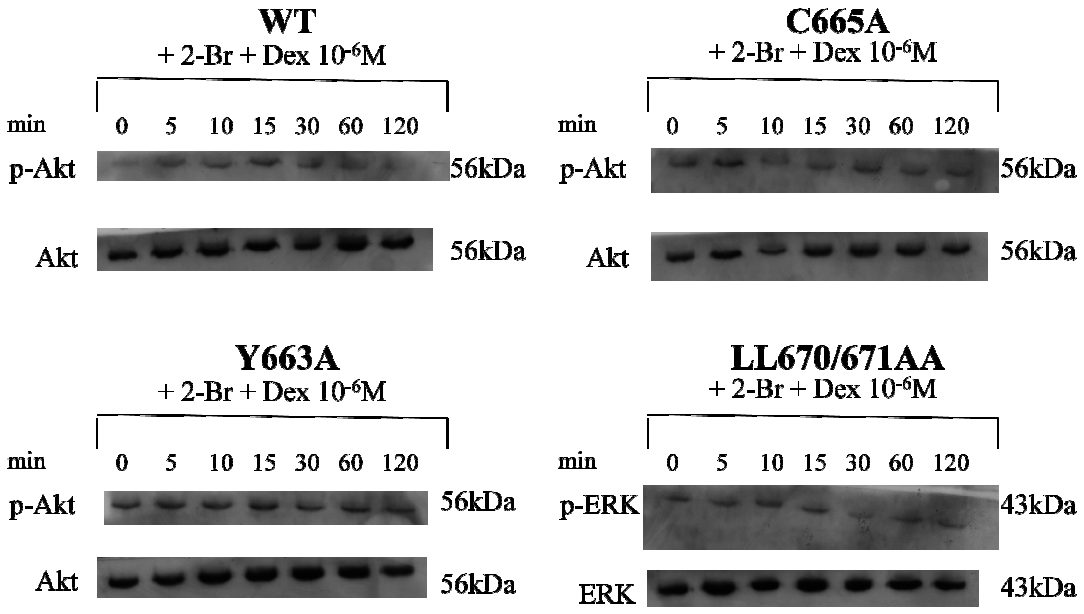
Εικόνα 4.24: Στύπωμα κατά Western στο οποίο απεικονίζεται η ενεργοποίηση της ERK σε κύτταρα διαμολυνθέντα με τον φυσικού τύπου υποδοχέα και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς μετά από έκθεση σε δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M σε διαφορετικούς χρόνους.



Εικόνα 4.25: Στύπωμα κατά Western στο οποίο απεικονίζεται η ενεργοποίηση της ERK σε κύτταρα διαμολυνθέντα με τον φυσικού τύπου υποδοχέα και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς μετά από επώαση με τον αναστολέα της παλμιτυλίωσης 2-Br και ακολούθως μετά από έκθεση σε δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M σε διαφορετικούς χρόνους.



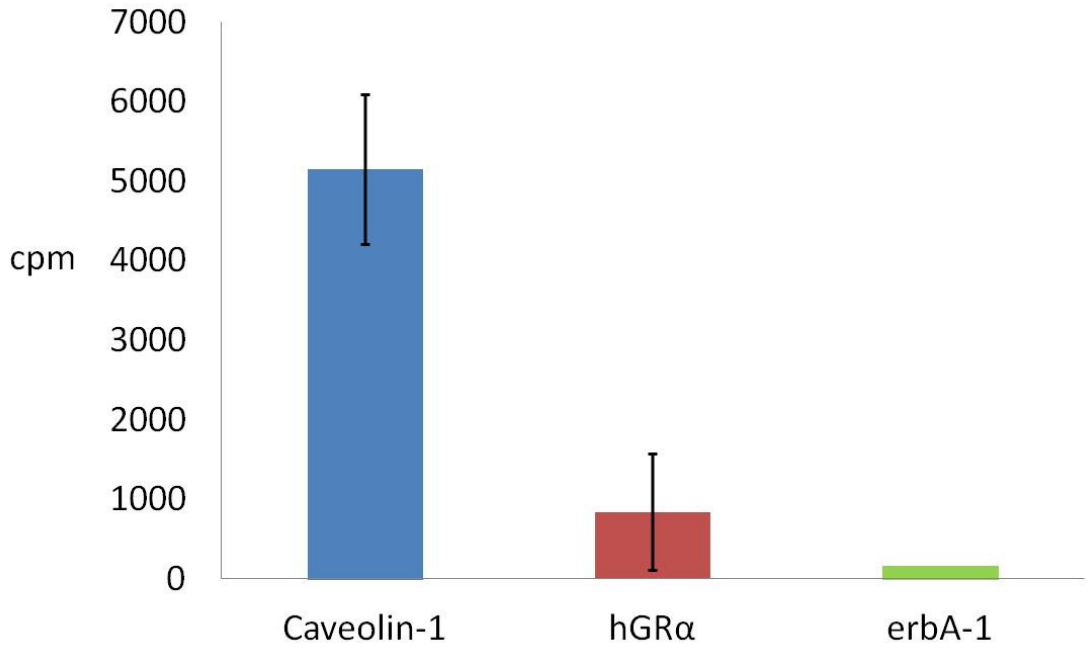
Εικόνα 4.26: Στύπωμα κατά Western στο οποίο απεικονίζεται η ενεργοποίηση της PI_3K σε κύτταρα διαμολυνθέντα με τον φυσικού τύπου υποδοχέα και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς μετά από έκθεση σε δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M σε διαφορετικούς χρόνους.



Εικόνα 4.27: Στύπωμα κατά Western στο οποίο απεικονίζεται η ενεργοποίηση της PI_3K σε κύτταρα διαμολυνθέντα με τον φυσικού τύπου υποδοχέα και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς μετά από επώαση με τον αναστολέα της παλμιτυλίωσης 2-Br για 24 ώρες και ακολούθως μετά από έκθεση σε δεξαμεθαζόνη 10^{-6}M σε διαφορετικούς χρόνους.

4.8 Ο hGRα δεν υφίσταται παλμιτυλίωση.

Για τις μελέτες παλμιτυλίωσης, χρησιμοποιήσαμε ως θετικό πρότυπο την καβεολίνη-1, η οποία υφίσταται παλμιτυλίωση. Ως αρνητικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε ο erbA^{-1} , ο οποίος δεν υφίσταται παλμιτυλίωση. Οι τιμές cpm για τον φυσικού τύπου υποδοχέα εμπίπτουν στις αντίστοιχες τιμές του αρνητικού προτύπου, αποτέλεσμα το οποίο δείχνει ότι ο hGRα δεν υφίσταται παλμιτυλίωση (**Εικόνα 4.28**).



Εικόνα 4.28: Η ενδογενής καβεολίνη-1 υφίσταται παλμιτυλίωση. Οι τιμές ενσωμάτωσης παλμιτικού οξέος στον hGRα εμπίπτουν στις αντίστοιχες τιμές του αρνητικού προτύπου (erbA^{-1}).

5. Συζήτηση

Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών, ως μέλη της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, ασκούν ποικίλες γενωμικές δράσεις επάγοντας ή καταστέλλοντας την έκφραση πολλών γονιδίων-στόχων. Πέραν των γενωμικών τους δράσεων, οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών επάγουν ορισμένες δράσεις εντός δευτερολέπτων ή λεπτών, οι οποίες καλούνται μη γενωμικές και δεν επηρεάζουν άμεσα και αρχικά τη γενωμική έκφραση, αλλά οδηγούν σε ταχέα αποτελέσματα, όπως την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών (Losel and Wehling, 2003). Η φύση των δράσεων αυτών, καθώς και η εμπλοκή τους σε φυσιολογικές λειτουργίες στον ανθρώπινο οργανισμό έχουν αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών ανασκόπησης (Hammes and Levin, 2007; Hammes and Levin, 2011; Levin, 2008; Levin, 2011; Levin, 2012), καθιστώντας επιβεβλημένη τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τις δράσεις αυτές.

Οι υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (GPCRs) αποτελούν κλασικό μοντέλο ταχείας σηματοδότησης με μεμβρανική έναρξη. Οι πρωτεΐνες αυτές διαθέτουν μια αλληλουχία αμινοξέων FX6LL, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η οποία ευθύνεται για την έξοδο των υποδοχέων από το ενδοπλασματικό δίκτυο και την επακόλουθη μετανάστευσή τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Duvernay et al., 2004). Κατ' αντιστοιχία προς τους GPCRs, ένα όμοιο, υψηλά συντηρημένο μοτίβο εννέα αμινοξέων εντοπίζεται στην περιοχή σύνδεσης όλων των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών με τον οικείο τους προσδέτη. Σε αντίθεση με την αλληλουχία FX6LL, το τρίτο αμινοξύ είναι κυστεΐνη, με εξαίρεση τον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών (Marino and Ascenzi, 2006; Pedram et al., 2007). Σε σχετικά πρόσφατες μελέτες, δείχθηκε ότι το μοτίβο αυτό διαμεσολαβεί την αγκυροβόληση των υποδοχέων των οιστρογόνων τύπου α και β, των υποδοχέων της προγεστερόνης και του υποδοχέα των ανδρογόνων στην κυτταρική μεμβράνη μέσω προσθήκης παλμιτικού οξέος στο υψηλά συντηρημένο κατάλοιπο της κυστεΐνης του μοτίβου αυτού. Η παλμιτυλίωση των υποδοχέων αυτών διευκόλυνε την αλληλεπίδραση με την καβεολίνη-1, πρωτεΐνη με σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση που ξεκινά από περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης που είναι πλούσιες σε χοληστερόλη (lipid rafts), καθώς και την έναρξη μοριακών μονοπατιών ταχείας σηματοδότησης, όπως των MAPK και της PI_3K (Pedram et al., 2007). Με δεδομένο ότι το μοτίβο αυτό είναι παρόν και στην LBD του hGRα (663**YLCMKTLLL**671) και συγκεντρώνει ένα από τα

πιο υψηλά σκορ πρόβλεψης θέσεων παλμιτυλίωσης, σύμφωνα με το CSS-Palm, υποθέσαμε ότι ενδέχεται να αποτελεί την αλληλουχία παλμιτυλίωσης του hGRα και κατ' επέκταση η παλμιτυλίωση να αποτελεί ένα από τους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν τις μη γενωμικές ταχείες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών.

Προκειμένου να μελετήσουμε την εμπλοκή του μοτίβου 663**YLCMKTLLL**671 στις μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών, πραγματοποιήσαμε σημειακή κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, προκειμένου να αντικαταστήσουμε την τυροσίνη με αλανίνη στη θέση 663 (hGRαY663A), την κυστεΐνη με αλανίνη στη θέση 665 (hGRαC665A) και τις λευκίνες με αλανίνες στις θέσεις 670 και 671 (hGRαLL670/671AA). Η κυστεΐνη στη θέση 665 επιλέχθηκε ως η πιθανή θέση παλμιτυλίωσης, ενώ η τυροσίνη στη θέση 663 και οι λευκίνες στις θέσεις 670 και 671 επιλέχθηκαν, διότι τα αμινοξέα αυτά αποδείχθηκε ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των υπολοίπων υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, που υφίστανται παλμιτυλίωση, με τα ένζυμα που καταλύουν τη μετα-μεταφραστική αυτή τροποποίηση (Pedram et al., 2007).

