



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Μηχανισμοί δράσης των γλυκοκορτικοειδών:
Διερεύνηση του ρόλου του υποδοχέα hGRβ *in vivo* σε διαγονιδιακά
μοντέλα ποντικών

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΜΑΡΚΕΖΙΝΑ ΣΙΓΑΛΑ (Α.Μ. 225624)
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανοσολογίας,
Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
Επιστημονική υπεύθυνη: Ευαγγελία Χαρμανδάρη, Καθηγήτρια Παιδικής και Εφηβικής
Ενδοκρινολογίας, Α' Παιδιατρική Κλινική, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

ΑΘΗΝΑ, 2018

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ουρανία Τσιτσιλώνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Παναγιώτα Παπαζαφείρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
- Πασχάλης Σιδεράς, Ερευνητής Α', Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας, Ίδρυμα ΙατροΒιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Τόπος διεξαγωγής της έρευνας: Εργαστήριο Ενδοκρινολογίας και Μεταβολισμού, Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής & Μεταφραστικής Έρευνας, Ίδρυμα ΙατροΒιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας υλοποιήθηκε με την υποστήριξη ενός αριθμού ανθρώπων στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου. Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιστημονική μου υπεύθυνη, Καθηγήτρια κ. Ευαγγελία Χαρμανδάρη για την καθοδήγησή της και την ευκαιρία που μου προσέφερε να δουλέψω στο εργαστήριό της, αλλά και την επιβλέπουσά μου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ουρανία Τσιτσιλώνη για όλη την υποστήριξη. Επίσης, είμαι ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της εργασίας μου, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Παναγιώτα Παπαζαφείρη και τον Ερευνητή Α' κ. Πασχάλη Σιδερά, για την ανάγνωση της εργασίας μου και για τις πολύτιμες υποδείξεις τους. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην πλέον συμφοιτήτριά μου Σωτηρία Μπουλέκου για την έξοχη συνεργασία, στον μεταδιδακτορικό ερευνητή κ. Γιάννη Μοριανό για την καθοδήγηση και βοήθειά του, καθώς και σε όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου που με τον έναν ή με τον άλλο τρόπο συνέβαλαν στην εργασία αυτή. Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένεια, τους φίλους μου και τον αρραβωνιαστικό μου, για την κατανόηση και την υπομονή τους, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των τελευταίων μηνών της προσπάθειάς μου.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
Τα γλυκοκορτικοειδή.....	9
Ρόλος των γλυκοκορτικοειδών.....	9
Ο πολυεπίπεδος ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στο ανοσοποιητικό.....	10
Ρύθμιση της φλεγμονής.....	10
Ρόλος στην ενεργοποίηση των T κυττάρων.....	11
Ρόλος στη χυμική ανοσία.....	11
Ανοσοβελτιωτικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών.....	12
Χρήση γλυκοκορτικοειδών στην κλινική πράξη.....	12
Βιοσύνθεση γλυκοκορτικοειδών – Στεροειδογένεση.....	13
Έλεγχος της έκφρασης των γλυκοκορτικοειδών.....	14
Απόκριση στο στρες.....	14
Ενεργοποίηση του νευροενδοκρινικού συστήματος μέσω του άξονα HPA.....	14
Συμπεριφορικές και σωματικές αλλαγές.....	15
Κιρκάδιος – Ουλτράδιος ρυθμός.....	15
Τοπική ρύθμιση της δράσης των γλυκοκορτικοειδών.....	16
Τοπικός μεταβολισμός των γλυκοκορτικοειδών.....	16
Σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών.....	17
Μηχανισμοί δράσης γλυκοκορτικοειδών.....	17
Μηχανισμοί γενωμικών δράσεων.....	18
Μηχανισμός εξαρτώμενος από GREs.....	18
Μηχανισμός ανεξάρτητος από GREs.....	18
Συνδυαστικός μηχανισμός.....	18
Μηχανισμοί μη γενωμικών δράσεων.....	19
Θεωρία των διαφορετικών μηχανισμών.....	19
Επιγενετική τροποποίηση μέσω γλυκοκορτικοειδών.....	20
Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών.....	20
Δομή του ανθρώπινου γονιδίου GR και της πρωτεΐνης.....	20
Μεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση των ισομορφών του GR.....	23