Οι μελέτες της διδακτορικής διατριβής αυτής ξεκίνησαν με τη διερεύνηση των γενωμικών δράσεων των υποδοχέων hGRαY663A, hGRαC665A και hGRαLL670/671AA υλοποιώντας δοκιμασίες ενεργοποίησης. Δείξαμε ότι συγκριτικά με τον hGRαWT, οι υποδοχείς hGRαC665A και hGRαLL670/671AA παρουσιάζουν ελαττωμένη ικανότητα ενεργοποίησης του υποκινητή του MMTV σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης (< 10^{-6}M) και την ίδια ικανότητα ενεργοποίησης του υποκινητή αυτού σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης (10^{-6}M, 10^{-5}M). Ο υποδοχέας hGRαY663A παρουσίασε ελάττωση της ικανότητας ενεργοποίησης του υποκινητή MMTV σε όλες τις συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης. Το αποτέλεσμα αυτό προέκυψε μετά από διόρθωση των σχετικών ενεργοτήτων λουσιφεράσης λαμβάνοντας υπόψη την πρωτεϊνική έκφραση των μεταλλαγμένων υποδοχέων σε σχέση με τον hGRαWT. Πραγματοποιήσαμε στύπωμα κατά Western σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα CV-1 και COS-7 κυττάρων, τα οποία δεν εκφράζουν ενδογενώς τον GR και τα οποία διαμολύναμε με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς και με τον hGRαWT. Δείξαμε ότι ο υποδοχέας hGRαC665A εμφανίζει αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση σε σχέση με τον

hGRαWT, ο υποδοχέας hGRαY663A εμφανίζει μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση και ο υποδοχέας hGRαLL670/671AA παρουσιάζει συγκριτικά όμοια έκφραση με τον hGRαWT. Η διαφορετική πρωτεϊνική έκφραση των μεταλλαγμένων υποδοχέων θα μπορούσε να αποδοθεί σε άλλοτε άλλου βαθμού μεταγραφή του πλασμιδίου ή μετάφραση του mRNA ή σε αποδόμηση των μεταλλαγμένων υποδοχέων σε επίπεδο πρωτεΐνης.

Προκειμένου να μελετήσουμε τη μετανάστευση του μεταλλαγμένου υποδοχέα hGRαC665A από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα μετά από έκθεση στη δεξαμεθαζόνη, πραγματοποιήσαμε μελέτες μετατόπισης στον πυρήνα (nuclear translocation studies) σε HeLa κύτταρα, τα οποία διαμολύναμε με το πλασμίδιο pF25GFPhGRαWT ή pF25GFPhGRαC665A. Σε απουσία δεξαμεθαζόνης τόσο ο hGRαWT όσο και ο hGRαC665A εντοπίζονταν κατεξοχήν στο κυτταρόπλασμα. Η επώαση των κυττάρων με δεξαμεθαζόνη είχε ως αποτέλεσμα τη μετανάστευση του hGRαWT στον πυρήνα εντός 15 λεπτών, ενώ, στην περίπτωση του hGRαC665A, η μετανάστευση ολοκληρώθηκε σε 36 λεπτά. Η κατά 2,5 φορές καθυστέρηση της μετανάστευσης του hGRαC665A από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα θα μπορούσε να αποδοθεί στην αλλαγή της στερεοδομής της αλληλουχίας που ευθύνεται για τη μετανάστευση του hGR στον πυρήνα (NL1) λόγω της μετάλλαξης στη θέση 665. Το αποτέλεσμα αυτό ταυτίζεται πλήρως με αποτελέσματα από μελέτες λειτουργικού χαρακτηρισμού μεταλλάξεων στο γονίδιο *hGR* που κωδικοποιούν αμινοξέα στη LBD του hGR σε ασθενείς με σύνδρομο πρωτοπαθούς γενικευμένης αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή (Σύνδρομο Χρούσος) (Charmandari, 2011; Charmandari, 2012; Charmandari and Kino, 2010; Charmandari et al., 2013; Charmandari et al., 2008; Nicolaides et al., 2010). Στις δοκιμασίες μετατόπισης στον πυρήνα, οι παθολογικοί υποδοχείς, λόγω μετάλλαξης στη LBD του hGRα, εμφάνιζαν στατιστικά σημαντική καθυστέρηση στη μετανάστευσή τους στον πυρήνα, λόγω διαταραχής της αλληλουχίας NL1 και κατά συνέπεια του μηχανισμού που διαμεσολαβεί τη μετανάστευση αυτή (Charmandari et al., 2007; Charmandari et al., 2006; Charmandari et al., 2005). Αντίθετα, μεταλλάξεις σε άλλες περιοχές, πλην της LBD του hGR, φαίνεται να μην επηρεάζουν τη μετανάστευση από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα μετά από

έκθεση στην ίδια συγκέντρωση δεξαμεθαζόνης (Charmandari et al., 2008; Charmandari et al., 2008; Nicolaides et al., 2010; Roberts et al., 2013).

Η διερεύνηση της μεμβρανικής εντόπισης του hGRα πραγματοποιήθηκε με πειράματα ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σε κύτταρα COS-7, τα οποία δεν εκφράζουν ενδογενώς τον hGR και τα οποία διαμολύναμε με τον hGRαWT και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς. Δείξαμε ότι σε απουσία δεξαμεθαζόνης ο hGRαWT εντοπίζεται στη μεμβράνη σε ποσοστό 12% και στο κυτταρόπλασμα σε ποσοστό 100% των καταμετρηθέντων κυττάρων που εμφάνιζαν σήμα. Η επώαση των κυττάρων με δεξαμεθαζόνη για 2 ώρες είχε ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του hGRαWT στον πυρήνα και την εμφάνιση αποκλειστικά πυρηνικού σήματος (ποσοστό 100%). Προκειμένου να εξετάσουμε εάν η παλμιτυλίωση επηρεάζει τη μεμβρανική εντόπιση του hGRαWT, εκθέσαμε τα διαμολυνθέντα COS-7 κύτταρα στον αναστολέα της παλμιτυλίωσης 2-βρωμοπαλμιτικό για 150 λεπτά και ακολούθως υλοποιήσαμε το πρωτόκολο του ανοσοφθορισμού. Παρατηρήσαμε μεμβρανική εντόπιση του hGRαWT στο ίδιο ποσοστό (12%), αποτέλεσμα το οποίο δείχνει ότι η επώαση των κυττάρων με το 2-βρωμοπαλμιτικό δεν απέτρεψε τη μεμβρανική εντόπιση του hGRαWT. Παρόμοιες εικόνες μεμβρανικής εντόπισης παρατηρήσαμε και στα COS-7 κύτταρα, τα οποία διαμολύνθηκαν με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς hGRαY663A, hGRαC665A και hGRαLL670/671AA, σε ποσοστά 13%, 11% και 10%, αντίστοιχα. Η επώαση των κυττάρων με το 2-βρωμοπαλμιτικό δεν απέτρεψε τη μεμβρανική εντόπιση, ενώ η επώαση με δεξαμεθαζόνη (με ή χωρίς τον αναστολέα) είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση σήματος αποκλειστικά στον πυρήνα. Η εντόπιση στην κυτταρική μεμβράνη του hGRαWT μετά την επώαση των κυττάρων με το 2-βρωμοπαλμιτικό είναι μια πρώτη ένδειξη ότι η παλμιτυλίωση δεν διαμεσολαβεί την αγκυροβόληση του hGRα στη μεμβράνη των κυττάρων. Οι παρόμοιες εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας των κυττάρων που διαμολύνθηκαν με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, δείχνουν ότι το μοτίβο δεν διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη μεμβρανική εντόπιση του hGRα. Το αποτέλεσμα αυτό, αν και αρνητικό, είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα της πρόσφατα δημοσιευμένης μελέτης της ομάδας DeFranco, η οποία μελέτησε τις μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών στην ενδοκυττάρια επικοινωνία μέσω

χασματοσυνδέσεων και στον πολλαπλασιασμό των προγονικών νευρικών κυττάρων (Samarasinghe et al., 2011). Σε μια προσπάθεια διαλεύκανσης των μοριακών μηχανισμών των μη γενωμικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών επί της connexin-43 στις χασματοσυνδέσεις, μελετήθηκε η μεμβρανική εντόπιση του hGRαWT και του hGRαC665A σε Chinese Hamster Ovary (CHO) κύτταρα με ανοσοφθορισμό και διαπιστώθηκε ότι η μετάλλαξη στη θέση 665 δεν αποτρέπει την εντόπιση του hGRα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Samarasinghe et al., 2011).

Τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού και της συνεστιακής μικροσκοπίας επιβεβαιώθηκαν με πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης στην ίδια κυτταρική σειρά. Τα κυτταροπλασματικά, μεμβρανικά και πυρηνικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε στύπωμα κατά Western με αντίσωμα έναντι του hGR. Παρατηρήσαμε έκφραση του hGRα σε όλα τα μεμβρανικά εκχυλίσματα, αποτέλεσμα το οποίο επιβεβαιώνει τη μεμβρανική εντόπιση του hGRα στα COS-7 κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τον hGRαWT στην παρουσία ή απουσία του 2-βρωμοπαλμιτικού ή με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς. Τόσο τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού όσο και της υποκυτταρικής κλασμάτωσης επιβεβαιώνουν για ακόμη μια φορά τη μεμβρανική εντόπιση του hGRα. Με δεδομένο ότι η έκφραση του hGRα στα μεμβρανικά εκχυλίσματα εντοπίζεται στα 95kDa, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για τον κλασικό hGR, ο οποίος εντοπίζεται πρωτίστως στο κυτταρόπλασμα και δευτερευόντως σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα (πυρήνας, κυτταροπλασματική μεμβράνη) στην απουσία δεξαμεθαζόνης. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι παρατηρείται εντόπιση του hGRα και στον πυρήνα, παρά το γεγονός ότι τα κύτταρα δεν εκτέθηκαν σε δεξαμεθαζόνη. Μέχρι πρότινος, πιστεύαμε ότι το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην παρουσία στεροειδών στο θρεπτικό υλικό στο οποίο καλλιεργούνται οι κυτταρικές σειρές. Μια σχετικά πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η μεγάλη ετερογένεια που παρατηρείται στην κυτταρική εντόπιση του hGRα οφείλεται στη φάση του κυτταρικού κύκλου (Matthews et al., 2011). Κύτταρα τα οποία βρίσκονταν στη μεσόφαση παρουσίαζαν δραματική είσοδο του hGRα στον πυρήνα, ενώ παρατηρήθηκε ταχεία έξοδος του hGRα από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα κατά την έναρξη της μίτωσης και μέχρι την πρώιμη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου (Matthews et al., 2011). Τα συμπεράσματα της μελέτης αυτής θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν τη

μεγάλη ετερογένεια της κυτταρικής εντόπισης του hGRα στα κυτταροπλασματικά, πυρηνικά και ενδεχομένως στα μεμβρανικά εκχυλίσματα, δεδομένου ότι η κυτταρική σειρά στην οποία είχαν υλοποιηθεί τα πειράματα δεν ήταν συγχρονισμένη σε συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου.

Σε συνέχεια της διερεύνησης του ρόλου του μοτίβου 663**YLCMKTLLL**671 στις μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών, μελετήσαμε τον συνεντοπισμό του hGRα με την καβεολίνη-1 με πειράματα διπλού ανοσοφθορισμού. Δείξαμε ότι ο hGRαWT συνεντοπίζεται με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σε ποσοστό 12%. Η επώαση των κυττάρων με το 2-βρωμοπαλμιτικό δεν απέτρεψε τον συνεντοπισμό των δύο πρωτεϊνών (ποσοστό συνεντοπισμού 12%), αποτέλεσμα το οποίο δείχνει ότι η παλμιτυλίωση δεν εμπλέκεται στον συνεντοπισμό αυτό. Οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς hGRαY663A, hGRαC665A και hGRαLL670/671AA συνεντοπίζονται με την καβεολίνη-1 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη σε ποσοστά συγκρίσιμα τόσο μεταξύ τους όσο και με τον hGRαWT (ποσοστά 13%, 11% και 10%, αντίστοιχα). Κατά συνέπεια, το μοτίβο αυτό δεν εμπλέκεται στον συνεντοπισμό των δύο πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα του διπλού ανοσοφθορισμού αποτελούν μία ακόμη επιβεβαίωση της μεμβρανικής εντόπισης του hGRα, δεδομένης της γνωστής από τη βιβλιογραφία μεμβρανικής εντόπισης της καβεολίνης-1 στις περιοχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που είναι πλούσιες σε χοληστερόλη (lipid rafts) και από τις οποίες εκκινούν ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια μεμβρανικής έναρξης (Cohen et al., 2004; Parat, 2009; Sud et al., 2010). Ταυτόχρονα, τα αποτελέσματα αυτά συμπληρώνουν την ήδη γνωστή αλληλεπίδραση της καβεολίνης-1 με τον hGRα. Είναι γνωστό ότι η καβεολίνη-1 αλληλεπιδρά με τον ERα, ERβ, PR και AR (Marino et al., 2006; Pedram et al., 2007; Sud et al., 2010), όπως επίσης και με τον hGRα (Matthews et al., 2008; Samarasinghe et al., 2011). Η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται ότι αποτελεί κομβικό σημείο έναρξης της σηματοδότησης μη γενωμικών δράσεων των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών. Συμπερασματικά, στα πειράματα αυτά παρατηρήσαμε συνεντοπισμό των δύο πρωτεϊνών, ο οποίος δεν επηρεάζεται από την παλμιτυλίωση ούτε από το μοτίβο 663**YLCMKTLLL**671.

Προκειμένου να μελετήσουμε το ρόλο του μοτίβου 663**YLCMKTLLL**671 στην ενεργοποίηση ταχέων σηματοδοτικών μονοπατιών, προχωρήσαμε σε μελέτες

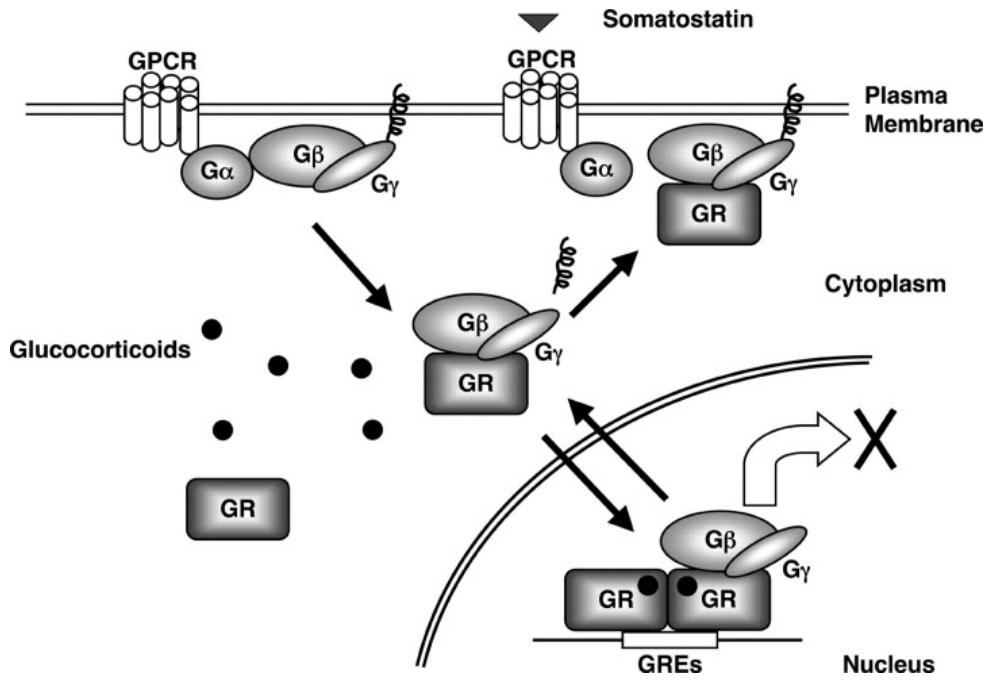
ενεργοποίησης δύο μοριακών οδών: των MAPK και της PI_3K. Τα δύο συγκεκριμένα μονοπάτια επελέγησαν με δεδομένο ότι το αντίστοιχο μοτίβο παλμιτυλίωσης στους υποδοχείς ERα, ERβ, PR και AR επηρεάζει την ενεργοποίηση των οδών αυτών. Οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς στις θέσεις -2, 0 και +5/+6 σε σχέση με την κυστεΐνη, η οποία αποτελεί τη θέση παλμιτυλίωσης των υποδοχέων αυτών, μείωσαν την ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών σε χρόνους εντός 15 λεπτών (ταχείες δράσεις) (Pedram et al., 2007). Στην περίπτωση του ERα, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από την ομάδα Marino (Acconcia et al., 2005; Acconcia et al., 2004; Marino et al., 2006). Στις μελέτες που υλοποιήσαμε δείξαμε ότι ο hGRαWT επάγει διφασικά την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAPK σε χρόνους 5 και 15 λεπτών (ταχείες δράσεις) μετά από έκθεση των κυττάρων σε δεξαμεθαζόνη. Η ίδια διφασική ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού παρατηρήθηκε μετά από ενεργοποίηση των μεταλλαγμένων υποδοχέων hGRαY663A, hGRαC665A και hGRαLL670/671AA με την ίδια συγκέντρωση δεξαμεθαζόνης, όπως φαίνεται από την αύξηση της έντασης του σήματος της p-ERK σε χρόνους 5 και 15 λεπτών. Η επώαση των διαμολυνθέντων κυττάρων με το 2-βρωμοπαλμιτικό δεν απέτρεψε τη διφασική ενεργοποίηση των MAPK. Όσον αφορά στο μονοπάτι της PI_3K, δεν παρατηρήσαμε αύξηση της έντασης του σήματος της p-Akt μετά από ενεργοποίηση του hGRαWT και των μεταλλαγμένων υποδοχέων με δεξαμεθαζόνη. Χωρίς μεταβολή ήταν και τα αποτελέσματα μετά από προηγηθείσα επώαση των κυττάρων με το 2-βρωμοπαλμιτικό. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το υπό εξέταση μοτίβο δεν επηρεάζει τις ταχείες μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών και συμπληρώνει την εικόνα των προηγούμενων αρνητικών αποτελεσμάτων. Τόσο η εντόπιση στο κύτταρο όσο και οι ταχείες δράσεις μέσω ενεργοποίησης του hGRα από τη δεξαμεθαζόνη δεν επηρεάζονται από την παλμιτυλίωση, ούτε και από τις θέσεις του μοτίβου που εξετάζονται στη διδακτορική διατριβή αυτή. Παρά το γεγονός ότι η ομάδα DeFranco μελέτησε τις ταχείες μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών στις χασματοσυνδέσεις των προγονικών νευρικών κυττάρων, τα αποτελέσματά τους περιορίστηκαν στην ενεργοποίηση της ERK από τον hGRαWT και όχι από τον μεταλλαγμένο υποδοχέα στη θέση 665, όπως στην αναφερθείσα περίπτωση της μεμβρανικής εντόπισης με πείραμα ανοσοφθορισμού (Samarasinghe et al., 2011).

5. Συζήτηση

Προκειμένου να εξετάσουμε το ενδεχόμενο παλμιτυλίωσης του hGRα, πραγματοποιήσαμε μελέτες παλμιτυλίωσης ακολουθώντας το πρωτόκολο της μεταβολικής σήμανσης των κυττάρων (metabolic labelling) με ραδιενεργά σημασμένο παλμιτικό οξύ. Για το σκοπό αυτό, επιλέξαμε ως θετικό μάρτυρα την ενδογενή καβεολίνη-1, η οποία είναι γνωστό ότι υφίσταται παλμιτυλίωση (Parat and Fox, 2001; Parat et al., 2002) και η οποία έχει επιλεγεί ως θετικός μάρτυρας στο ίδιο πρωτόκολο μεταβολικής σήμανσης για τη μελέτη παλμιτυλίωσης του ERα (Acconcia et al., 2005; Acconcia et al., 2004). Ως αρνητικό μάρτυρα επιλέξαμε το πλασμίδιο erbA^{-1}, το οποίο εκφράζει ανάστροφα τον θυρεοειδικό υποδοχέα και δεν παλμιτυλιώνεται. Τα κύτταρα (διαμολυνθέντα και μη διαμολυνθέντα) εκτέθηκαν για 2 ώρες σε 9,10-^{3}H(N) παλμιτικό οξύ (0,1mCi/mL) και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς καβεολίνης-1 με το αντίστοιχο αντίσωμα, ενώ η ανοσοκατακρήμνιση του hGRαWT και του erbA^{-1} πραγματοποιήθηκε με αντίσωμα έναντι του hGRα. Ακολούθησε μέτρηση της β-ραδιενέργειας στις εκλούσεις των δειγμάτων. Δείξαμε ότι η καβεολίνη-1 ενσωματώνει το ραδιενεργό παλμιτικό οξύ, ενώ η αντίστοιχη ενσωμάτωση στον hGRαWT εμπίπτει στις τιμές cpm του αρνητικού μάρτυρα erbA^{-1}. Από το αποτέλεσμα της μελέτης αυτής συμπεραίνουμε ότι ο hGRα δεν υφίσταται παλμιτυλίωση. Το αρνητικό αυτό αποτέλεσμα ερμηνεύει την απουσία διαφορών μεταξύ του hGRαWT και των μεταλλαγμένων υποδοχέων hGRαY663A, hGRαC665A και hGRαLL670/671AA στη μεμβρανική εντόπιση, στον συνεντοπισμό με την καβεολίνη-1 στην κυτταρική μεμβράνη και στις ταχείες μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών μέσω ενεργοποίησης των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK και PI_3K. Οι θέσεις των μεταλλάξεων στο υπό εξέταση μοτίβο είχαν επιλεγεί με βάση την υπόθεση ότι η κυστεΐνη στη θέση 665 θα υφίστατο παλμιτυλίωση, ενώ η τυροσίνη στη θέση 663 και οι λευκίνες στις θέσεις 670 και 671 θα διαδραμάτιζαν ρόλο στη σύνδεση του hGRα με τις PATs. Επιπρόσθετα, είχαμε υποθέσει ότι η ενδεχόμενη παλμιτυλίωση του hGRα θα ήταν σημαντική για τη μεμβρανική εντόπιση του hGRα, για τον συνεντοπισμό του με την καβεολίνη-1 και για τις ταχείες μη γενωμικές δράσεις. Το αρνητικό αποτέλεσμα της παλμιτυλίωσης του hGRα καταρρίπτει όλες τις πιο πάνω υποθέσεις και συμφωνεί απολύτως με την διαπίστωση της ομάδας DeFranco, η οποία αν και διαπιστώνει την εμπλοκή των μεμβρανικών GRs στις μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών, εντούτοις

διατυπώνει την άποψη ότι ο GR δεν υφίσταται παλμιτυλίωση, τουλάχιστον στα νευρικά προγονικά κύτταρα και ενδεχομένως να χρησιμοποιεί άλλο μοριακό μηχανισμό για τη διαμεσολάβηση των δράσεων αυτών (Samarasinghe et al., 2011). Προκειμένου να στηρίξουν την άποψη αυτή, οι συγγραφείς της πρωτότυπης δημοσίευσης αυτής αναφέρουν ως παράδειγμα τον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών, ο οποίος, παρά το γεγονός ότι δεν διαθέτει το μοτίβο παλμιτυλίωσης στην LBD, ασκεί μη γενωμικές δράσεις (Samarasinghe et al., 2011).