Επιρροή μη κωδικοποιών (non coding) RNA στον GR.....	25
Η ισομορφή GRβ.....	26
Βιολογικές δράσεις του GRβ.....	27
Ασθένειες που σχετίζονται με τον υποδοχέα hGR	28
Πρωτογενής Γενικευμένη Αντίσταση στα Γλυκοκορτικοειδή (σύνδρομο Chrousos)	28
Σύνδρομο υπερευαισθησίας λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο του GR	28
Ο ρόλος του GRβ στην αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή	29
Σκοπός.....	30
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
Σύνοψη της πειραματικής διαδικασίας	31
Ελεγχόμενη έκφραση του διαγονιδίου του hGRβ	32
Μεταγραφικός έλεγχος σε διαγονιδιακά ποντίκια μέσω συστημάτων Tet On/Tet Off.....	32
Το πρόβλημα θέσης ένθεσης του διαγονιδίου και η επίλυσή του.....	34
Δημιουργία των κατασκευών hGRβ και rtTA.....	35
Κατασκευή του rtTA2S-M2	35
Δημιουργία κατασκευής hGRβ υπό τον υποκινητή Tet responsive P tight	35
Έλεγχος της επαγωγής του hGRβ σε κυτταροκαλλιέργειες	37
Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών	37
Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών με την κατασκευή του rtTA	37
Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών με την κατασκευή του hGRβ	37
Έλεγχος διαγονιδιακών ιδρυτών (founders).....	37
Απομόνωση DNA από ουρά ποντικού.....	38
Έλεγχος παρουσίας διαγονιδίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR).....	38
PCR για το γονίδιο του hGRβ.....	38
PCR για το γονίδιο του διενεργοποιητή rtTA	39
Έλεγχος παρουσίας διαγονιδίου με στύπωμα κατά Southern (Southern blot).....	39
Εγκαθίδρυση διαγονιδιακών σειρών και έλεγχος αριθμού αντιγράφων της κατασκευής.....	40
Δημιουργία διπλών διαγονιδιακών ποντικών	40
Ενεργοποίηση της έκφρασης του διαγονιδίου	40
Μέτρηση επιπέδων έκφρασης γονιδίων που επάγονται από τα γλυκοκορτικοειδή.....	41
Μέτρηση επιπέδων RNA των γονιδίων CYP11A και PNMT στα επινεφρίδια	41
Μέτρηση επιπέδων RNA των γονιδίων 11β-HSD1, PEPCK, TAT και G6Pase στο ήπαρ	41

Απομόνωση RNA από ήπαρ και επινεφρίδια με TRIzol®	41
Αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA και PCR (Reverse Transcription – PCR, RT-PCR)	42
Επώαση του RNA με DNάση.....	42
RT-PCR.....	43
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR) για μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων.....	44
Έλεγχος επαγωγής της έκφρασης του hGRβ.....	45
Απομόνωση πρωτεϊνών από ήπαρ και επινεφρίδια	45
Στύπωμα κατά Western για την επιβεβαίωση της έκφρασης του μεταλλαγμένου υποδοχέα GRβ στο ήπαρ και στα επινεφρίδια.....	46
Διαχωρισμός σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.....	46
Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF.....	47
Επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα	47
Επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα	48
Προσθήκη υποστρώματος και εμφάνιση σήματος.....	48
Ενδοκρινολογικές εξετάσεις.....	48
ELISA.....	48
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
Real Time PCR για μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη δράση των γλυκοκορτικοειδών	50
Γονίδια στο ήπαρ: <i>11b-HSD1, PEPCK, TAT, G6Pase</i>	50
Γονίδια στα επινεφρίδια: <i>CYP11A, PNMT</i>	52
Στύπωμα κατά Western για εντοπισμό του hGRβ στο ήπαρ και στα επινεφρίδια	53
Ενδοκρινολογικές εξετάσεις.....	54
Αδιπνεκτίνη.....	54
Ιντερλευκίνη 1β.....	55
Ιντερλευκίνη 2.....	55
Ιντερλευκίνη 6.....	55
Ιντερλευκίνη 10.....	56
Λεπτίνη.....	56
Ρεζιστίνη	57
Παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF-α).....	57
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59