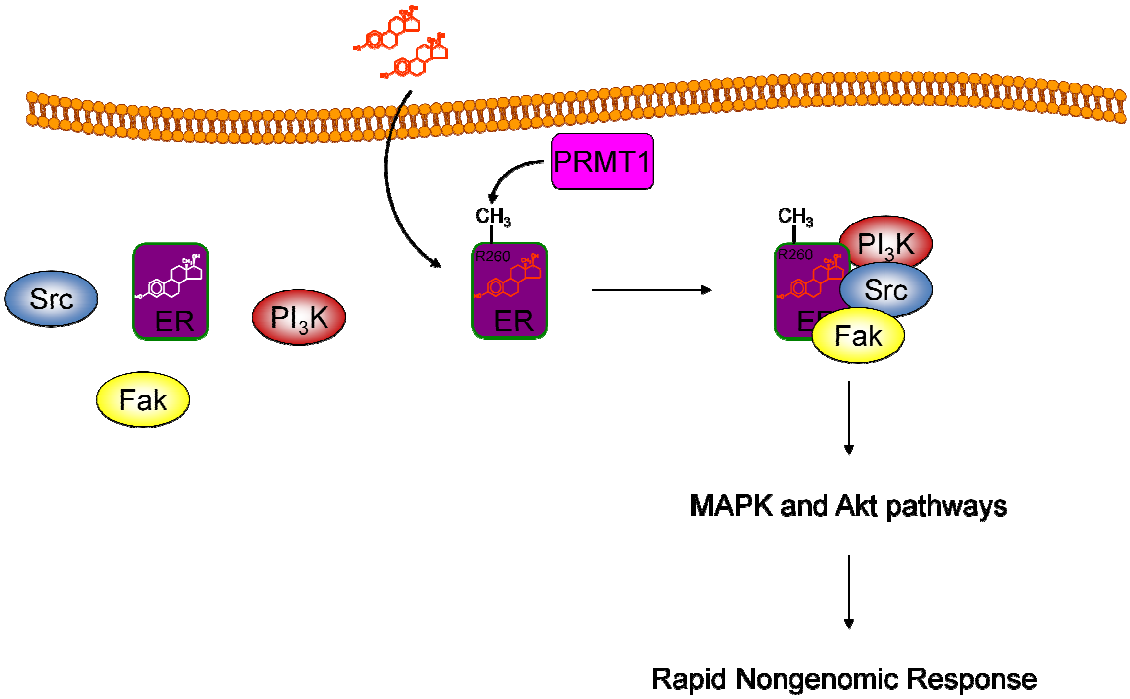
Τόσο από τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής αυτής, όσο και από τα ευρήματα της ομάδας DeFranco (Samarasinghe et al., 2011) φαίνεται ότι ο hGRα δεν υφίσταται παλμιτυλίωση. Αν και ο hGRα διαθέτει το μοτίβο παλμιτυλίωσης μεταξύ των αμινοξέων 663 και 671 στην LBD και παρά το γεγονός ότι η θέση 665 καταλαμβάνεται από κυστεΐνη στην υψηλά ομόλογη αυτή αλληλουχία, η υπόθεση της παλμιτυλίωσης του hGRα καταρρίπτεται. Με δεδομένη την απουσία της αγκυροβόλησης του hGRα στην κυτταρική μεμβράνη μέσω παλμιτικού οξέος, αυτή καθ' εαυτή η μεμβρανική εντόπιση του hGRα παραμένει επιστημονικό ερώτημα ιδιαίτερου ενδιαφέροντος με άγνωστο, μέχρι στιγμής, μηχανισμό. Ενδεχομένως, η αλληλεπίδραση του hGRα με άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ή με πρωτεΐνες που άμεσα ή έμμεσα προσδένονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη να μπορούσε να ερμηνεύσει την παρουσία του μεμβρανικού hGRα. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η αλληλεπίδραση του hGRα με τη Gβ/Gγ υπομονάδα των GPCRs (Kino et al., 2005). Κατά την ενεργοποίηση του hGRα και του GPCR με τους οικείους προσδέτες, το σύμπλοκο hGRα/Gβ/Gγ μεταναστεύει στον πυρήνα όπου η παρουσία της υπομονάδας Gβ/Gγ προκαλεί μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας του hGRα. Κατά την απουσία προσδέτη του GPCR, η ανενεργή υπομονάδα Gβ/Gγ παραμένει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον hGRα ενδέχεται να αγκυροβολεί τον τελευταίο στη μεμβράνη (**Εικόνα 5.1**)



Εικόνα 5.1: Η υπομονάδα Gβ/Gγ αλληλεπιδρά με τον hGR. Κατά την ταυτόχρονη ενεργοποίηση του hGR και του GPCR, το σύμπλοκο hGR/Gβ/Gγ μεταναστεύει στον πυρήνα και καταστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα του hGR. Το ανενεργό σύμπλοκο Gβ/Gγ εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και θα μπορούσε έμμεσα να αγκυροβολεί τον hGR στη μεμβράνη (Kino et al., 2005).

Η παλμιτυλίωση φαίνεται ότι δεν αποτελεί τον μοναδικό μοριακό μηχανισμό που διαμεσολαβεί τις μη γενωμικές δράσεις του ER. Σε μια ενδιαφέρουσα μελέτη, ο LeRomancer και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ο ERα υφίσταται παροδική μεθυλίωση στην αργινίνη στη θέση 260 στη DBD του υποδοχέα, μια νέα μετα-μεταφραστική τροποποίηση του ERα η οποία καταλύεται από την μεθυλοτρανσφεράση 1 (PRMT1) (Le Romancer et al., 2008). Η μεθυλίωση της αργινίνης στη θέση 260 είχε ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση της p85 υπομονάδας της PI_3K και της Src και την επακόλουθη αλληλεπίδρασή τους με τον μεθυλιωμένη ERα, πυροδοτώντας κατ'αυτό τον τρόπο τις ταχείες μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων μέσω των μονοπατιών της PI_3K και των MAPK (Le Romancer et al., 2008) (**Εικόνα 5.2**). Επιπρόσθετα, η μεθυλίωση της αργινίνης 260 φάνηκε να εμπλέκεται στην καρκινογένεση του μαστού, δεδομένου του αποτελέσματος της υπερμεθυλίωσης του ERα στη συγκεκριμένη αργινίνη σε μια κατηγορία καρκίνων του μαστού (Le Romancer et al., 2008). Συμπερασματικά, η μετα-

μεταφραστική αυτή τροποποίηση διαμεσολαβεί ταχείες μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων χωρίς να εμπλέκεται ο μεμβρανικός ERα και εμπλέκεται στην καρκινογένεση του μαστού (Le Romancer et al., 2011; Le Romancer et al., 2010; Le Romancer et al., 2008). Κατ' αντιστοιχία προς τον ERα, ο οποίος μελετήθηκε εκτενώς τόσο στην παλμιτυλίωση όσο και στη μεθυλίωση αργινίνης, πιθανώς άλλη ή άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις να διαμεσολαβούν τις ταχείες μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών.



Εικόνα 5.2: Η PRMT1 μεθυλιώνει παροδικά την αργινίνη στη θέση 260 στη DBD του ERα. Η αλληλεπίδραση του μεθυλιωμένου ERα με άλλες πρωτεΐνες πυροδοτεί τις ταχείες μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποδεικνύουν μέσα από μια σειρά πειραμάτων μοριακής βιολογίας ότι ο hGRα δεν παλμιτυλιώνεται. Το σύνολο των αρνητικών αποτελεσμάτων αποτελεί προσφορά προς την επιστήμη, δεδομένου ότι για πρώτη φορά διερευνήθηκε εκτενώς η υπόθεση της παλμιτυλίωσης του hGRα. Τα αρνητικά αποτελέσματα στρέφουν την επιστημονική σκέψη προς άλλη κατεύθυνση διερεύνησης των μοριακών μηχανισμών των μη γενωμικών δράσεων των

γλυκοκορτικοειδών και διατηρούν επίκαιρο το θέμα της μεμβρανικής εντόπισης του hGRα.

6. Βιβλιογραφία

Acconcia F., Ascenzi P., Bocedi A., Spisni E., Tomasi V., Trentalance A., Visca P. and Marino M. (2005) Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* 16 (1): 231-7

Acconcia F., Ascenzi P., Fabozzi G., Visca P. and Marino M. (2004) S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochem Biophys Res Commun* 316 (3): 878-83

Almlof T., Gustafsson J. A. and Wright A. P. (1997) Role of hydrophobic amino acid clusters in the transactivation activity of the human glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 17 (2): 934-45

Almlof T., Wallberg A. E., Gustafsson J. A. and Wright A. P. (1998) Role of important hydrophobic amino acids in the interaction between the glucocorticoid receptor tau 1-core activation domain and target factors. *Biochemistry* 37 (26): 9586-94

Archer T. K., Cordingley M. G., Wolford R. G. and Hager G. L. (1991) Transcription factor access is mediated by accurately positioned nucleosomes on the mouse mammary tumor virus promoter. *Mol Cell Biol* 11 (2): 688-98

Auboeuf D., Honig A., Berget S. M. and O'Malley B. W. (2002) Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science* 298 (5592): 416-9

Auphan N., DiDonato J. A., Rosette C., Helmberg A. and Karin M. (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270 (5234): 286-90

Bamberger C. M., Bamberger A. M., de Castro M. and Chrousos G. P. (1995) Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* 95 (6): 2435-41

Bamberger C. M., Schulte H. M. and Chrousos G. P. (1996) Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 17 (3): 245-61

Barnes P. J. and Karin M. (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336 (15): 1066-71

Bartholome B., Spies C. M., Gaber T., Schuchmann S., Berki T., Kunkel D., Bienert M., Radbruch A., Burmester G. R., Lauster R., Scheffold A. and Buttgereit F. (2004) Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J* 18 (1): 70-80

6. Βιβλιογραφία

Beck I. M., Vanden Berghe W., Vermeulen L., Yamamoto K. R., Haegeman G. and De Bosscher K. (2009) Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr Rev* 30 (7): 830-82

Bijlmakers M. J. and Marsh M. (2003) The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol* 13 (1): 32-42

Bledsoe R. K., Montana V. G., Stanley T. B., Delves C. J., Apolito C. J., McKee D. D., Consler T. G., Parks D. J., Stewart E. L., Willson T. M., Lambert M. H., Moore J. T., Pearce K. H. and Xu H. E. (2002) Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110 (1): 93-105

Boruk M., Savory J. G. and Hache R. J. (1998) AF-2-dependent potentiation of CCAAT enhancer binding protein beta-mediated transcriptional activation by glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 12 (11): 1749-63

Bridgham J. T., Carroll S. M. and Thornton J. W. (2006) Evolution of hormone-receptor complexity by molecular exploitation. *Science* 312 (5770): 97-101

Caldenhoven E., Liden J., Wissink S., Van de Stolpe A., Raaijmakers J., Koenderman L., Okret S., Gustafsson J. A. and Van der Saag P. T. (1995) Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 9 (4): 401-12

Cao Y., Bender I. K., Konstantinidis A. K., Shin S. C., Jewell C. M., Cidlowski J. A., Schleimer R. P. and Lu N. Z. (2013) Glucocorticoid receptor translational isoforms underlie maturational stage-specific glucocorticoid sensitivities of dendritic cells in mice and humans. *Blood* 121 (9): 1553-62

Chandran U. R., Warren B. S., Baumann C. T., Hager G. L. and DeFranco D. B. (1999) The glucocorticoid receptor is tethered to DNA-bound Oct-1 at the mouse gonadotropin-releasing hormone distal negative glucocorticoid response element. *J Biol Chem* 274 (4): 2372-8

Chang T. J., Scher B. M., Waxman S. and Scher W. (1993) Inhibition of mouse GATA-1 function by the glucocorticoid receptor: possible mechanism of steroid inhibition of erythroleukemia cell differentiation. *Mol Endocrinol* 7 (4): 528-42

Charmandari E. (2011) Primary generalized glucocorticoid resistance and hypersensitivity. *Horm Res Paediatr* 76 (3): 145-55

6. Βιβλιογραφία

Charmandari E. (2012) Primary generalized glucocorticoid resistance and hypersensitivity: the end-organ involvement in the stress response. *Sci Signal* 5 (244): pt5

Charmandari E., Chrousos G. P., Ichijo T., Bhattacharyya N., Vottero A., Souvatzoglou E. and Kino T. (2005) The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGRalpha by interfering with formation of active coactivator complexes. *Mol Endocrinol* 19 (1): 52-64

Charmandari E., Chrousos G. P., Lambrou G. I., Pavlaki A., Koide H., Ng S. S. and Kino T. (2011) Peripheral CLOCK regulates target-tissue glucocorticoid receptor transcriptional activity in a circadian fashion in man. *PLoS One* 6 (9): e25612

Charmandari E., Ichijo T., Jubiz W., Baid S., Zachman K., Chrousos G. P. and Kino T. (2008) A novel point mutation in the amino terminal domain of the human glucocorticoid receptor (hGR) gene enhancing hGR-mediated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab* 93 (12): 4963-8

Charmandari E. and Kino T. (2010) Chrousos syndrome: a seminal report, a phylogenetic enigma and the clinical implications of glucocorticoid signalling changes. *Eur J Clin Invest* 40 (10): 932-42

Charmandari E., Kino T. and Chrousos G. P. (2013) Primary generalized familial and sporadic glucocorticoid resistance (Chrousos syndrome) and hypersensitivity. *Endocr Dev* 24 67-85

Charmandari E., Kino T., Ichijo T. and Chrousos G. P. (2008) Generalized glucocorticoid resistance: clinical aspects, molecular mechanisms, and implications of a rare genetic disorder. *J Clin Endocrinol Metab* 93 (5): 1563-72

Charmandari E., Kino T., Ichijo T., Jubiz W., Mejia L., Zachman K. and Chrousos G. P. (2007) A novel point mutation in helix 11 of the ligand-binding domain of the human glucocorticoid receptor gene causing generalized glucocorticoid resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 92 (10): 3986-90

Charmandari E., Kino T., Ichijo T., Zachman K., Alatsatianos A. and Chrousos G. P. (2006) Functional characterization of the natural human glucocorticoid receptor (hGR) mutants hGRalphaR477H and hGRalphaG679S associated with generalized glucocorticoid resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 91 (4): 1535-43

Charmandari E., Raji A., Kino T., Ichijo T., Tiulpakov A., Zachman K. and Chrousos G. P. (2005) A novel point mutation in the ligand-binding domain (LBD) of the human glucocorticoid receptor (hGR) causing generalized glucocorticoid resistance:

the importance of the C terminus of hGR LBD in conferring transactivational activity. *J Clin Endocrinol Metab* 90 (6): 3696-705

Chatterjee V. K., Madison L. D., Mayo S. and Jameson J. L. (1991) Repression of the human glycoprotein hormone alpha-subunit gene by glucocorticoids: evidence for receptor interactions with limiting transcriptional activators. *Mol Endocrinol* 5 (1): 100-10

Chrousos G. P. (2004) The glucocorticoid receptor gene, longevity, and the complex disorders of Western societies. *Am J Med* 117 (3): 204-7

Chrousos G. P. (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* 5 (7): 374-81

Chrousos G. P., Charmandari E. and Kino T. (2004) Glucocorticoid action networks--an introduction to systems biology. *J Clin Endocrinol Metab* 89 (2): 563-4

Chrousos G. P. and Kino T. (2005) Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE* 2005 (304): pe48

Cohen A. W., Hnasko R., Schubert W. and Lisanti M. P. (2004) Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 84 (4): 1341-79

Cole T. J., Blendy J. A., Monaghan A. P., Krieglstein K., Schmid W., Aguzzi A., Fantuzzi G., Hummler E., Unsicker K. and Schutz G. (1995) Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 9 (13): 1608-21

Davies L., Karthikeyan N., Lynch J. T., Sial E. A., Gkourtsa A., Demonacos C. and Krstic-Demonacos M. (2008) Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol Endocrinol* 22 (6): 1331-44

de Lange P., Segeren C. M., Koper J. W., Wiemer E., Sonneveld P., Brinkmann A. O., White A., Brogan I. J., de Jong F. H. and Lamberts S. W. (2001) Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. *Cancer Res* 61 (10): 3937-41

De Martino M. U., Bhattachryya N., Alesci S., Ichijo T., Chrousos G. P. and Kino T. (2004) The glucocorticoid receptor and the orphan nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II interact with and mutually affect each other's transcriptional activities: implications for intermediary metabolism. *Mol Endocrinol* 18 (4): 820-33

6. Βιβλιογραφία

Dennis A. P. and O'Malley B. W. (2005) Rush hour at the promoter: how the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93 (2-5): 139-51

Derijk R. H., Schaaf M. J., Turner G., Datson N. A., Vreugdenhil E., Cidlowski J., de Kloet E. R., Emery P., Sternberg E. M. and Detera-Wadleigh S. D. (2001) A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28 (11): 2383-8

Dhavan R. and Tsai L. H. (2001) A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (10): 749-59

Didonato J. A., Saatcioglu F. and Karin M. (1996) Molecular mechanisms of immunosuppression and anti-inflammatory activities by glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 154 (2 Pt 2): S11-5

DuBois D. C., Sukumaran S., Jusko W. J. and Almon R. R. (2013) Evidence for a glucocorticoid receptor beta splice variant in the rat and its physiological regulation in liver. *Steroids* 78 (2): 312-20

Duma D., Jewell C. M. and Cidlowski J. A. (2006) Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102 (1-5): 11-21

Dunphy J. T. and Linder M. E. (1998) Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim Biophys Acta* 1436 (1-2): 245-61

Duvernay M. T., Zhou F. and Wu G. (2004) A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J Biol Chem* 279 (29): 30741-50

Evans R. (2004) A transcriptional basis for physiology. *Nat Med* 10 (10): 1022-6

Evans R. M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240 (4854): 889-95

Falkenstein E., Norman A. W. and Wehling M. (2000) Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab* 85 (5): 2072-5

Falkenstein E., Tillmann H. C., Christ M., Feuring M. and Wehling M. (2000) Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 52 (4): 513-56

6. Βιβλιογραφία

Faus H. and Haendler B. (2006) Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother* 60 (9): 520-8

Fu M., Liu M., Sauve A. A., Jiao X., Zhang X., Wu X., Powell M. J., Yang T., Gu W., Avantaggiati M. L., Pattabiraman N., Pestell T. G., Wang F., Quong A. A., Wang C. and Pestell R. G. (2006) Hormonal control of androgen receptor function through SIRT1. *Mol Cell Biol* 26 (21): 8122-35

Galliher-Beckley A. J. and Cidlowski J. A. (2009) Emerging roles of glucocorticoid receptor phosphorylation in modulating glucocorticoid hormone action in health and disease. *IUBMB Life* 61 (10): 979-86

Galliher-Beckley A. J., Williams J. G., Collins J. B. and Cidlowski J. A. (2008) Glycogen synthase kinase 3beta-mediated serine phosphorylation of the human glucocorticoid receptor redirects gene expression profiles. *Mol Cell Biol* 28 (24): 7309-22

Galon J., Franchimont D., Hiroi N., Frey G., Boettner A., Ehrhart-Bornstein M., O'Shea J. J., Chrousos G. P. and Bornstein S. R. (2002) Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J* 16 (1): 61-71

Gametchu B. (1987) Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: correlation to cell lysis. *Science* 236 (4800): 456-61

Gametchu B., Chen F., Sackey F., Powell C. and Watson C. S. (1999) Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids* 64 (1-2): 107-19

Gametchu B. and Watson C. S. (2002) Correlation of membrane glucocorticoid receptor levels with glucocorticoid-induced apoptotic competence using mutant leukemic and lymphoma cells lines. *J Cell Biochem* 87 (2): 133-46

Gillette T. G., Gonzalez F., Delahodde A., Johnston S. A. and Kodadek T. (2004) Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (16): 5904-9

Hafezi-Moghadam A., Simoncini T., Yang Z., Limbourg F. P., Plumier J. C., Rebsamen M. C., Hsieh C. M., Chui D. S., Thomas K. L., Prorock A. J., Laubach V. E., Moskowitz M. A., French B. A., Ley K. and Liao J. K. (2002) Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 8 (5): 473-9

Hammes S. R. and Levin E. R. (2007) Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 28 (7): 726-41

Hammes S. R. and Levin E. R. (2011) Minireview: Recent advances in extranuclear steroid receptor actions. *Endocrinology* 152 (12): 4489-95

Han J. M., Kim Y., Lee J. S., Lee C. S., Lee B. D., Ohba M., Kuroki T., Suh P. G. and Ryu S. H. (2002) Localization of phospholipase D1 to caveolin-enriched membrane via palmitoylation: implications for epidermal growth factor signaling. *Mol Biol Cell* 13 (11): 3976-88