Μελέτη έκφρασης γονιδίων σε ήπαρ και επινεφρίδια	59
Στύπωμα κατά Western για εντοπισμό του hGRβ στο ήπαρ και στα επινεφρίδια	60
Ενδοκρινολογικές εξετάσεις.....	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoids, GCs) είναι ορμόνες με σημαντικό ρόλο στην απόκριση του οργανισμού στο στρες και χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία αυτοάνοσων, φλεγμονωδών, αλλεργικών και λεμφοϋπερπλαστικών παθήσεων. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR) είναι μία εξελικτικά συντηρημένη πρωτεΐνη της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, που δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και διαμεσολαβεί τις ποικίλες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη που μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα μετά την πρόσδεσή του στα γλυκοκορτικοειδή, και τροποποιεί τους ρυθμούς μεταγραφής των γονιδίων που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή με τρόπο θετικό ή αρνητικό. Έχουν καταγραφεί πολλές διαφορετικές ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, εκ των οποίων μία, ο υποδοχέας GRβ, παρουσιάζει ενδιαφέρον, γιατί ασκεί επικρατούσα αρνητική δράση στον λειτουργικό GRα και σχετίζεται με παθολογίες ή θεραπευτικές συνέπειες. Στην ερευνητική αυτή μελέτη δημιουργήσαμε διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τον ανθρώπινο GRβ, με σκοπό να μελετήσουμε τα επίπεδα γονιδίων που ρυθμίζονται από τα γλυκοκορτικοειδή και να αναζητήσουμε τυχόν αλλαγές στο ενδοκρινολογικό προφίλ και σε κυτταροκίνες που σχετίζονται με τα γλυκοκορτικοειδή.

ABSTRACT

Glucocorticoids (GCs) are hormones, essential for the stress response in humans and are commonly used in treating autoimmune, inflammatory and lymphoproliferative diseases. Their receptor (Glucocorticoid Receptor, GR) is an evolutionarily conserved protein, of the superfamily of nuclear receptors, regulating the diverse actions of glucocorticoids, acting as a transcription factor. This protein moves from the cytosol to the nucleus after binding to its ligand, GCs, and modifies the transcription rates of genes responding to glucocorticoids, in a positive or negative manner. There are many different isoforms of GR, one of which, GR β , is very interesting, since it has a dominant negative effect on the functional GR isoform, GR α . The GR β isoform is also correlated to pathologies or therapeutic consequences. In this study, we created transgenic mice that overexpress human GR β , in order to determine the transcriptional levels of genes regulated by glucocorticoids and observe the endocrinological changes.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoids, GCs) είναι στεροειδείς ορμόνες που εκκρίνονται από τα επινεφρίδια και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της βασικής ομοιόστασης καθώς και της ομοιόστασης μετά από στρες (Chrousos, 1995, 2001; Franchimont *et al.*, 2003). Τα γλυκοκορτικοειδή βρίσκονται σχεδόν σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς και επηρεάζουν περίπου το 20% των γονιδίων που εκφράζουν τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα (Galon *et al.*, 2002). Επιπλέον, συμμετέχουν στην απόκριση στο στρες, την φλεγμονώδη απόκριση, αλλά και στην ανάπτυξη και αναπαραγωγή (Chrousos, 1998, 2000). Σε φαρμακολογικές δόσεις, χρησιμοποιούνται σαν ανοσοκατασταλτικά, για την αντιμετώπιση φλεγμονωδών, αυτοάνοσων και λεμφοϋπερπλαστικών παθήσεων (Boumpas *et al.*, 1993), και κατέχουν ακόμα σημαντική θέση στη θεραπεία ασθενειών, κι ας έχουν περάσει πάνω από 50 χρόνια μετά την εισαγωγή τους στην κλινική.

Ρόλος των γλυκοκορτικοειδών

Τα κύρια ενδογενή γλυκοκορτικοειδή είναι η κορτιζόλη και η κορτικοστερόνη, ενώ τα συνθετικά ανάλογα είναι η πρεδνιζολόνη και η δεξαμεθαζόνη. Και τα δύο ενδογενή στεροειδή παράγονται από τα περισσότερα είδη θηλαστικών, αλλά η αναλογία στην οποία εκκρίνονται ποικίλλει από είδος σε είδος. Η κορτιζόλη είναι το πρωταρχικό γλυκοκορτικοειδές στον άνθρωπο, ενώ τα τρωκτικά παράγουν κυρίως κορτικοστερόνη. Η κορτιζόλη εξασκεί εκτεταμένες δράσεις στο σώμα, που είναι ζωτικές για τη διατήρηση της ομοιόστασης και επιτρέπουν στον οργανισμό να προετοιμαστεί, να αποκριθεί και να αντιμετωπίσει το φυσικό και συναισθηματικό στρες (Sapolsky *et al.*, 2000).

Τα ενδογενή γλυκοκορτικοειδή προάγουν τον καταβολισμό των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών και ασκούν πολύπλοκες δράσεις στην εναπόθεση και στη διάσπαση λιπιδίων. Είναι επίσης σημαντικοί ρυθμιστές των ανοσολογικών και φλεγμονωδών διαδικασιών και απαιτούνται για διαδικασίες σχετικές με την άμυνα του οργανισμού – ξενιστή. Αυτές οι ιδιότητές τους αποτελούν τη βάση των πολλών προστατευτικών από το στρες δράσεων των στεροειδών, καθώς μειώνουν τις παθοφυσιολογικές αποκρίσεις στον τραυματισμό ιστών και στη φλεγμονή και έτσι προλαμβάνουν την εξέλιξή τους (Munck & Naray-Fejes-Toth, 1992; Charmandari *et al.*, 2005; Chrousos & Kino, 2007; Chrousos & Kino, 2005).