Hartig E. and Cato A. C. (1994) In vivo binding of proteins to stably integrated MMTV DNA in murine cell lines: occupancy of NFI and OTF1 binding sites in the absence and presence of glucocorticoids. *Cell Mol Biol Res* 40 (7-8): 643-52

Hauk P. J., Hamid Q. A., Chrousos G. P. and Leung D. Y. (2000) Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens. *J Allergy Clin Immunol* 105 (4): 782-7

Heery D. M., Kalkhoven E., Hoare S. and Parker M. G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387 (6634): 733-6

Herrlich P. (2001) Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene* 20 (19): 2465-75

Hinds T. D., Jr., Ramakrishnan S., Cash H. A., Stechschulte L. A., Heinrich G., Najjar S. M. and Sanchez E. R. (2010) Discovery of glucocorticoid receptor-beta in mice with a role in metabolism. *Mol Endocrinol* 24 (9): 1715-27

Hinz B. and Hirschelmann R. (2000) Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats. *Pharm Res* 17 (10): 1273-7

Hittelman A. B., Burakov D., Iniguez-Lluhi J. A., Freedman L. P. and Garabedian M. J. (1999) Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J* 18 (19): 5380-8

Holmstrom S., Van Antwerp M. E. and Iniguez-Lluhi J. A. (2003) Direct and distinguishable inhibitory roles for SUMO isoforms in the control of transcriptional synergy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (26): 15758-63

Howard K. J., Holley S. J., Yamamoto K. R. and Distelhorst C. W. (1990) Mapping the HSP90 binding region of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 265 (20): 11928-35

Ichijo T., Voutetakis A., Cotrim A. P., Bhattachryya N., Fujii M., Chrousos G. P. and Kino T. (2005) The Smad6-histone deacetylase 3 complex silences the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor: potential clinical implications. *J Biol Chem* 280 (51): 42067-77

Imai E., Miner J. N., Mitchell J. A., Yamamoto K. R. and Granner D. K. (1993) Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. *J Biol Chem* 268 (8): 5353-6

Ismaili N. and Garabedian M. J. (2004) Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 1024 86-101

Ito K., Barnes P. J. and Adcock I. M. (2000) Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 20 (18): 6891-903

Ito K., Yamamura S., Essilfie-Quaye S., Cosio B., Ito M., Barnes P. J. and Adcock I. M. (2006) Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J Exp Med* 203 (1): 7-13

Itoh M., Adachi M., Yasui H., Takekawa M., Tanaka H. and Imai K. (2002) Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol Endocrinol* 16 (10): 2382-92

Jason L. J., Moore S. C., Lewis J. D., Lindsey G. and Ausio J. (2002) Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays* 24 (2): 166-74

Jonat C., Rahmsdorf H. J., Park K. K., Cato A. C., Gebel S., Ponta H. and Herrlich P. (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62 (6): 1189-204

Kamei Y., Xu L., Heinzel T., Torchia J., Kurokawa R., Gloss B., Lin S. C., Heyman R. A., Rose D. W., Glass C. K. and Rosenfeld M. G. (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85 (3): 403-14

Karin M. and Chang L. (2001) AP-1--glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level. *J Endocrinol* 169 (3): 447-51

Karst H., Berger S., Turiault M., Tronche F., Schutz G. and Joels M. (2005) Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of

hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (52): 19204-7

Kauppi B., Jakob C., Farnegardh M., Yang J., Ahola H., Alarcon M., Calles K., Engstrom O., Harlan J., Muchmore S., Ramqvist A. K., Thorell S., Ohman L., Greer J., Gustafsson J. A., Carlstedt-Duke J. and Carlquist M. (2003) The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. *J Biol Chem* 278 (25): 22748-54

Keller-Wood M. E. and Dallman M. F. (1984) Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5 (1): 1-24

Kim M. Y., Woo E. M., Chong Y. T., Homenko D. R. and Kraus W. L. (2006) Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Mol Endocrinol* 20 (7): 1479-93

Kino T., Charmandari E. and Chrousos G. P. (2011) Glucocorticoid receptor: implications for rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 29 (5 Suppl 68): S32-41

Kino T. and Chrousos G. P. (2002) Tissue-specific glucocorticoid resistance-hypersensitivity syndromes: multifactorial states of clinical importance. *J Allergy Clin Immunol* 109 (4): 609-13

Kino T. and Chrousos G. P. (2004) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and associated diseases. *Essays Biochem* 40 137-55

Kino T. and Chrousos G. P. (2011) Acetylation-mediated epigenetic regulation of glucocorticoid receptor activity: circadian rhythm-associated alterations of glucocorticoid actions in target tissues. *Mol Cell Endocrinol* 336 (1-2): 23-30

Kino T. and Chrousos G. P. (2011) Circadian CLOCK-mediated regulation of target-tissue sensitivity to glucocorticoids: implications for cardiometabolic diseases. *Endocr Dev* 20 116-26

Kino T., De Martino M. U., Charmandari E., Mirani M. and Chrousos G. P. (2003) Tissue glucocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85 (2-5): 457-67

Kino T., Hurt D. E., Ichijo T., Nader N. and Chrousos G. P. (2010) Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal* 3 (107): ra8

6. Βιβλιογραφία

Kino T., Ichijo T., Amin N. D., Kesavapany S., Wang Y., Kim N., Rao S., Player A., Zheng Y. L., Garabedian M. J., Kawasaki E., Pant H. C. and Chrousos G. P. (2007) Cyclin-dependent kinase 5 differentially regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through phosphorylation: clinical implications for the nervous system response to glucocorticoids and stress. *Mol Endocrinol* 21 (7): 1552-68

Kino T., Manoli I., Kelkar S., Wang Y., Su Y. A. and Chrousos G. P. (2009) Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 381 (4): 671-5

Kino T., Su Y. A. and Chrousos G. P. (2009) Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci* 66 (21): 3435-48

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

Kinyamu H. K., Chen J. and Archer T. K. (2005) Linking the ubiquitin-proteasome pathway to chromatin remodeling/modification by nuclear receptors. *J Mol Endocrinol* 34 (2): 281-97

Kumar R. and Calhoun W. J. (2008) Differential regulation of the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through site-specific phosphorylation. *Biologics* 2 (4): 845-54

Le Drean Y., Mincheneau N., Le Goff P. and Michel D. (2002) Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology* 143 (9): 3482-9

Le Romancer M., Poulard C., Cohen P., Sentis S., Renoir J. M. and Corbo L. (2011) Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev* 32 (5): 597-622

Le Romancer M., Treilleux I., Bouchekioua-Bouzaghou K., Sentis S. and Corbo L. (2010) Methylation, a key step for nongenomic estrogen signaling in breast tumors. *Steroids* 75 (8-9): 560-4

Le Romancer M., Treilleux I., Leconte N., Robin-Lespinasse Y., Sentis S., Bouchekioua-Bouzaghou K., Goddard S., Gobert-Gosse S. and Corbo L. (2008) Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 31 (2): 212-21

Levin E. R. (2008) Rapid signaling by steroid receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295 (5): R1425-30

Levin E. R. (2011) Minireview: Extranuclear steroid receptors: roles in modulation of cell functions. *Mol Endocrinol* 25 (3): 377-84

Levin E. R. (2012) Elusive extranuclear estrogen receptors in breast cancer. *Clin Cancer Res* 18 (1): 6-8

Lewis-Tuffin L. J. and Cidlowski J. A. (2006) The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1069 1-9

Liberman A. C., Druker J., Garcia F. A., Holsboer F. and Arzt E. (2009) Intracellular molecular signaling. Basis for specificity to glucocorticoid anti-inflammatory actions. *Ann N Y Acad Sci* 1153 6-13

Liberman A. C., Refojo D., Druker J., Toscano M., Rein T., Holsboer F. and Arzt E. (2007) The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. *FASEB J* 21 (4): 1177-88

Liden J., Delaunay F., Rafter I., Gustafsson J. and Okret S. (1997) A new function for the C-terminal zinc finger of the glucocorticoid receptor. Repression of RelA transactivation. *J Biol Chem* 272 (34): 21467-72

Limbourg F. P. and Liao J. K. (2003) Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor. *J Mol Med (Berl)* 81 (3): 168-74

Liu J. and DeFranco D. B. (2000) Protracted nuclear export of glucocorticoid receptor limits its turnover and does not require the exportin 1/CRM1-directed nuclear export pathway. *Mol Endocrinol* 14 (1): 40-51

Liu J. L., Papachristou D. N. and Patel Y. C. (1994) Glucocorticoids activate somatostatin gene transcription through co-operative interaction with the cyclic AMP signalling pathway. *Biochem J* 301 (Pt 3) 863-9

Loscalzo J. (1995) Nitric oxide and vascular disease. *N Engl J Med* 333 (4): 251-3

Losel R. and Wehling M. (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (1): 46-56

Lowenberg M., Verhaar A. P., Bilderbeek J., Marle J., Buttgereit F., Peppelenbosch M. P., van Deventer S. J. and Hommes D. W. (2006) Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep* 7 (10): 1023-9

6. Βιβλιογραφία

Lu N. Z. and Cidlowski J. A. (2005) Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* 18 (3): 331-42

Lu N. Z., Collins J. B., Grissom S. F. and Cidlowski J. A. (2007) Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 27 (20): 7143-60

Marino M. and Ascenzi P. (2006) Steroid hormone rapid signaling: the pivotal role of S-palmitoylation. *IUBMB Life* 58 (12): 716-9

Marino M., Ascenzi P. and Acconcia F. (2006) S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions. *Steroids* 71 (4): 298-303

Matthews L., Berry A., Ohanian V., Ohanian J., Garside H. and Ray D. (2008) Caveolin mediates rapid glucocorticoid effects and couples glucocorticoid action to the antiproliferative program. *Mol Endocrinol* 22 (6): 1320-30

Matthews L., Johnson J., Berry A., Trebble P., Cookson A., Spiller D., Rivers C., Norman M., White M. and Ray D. (2011) Cell cycle phase regulates glucocorticoid receptor function. *PLoS One* 6 (7): e22289

McKay L. I. and Cidlowski J. A. (1998) Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol* 12 (1): 45-56

McKay L. I. and Cidlowski J. A. (1999) Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 20 (4): 435-59

McKenna N. J., Lanz R. B. and O'Malley B. W. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20 (3): 321-44

McKenna N. J. and O'Malley B. W. (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108 (4): 465-74

McKenna N. J., Xu J., Nawaz Z., Tsai S. Y., Tsai M. J. and O'Malley B. W. (1999) Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69 (1-6): 3-12

Meijsing S. H., Pufall M. A., So A. Y., Bates D. L., Chen L. and Yamamoto K. R. (2009) DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* 324 (5925): 407-10

Miller A. L., Webb M. S., Copik A. J., Wang Y., Johnson B. H., Kumar R. and Thompson E. B. (2005) p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol Endocrinol* 19 (6): 1569-83

Miner J. N. and Yamamoto K. R. (1991) Regulatory crosstalk at composite response elements. *Trends Biochem Sci* 16 (11): 423-6

Moalli P. A., Pillay S., Krett N. L. and Rosen S. T. (1993) Alternatively spliced glucocorticoid receptor messenger RNAs in glucocorticoid-resistant human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 53 (17): 3877-9

Nader N., Chrousos G. P. and Kino T. (2009) Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: potential physiological implications. *FASEB J* 23 (5): 1572-83

Nader N., Chrousos G. P. and Kino T. (2010) Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol Metab* 21 (5): 277-86

Nader N., Ng S. S., Lambrou G. I., Pervanidou P., Wang Y., Chrousos G. P. and Kino T. (2010) AMPK regulates metabolic actions of glucocorticoids by phosphorylating the glucocorticoid receptor through p38 MAPK. *Mol Endocrinol* 24 (9): 1748-64

Nader N., Ng S. S., Wang Y., Abel B. S., Chrousos G. P. and Kino T. (2012) Liver x receptors regulate the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor: implications for the carbohydrate metabolism. *PLoS One* 7 (3): e26751

Nehme A., Lobenhofer E. K., Stamer W. D. and Edelman J. L. (2009) Glucocorticoids with different chemical structures but similar glucocorticoid receptor potency regulate subsets of common and unique genes in human trabecular meshwork cells. *BMC Med Genomics* 2 58

Nicolaides N. C., Galata Z., Kino T., Chrousos G. P. and Charmandari E. (2010) The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 75 (1): 1-12

Nishio Y., Isshiki H., Kishimoto T. and Akira S. (1993) A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat alpha 1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction. *Mol Cell Biol* 13 (3): 1854-62

Nissen R. M. and Yamamoto K. R. (2000) The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 14 (18): 2314-29

Oakley R. H. and Cidlowski J. A. (2011) Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* 286 (5): 3177-84

Orchinik M., Murray T. F. and Moore F. L. (1991) A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 252 (5014): 1848-51

Ortlund E. A., Bridgham J. T., Redinbo M. R. and Thornton J. W. (2007) Crystal structure of an ancient protein: evolution by conformational epistasis. *Science* 317 (5844): 1544-8

Pappas T. C., Gametchu B. and Watson C. S. (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J* 9 (5): 404-10

Parat M. O. (2009) The biology of caveolae: achievements and perspectives. *Int Rev Cell Mol Biol* 273 117-62

Parat M. O. and Fox P. L. (2001) Palmitoylation of caveolin-1 in endothelial cells is post-translational but irreversible. *J Biol Chem* 276 (19): 15776-82

Parat M. O., Stachowicz R. Z. and Fox P. L. (2002) Oxidative stress inhibits caveolin-1 palmitoylation and trafficking in endothelial cells. *Biochem J* 361 (Pt 3): 681-8

Patterson S. I. (2002) Posttranslational protein S-palmitoylation and the compartmentalization of signaling molecules in neurons. *Biol Res* 35 (2): 139-50

Pedram A., Razandi M., Deschenes R. J. and Levin E. R. (2012) DHHC-7 and -21 are palmitoylacyltransferases for sex steroid receptors. *Mol Biol Cell* 23 (1): 188-99

Pedram A., Razandi M., Kim J. K., O'Mahony F., Lee E. Y., Luderer U. and Levin E. R. (2009) Developmental phenotype of a membrane only estrogen receptor alpha (MOER) mouse. *J Biol Chem* 284 (6): 3488-95

Pedram A., Razandi M., O'Mahony F., Harvey H., Harvey B. J. and Levin E. R. (2013) Estrogen reduces lipid content in the liver exclusively from membrane receptor signaling. *Sci Signal* 6 (276): ra36

Pedram A., Razandi M., Sainson R. C., Kim J. K., Hughes C. C. and Levin E. R. (2007) A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem* 282 (31): 22278-88

Perkins N. D. (2000) The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci* 25 (9): 434-40

Philips A., Maira M., Mullick A., Chamberland M., Lesage S., Hugo P. and Drouin J. (1997) Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol Cell Biol* 17 (10): 5952-9

Pierreux C. E., Stafford J., Demonte D., Scott D. K., Vandenhaute J., O'Brien R. M., Granner D. K., Rousseau G. G. and Lemaigre F. P. (1999) Antiglucocorticoid activity of hepatocyte nuclear factor-6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (16): 8961-6

Pratt W. B. (1993) The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268 (29): 21455-8

Prefontaine G. G., Lemieux M. E., Giffin W., Schild-Poulter C., Pope L., LaCasse E., Walker P. and Hache R. J. (1998) Recruitment of octamer transcription factors to DNA by glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 18 (6): 3416-30

Presul E., Schmidt S., Kofler R. and Helmberg A. (2007) Identification, tissue expression, and glucocorticoid responsiveness of alternative first exons of the human glucocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol* 38 (1-2): 79-90

Razandi M., Pedram A. and Levin E. R. (2010) Heat shock protein 27 is required for sex steroid receptor trafficking to and functioning at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 30 (13): 3249-61

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

Reichardt H. M., Tuckermann J. P., Gottlicher M., Vujic M., Weih F., Angel P., Herrlich P. and Schutz G. (2001) Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 20 (24): 7168-73

Reily M. M., Pantoja C., Hu X., Chinenov Y. and Rogatsky I. (2006) The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. *EMBO J* 25 (1): 108-17

Resh M. D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1451 (1): 1-16

6. Βιβλιογραφία

Rhen T. and Cidlowski J. A. (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353 (16): 1711-23

Rivers C., Levy A., Hancock J., Lightman S. and Norman M. (1999) Insertion of an amino acid in the DNA-binding domain of the glucocorticoid receptor as a result of alternative splicing. *J Clin Endocrinol Metab* 84 (11): 4283-6

Roberts M. L., Kino T., Nicolaides N. C., Hurt D. E., Katsantoni E., Sertedaki A., Komianou F., Kassiou K., Chrousos G. P. and Charmandari E. (2013) A novel point mutation in the DNA-binding domain (DBD) of the human glucocorticoid receptor causes primary generalized glucocorticoid resistance by disrupting the hydrophobic structure of its DBD. *J Clin Endocrinol Metab* 98 (4): E790-5

Rogatsky I., Logan S. K. and Garabedian M. J. (1998) Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (5): 2050-5

Rogatsky I., Waase C. L. and Garabedian M. J. (1998) Phosphorylation and inhibition of rat glucocorticoid receptor transcriptional activation by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Species-specific differences between human and rat glucocorticoid receptor signaling as revealed through GSK-3 phosphorylation. *J Biol Chem* 273 (23): 14315-21

Samarasinghe R. A., Di Maio R., Volonte D., Galbiati F., Lewis M., Romero G. and DeFranco D. B. (2011) Nongenomic glucocorticoid receptor action regulates gap junction intercellular communication and neural progenitor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (40): 16657-62

Schaaf M. J., Champagne D., van Laanen I. H., van Wijk D. C., Meijer A. H., Meijer O. C., Spaink H. P. and Richardson M. K. (2008) Discovery of a functional glucocorticoid receptor beta-isoform in zebrafish. *Endocrinology* 149 (4): 1591-9

Schaaf M. J. and Cidlowski J. A. (2002) AUUUA motifs in the 3'UTR of human glucocorticoid receptor alpha and beta mRNA destabilize mRNA and decrease receptor protein expression. *Steroids* 67 (7): 627-36

Schaaf M. J. and Cidlowski J. A. (2002) Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83 (1-5): 37-48

Scheinman R. I., Gualberto A., Jewell C. M., Cidlowski J. A. and Baldwin A. S., Jr. (1995) Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 15 (2): 943-53

Schule R., Rangarajan P., Kliewer S., Ransone L. J., Bolado J., Yang N., Verma I. M. and Evans R. M. (1990) Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* 62 (6): 1217-26

Sengupta S., Vonesch J. L., Waltzinger C., Zheng H. and Wasylyk B. (2000) Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. *EMBO J* 19 (22): 6051-64

Sengupta S. and Wasylyk B. (2001) Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by Hdm2. *Genes Dev* 15 (18): 2367-80

Smotrys J. E. and Linder M. E. (2004) Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu Rev Biochem* 73 559-87

Sonoda J., Pei L. and Evans R. M. (2008) Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett* 582 (1): 2-9

Stauber C., Altschmied J., Akerblom I. E., Marron J. L. and Mellon P. L. (1992) Mutual cross-interference between glucocorticoid receptor and CREB inhibits transactivation in placental cells. *New Biol* 4 (5): 527-40

Stellato C. (2004) Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc* 1 (3): 255-63

Subramaniam N., Cairns W. and Okret S. (1998) Glucocorticoids repress transcription from a negative glucocorticoid response element recognized by two homeodomain-containing proteins, Pbx and Oct-1. *J Biol Chem* 273 (36): 23567-74

Sud N., Wiseman D. A. and Black S. M. (2010) Caveolin 1 is required for the activation of endothelial nitric oxide synthase in response to 17beta-estradiol. *Mol Endocrinol* 24 (8): 1637-49

Syed A. A., Irving J. A., Redfern C. P., Hall A. G., Unwin N. C., White M., Bhopal R. S. and Weaver J. U. (2006) Association of glucocorticoid receptor polymorphism A3669G in exon 9beta with reduced central adiposity in women. *Obesity (Silver Spring)* 14 (5): 759-64

Takahashi J. S., Hong H. K., Ko C. H. and McDearmon E. L. (2008) The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* 9 (10): 764-75

Tanenbaum D. M., Wang Y., Williams S. P. and Sigler P. B. (1998) Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (11): 5998-6003

ten Dijke P., Miyazono K. and Heldin C. H. (2000) Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem Sci* 25 (2): 64-70

Terry L. J., Shows E. B. and Wente S. R. (2007) Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 318 (5855): 1412-6

Thompson J. D., Higgins D. G. and Gibson T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22 (22): 4673-80

Thornton J. W. (2001) Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (10): 5671-6

Thornton J. W., Need E. and Crews D. (2003) Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science* 301 (5640): 1714-7

Tian S., Poukka H., Palvimo J. J. and Janne O. A. (2002) Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor. *Biochem J* 367 (Pt 3): 907-11

Tliba O., Cidlowski J. A. and Amrani Y. (2006) CD38 expression is insensitive to steroid action in cells treated with tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by a mechanism involving the up-regulation of the glucocorticoid receptor beta isoform. *Mol Pharmacol* 69 (2): 588-96

Truss M., Bartsch J., Schelbert A., Hache R. J. and Beato M. (1995) Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo. *EMBO J* 14 (8): 1737-51

Turner J. D. and Muller C. P. (2005) Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. *J Mol Endocrinol* 35 (2): 283-92

Urbach V., Walsh D. E., Mainprice B., Bousquet J. and Harvey B. J. (2002) Rapid non-genomic inhibition of ATP-induced Cl- secretion by dexamethasone in human bronchial epithelium. *J Physiol* 545 (Pt 3): 869-78

van Dam H. and Castellazzi M. (2001) Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 20 (19): 2453-64

van den Akker E. L., Koper J. W., van Rossum E. F., Dekker M. J., Russcher H., de Jong F. H., Uitterlinden A. G., Hofman A., Pols H. A., Witteman J. C. and Lamberts

S. W. (2008) Glucocorticoid receptor gene and risk of cardiovascular disease. *Arch Intern Med* 168 (1): 33-9

Wallace A. D. and Cidlowski J. A. (2001) Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem* 276 (46): 42714-21

Wang Z., Frederick J. and Garabedian M. J. (2002) Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem* 277 (29): 26573-80

Webster J. C., Oakley R. H., Jewell C. M. and Cidlowski J. A. (2001) Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (12): 6865-70

Wissink S., van Heerde E. C., Schmitz M. L., Kalkhoven E., van der Burg B., Baeuerle P. A. and van der Saag P. T. (1997) Distinct domains of the RelA NF-kappaB subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 272 (35): 22278-84

Wu I., Shin S. C., Cao Y., Bender I. K., Jafari N., Feng G., Lin S., Cidlowski J. A., Schleimer R. P. and Lu N. Z. (2013) Selective glucocorticoid receptor translational isoforms reveal glucocorticoid-induced apoptotic transcriptomes. *Cell Death Dis* 4 e453

Xu Q., Leung D. Y. and Kisich K. O. (2003) Serine-arginine-rich protein p30 directs alternative splicing of glucocorticoid receptor pre-mRNA to glucocorticoid receptor beta in neutrophils. *J Biol Chem* 278 (29): 27112-8

Younglai E. V., Wu Y., Foster W. G., Lobb D. K. and Price T. M. (2006) Binding of progesterone to cell surfaces of human granulosa-lutein cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 101 (1): 61-7

Yudt M. R., Jewell C. M., Bienstock R. J. and Cidlowski J. A. (2003) Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta. *Mol Cell Biol* 23 (12): 4319-30

Zhou F., Xue Y., Yao X. and Xu Y. (2006) CSS-Palm: palmitoylation site prediction with a clustering and scoring strategy (CSS). *Bioinformatics* 22 (7): 894-6

Zhou J. and Cidlowski J. A. (2005) The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70 (5-7): 407-17

Zhu J., Gong J. Y., Goodman O. B., Jr., Cartegni L., Nanus D. M. and Shen R. (2007) Bombesin attenuates pre-mRNA splicing of glucocorticoid receptor by regulating

the expression of serine-arginine protein p30c (SRp30c) in prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1773 (7): 1087-94

7. Δημοσιεύσεις-Ανακοινώσεις-Βραβεία

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τη διδακτορική διατριβή

1. **Nicolas C. Nicolaides**, Zoi Galata, Tomoshige Kino, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari. **The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function.** *Steroids* 2010; 75: 1-12

Αναρτημένες ανακοινώσεις που προέκυψαν από τη διδακτορική διατριβή

1. **The role of S-palmitoylation of human glucocorticoid receptor in mediating the nongenomic actions of glucocorticoids.**
   Nicolas C. Nicolaides, Michael L. Roberts, Tomoshige Kino, Eleni Katsantoni, Amalia Sertedaki, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari
   51st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Leipzig, Germany
   20-23 Σεπτεμβρίου 2012

2. **Ο ρόλος της S-Παλμιτυλίωσης του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στη διαμεσολάβηση των μη γενωμικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών**
   Ν.Χ. Νικολαΐδης, M.L. Roberts, T. Kino, Ε. Κατσαντώνη, Α. Σερτεδάκη, Γ.Π. Χρούσος, Ε. Χαρμανδάρη
   40ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα
   17-20 Απριλίου 2013

7. Δημοσιεύσεις-Ανακοινώσεις-Βραβεία

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από μελέτες παράλληλα με τη διδακτορική διατριβή

1. Zoi Galata, George Moschonis, Manousos Makridakis, Ploumisti Dimitraki, **Nicolas C. Nicolaides**, Yannis Manios, Anastasia Bartzeliotou, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari. **Plasma Proteomic Analysis in Obese and Overweight Children.** *Eur J Clin Invest* 2011; 41 (12): 1275-1283
2. Michael L. Roberts, Tomoshige Kino, **Nicolas C. Nicolaides**, Darrell E. Hurt, Eleni Katsantoni, Amalia Sertedaki, Filadelfia Komianou, Korina Kassiou, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari. **A Novel Point Mutation in the DNA-Binding Domain (DBD) of the Human Glucocorticoid Receptor Causes Primary Generalized Glucocorticoid Resistance by Disrupting the Hydrophobic Structure of its DBD.** *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(4): E790-5.
3. Evangelia Charmandari, **Nicolas C. Nicolaides**, George P. Chrousos. **Adrenal Insufficiency.** *The Lancet* (in press)

Προφορικές ανακοινώσεις που προέκυψαν από μελέτες παράλληλα με τη διδακτορική διατριβή

1. **Plasma proteomic analysis in obese and overweight children**
   Zoi Galata, George Moschonis, Manousos Makridakis, Ploumisti Dimitraki, **Nicolas C. Nicolaides,** George P Chrousos, Yannis Manios, Antonia Vlahou, Evangelia Charmandari
   49th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Prague
   22-25 Σεπτεμβρίου 2010
2. **Functional characterization of a novel mutation in the hGR gene causing primary generalized glucocorticoid resistance**
   Michael L. Roberts, **Nicolas C. Nicolaides**, Tomoshige Kino, Eleni Katsantoni, Amalia Sertedaki, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari
   51st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Leipzig, Germany
   20-23 Σεπτεμβρίου 2012
3. **Ταυτοποίηση Και Λειτουργικός Χαρακτηρισμός Μιας Νέας Σημειακής Μετάλλαξης Στο Γονίδιο Του Ανθρώπινου Υποδοχέα Των Γλυκοκορτικοειδών, η Οποία Προκαλεί Σύνδρομο Γενικευμένης Αντίστασης Στα Γλυκοκορτικοειδή (Σύνδρομο «ΧΡΟΥΣΟΣ»)**
   Ν.Χ. Νικολαΐδης, M.L. Roberts, T. Kino, Geoff Braatvedt, Ε. Κατσαντώνη, Α. Σερτεδάκη, Γ.Π. Χρούσος, Ε. Χαρμανδάρη
   40ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα

17-20 Απριλίου 2013

4. **Μια Νέα Σημειακή Μετάλλαξη Στην Περιοχή Πρόσδεσης Στο DNA Του Ανθρώπινου Υποδοχέα Των Γλυκοκορτικοειδών Προκαλεί Σύνδρομο Γενικευμένης Αντίστασης Στα Γλυκοκορτικοειδή (Σύνδρομο «ΧΡΟΥΣΟΣ»)**
   Ν.Χ. Νικολαΐδης, M.L. Roberts, T. Kino, D.E. Hurt, Ε. Κατσαντώνη, Α. Σερτεδάκη, Γ.Π. Χρούσος, Ε. Χαρμανδάρη
   40^{ο} Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα
   17-20 Απριλίου 2013

Αναρτημένες ανακοινώσεις που προέκυψαν από μελέτες παράλληλα με τη διδακτορική διατριβή

1. **A Novel Point Mutation in the Ligand-binding Domain of the Human Glucocorticoid Receptor Gene Causing Primary Generalized Glucocorticoid Resistance**
   Amalia Sertedaki, Geoff Braatvedt, Zoi Galata, **Nicolas C Nicolaides**, George P Chrousos, Evangelia Charmandari
   LWPES / ESPE 8th Joint Meeting (New York City)
   9-12 Σεπτεμβρίου 2009
2. **Obese Children Demonstrate Alterations in the Expression of Lipoproteins and Coagulation Factors in Plasma Proteomic Analysis**
   Zoi Galata, George Moschonis, Manousos Makridakis, Ploumisti Dimitraki, **Nicolas C. Nicolaides**, George P Chrousos, Yannis Manios, Antonia Vlahou, Evangelia Charmandari
   LWPES / ESPE 8th Joint Meeting (New York City)
   9-12 Σεπτεμβρίου 2009
3. **Plasma proteomic analysis in obese and overweight children**
   Zoi Galata, George Moschonis, Manousos Makridakis, Ploumisti Dimitraki, **Nicolas C. Nicolaides**, Yannis Manios, George P Chrousos, Evangelia Charmandari
   International Conference on Healthy Agriculture, Healthy Nutrition and Healthy People, Olympia
   5-8 Οκτωβρίου 2010
4. **Novel Mechanisms of Primary Generalized Glucocorticoid Resistance or Chrousos Syndrome**
   Michael L. Roberts, Tomoshige Kino, **Nicolas C. Nicolaides**, Eleni Katsantoni, Amalia Sertedaki, Evangelia Charmandari
   50th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Glasgow

25-28 Σεπτεμβρίου 2011

5. **Novel Mutation in Glucocorticoid Receptor Gene Causing Primary Generalized Glucocorticoid Resistance (Chrousos syndrome)**
   Nicolas C. Nicolaides, Eliza Geer, Amalia Sertedaki, Evangelia Charmandari
   50th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Glasgow
   25-28 Σεπτεμβρίου 2011
6. **Molecular mechanisms of action of a novel point mutation in the human glucocorticoid receptor gene causing Primary Generalized Glucocorticoid Resistance**
   Nicolas C. Nicolaides, Amalia Sertedaki, George P. Chrousos, Evangelia Charmandari
   51st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Leipzig, Germany
   20-23 Σεπτεμβρίου 2012
7. **Transient Generalized Glucocorticoid Hypersensitivity: Clinical manifestations and transcriptomics profile**
   Evangelia Charmandari, Eleni Katsantoni, Panagiota Triantafyllou, Athanasios Christoforidis, George Katzos, Tomoshige Kino, **Nicolas C. Nicolaides**, Amalia Sertedaki, George P. Chrousos
   51st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Leipzig, Germany
   20-23 Σεπτεμβρίου 2012
8. **Παροδική Γενικευμένη Υπερευαισθησία στα Γλυκοκορτικοειδή: Κλινικές εκδηλώσεις και Μεταγραφωμικό προφίλ**
   Ν.Χ. Νικολαΐδης, Ε. Κατσαντώνη, Π. Τριανταφύλλου, Α. Χριστοφορίδης, Γ. Κατζός, T. Kino, Α. Σερτεδάκη, Γ.Π. Χρούσος, Ε. Χαρμανδάρη
   40ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα
   17-20 Απριλίου 2013
9. **Μοριακοί μηχανισμοί σηματοδότησης μιας νέας σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, η οποία προκαλεί Σύνδρομο Γενικευμένης Αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή (Σύνδρομο «ΧΡΟΥΣΟΣ»)**
   Ν. Χ. Νικολαΐδης, Α. Σερτεδάκη, Γ. Π. Χρούσος, Ε. Χαρμανδάρη
   40ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα
   17-20 Απριλίου 2013

7. Δημοσιεύσεις-Ανακοινώσεις-Βραβεία

Βραβείο κατά τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής

Βραβείο Α. ΦΑΡΜΑΚΙΩΤΗ

Καλύτερη Αναρτημένη Ανακοίνωση στο 40ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού

Μοριακοί μηχανισμοί σηματοδότησης μιας νέας σημειακής μετάλλαξης στο γονίδιο του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, η οποία προκαλεί Σύνδρομο Γενικευμένης Αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή (Σύνδρομο «ΧΡΟΥΣΟΣ»)
Ν. Χ. Νικολαΐδης, Α. Σερτεδάκη, Γ. Π. Χρούσος, Ε. Χαρμανδάρη
40ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Αθήνα, Ελλάδα
17-20 Απριλίου 2013