Ασκούν επίσης ένα εύρος άλλων δράσεων. Αυξάνουν την αρτηριακή πίεση και ρυθμίζουν την ομοιόσταση ύδατος και ηλεκτρολυτών. Έχουν πολύπλοκες επιδράσεις στα οστά, επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη και είναι προαποπτωτικά. Στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), τα γλυκοκορτικοειδή στοχεύουν νευρώνες αλλά και γλοιοκύτταρα. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, αυτές οι δράσεις υποβοηθούν σημαντικά οργανωτικά γεγονότα στον εγκέφαλο και εμπλέκονται στις διαδικασίες του νευροεκφυλισμού. Άλλες δράσεις τους συμπεριλαμβάνουν

αλλαγές διάθεσης και συμπεριφοράς, μετριασμό της πρόσληψη τροφής, αυξομειώσεις της θερμοκρασίας του σώματος και διαφορά στην αντίληψη του πόνου (Charmandari *et al.*, 2005; Chrousos & Kino, 2007; Chrousos & Kino, 2005; Pearson Murphy, 2002).

Σε περιπτώσεις αύξησης στη συγκέντρωση γλυκοκορτικοειδών, είτε λόγω υπερέκκρισης ενδογενών στεροειδών (σύνδρομο Cushing) ή λόγω χρόνιας χορήγησης εξωγενών στεροειδών, εμφανίζεται πληθώρα ανεπιθύμητων ενεργειών. Αυτές συμπεριλαμβάνουν σημαντική ανακατανομή λίπους, προξενώντας έτσι κεντρική παχυσαρκία, μυϊκή αδυναμία, υπεργλυκαιμία και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, υπέρταση, αυξημένες συγκεντρώσεις χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων, κατακράτηση ύδατος και άλατος, ανοσοανεπάρκεια, ελαττωματική επούλωση πληγών και απώλεια συνδετικού ιστού που οδηγεί σε εύκολη εμφάνιση, καθυστέρηση της αύξησης, οστεοπόρωση, ανωμαλίες στην έμμηνο ρύση, υπογονιμότητα, κατάθλιψη και άλλες διαταραχές που σχετίζονται με το ενδοκρινικό σύστημα (Buckingham, 2006).

Αντίθετα, η ανεπαρκής έκκριση γλυκοκορτικοειδών, χαρακτηρίζεται από χαρακτηρίζεται από ευαισθησία στο στρες, περίσσεια λευκοκυττάρων, υπερτροφία λεμφικού ιστού, υπόταση, διαταραχές διάθεσης, αδυναμία/λήθαργο, απώλεια βάρους και υπογλυκαιμία.

Ο πολυεπίπεδος ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στο ανοσοποιητικό

Τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την παραγωγή TNF-α, IFN-γ και IL-2 *in vitro* και *in vivo* σε ζώα και ανθρώπους (Beutler *et al.*, 1986; Boumpas *et al.*, 1993). Δεν έχουν επίδραση στην παραγωγή της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 από τα μονοκύτταρα (Elenkov *et al.*, 1996; Van der Poll *et al.*, 1996), όμως η παραγωγή IL-10 από τα λεμφοκύτταρα φαίνεται να ρυθμίζεται από αυτά (Ramirez *et al.*, 1996). Μακροχρόνια επώαση *in vitro* με μικρές συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης μπορεί να ενεργοποιήσει τα κυψελιδικά μακροφάγα, οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή IL-1β (Broug-Holub & Kraal, 1996). Έκθεση επιμυών σε αναπόφευκτο ελαφρύ ηλεκτρικό σοκ στο πόδι (στρες), έχει επίσης αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής IL-1β και TNF-α από τα μακροφάγα των κυψελίδων (Broug-Hollub *et al.*, 1998).

Ρύθμιση της φλεγμονής

Η φλεγμονώδης απόκριση αποτελείται από μια σειρά διαδικασιών που διαιρούνται σε τρεις διαδοχικές φάσεις. Όπως περιγράφεται παρακάτω, τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν διαδικασίες σε κάθε μία από αυτές τις φάσεις:

1. Φάση συναγερμού: *σήματα κινδύνου πυροδοτούν την έκκριση μεσολαβητών της φλεγμονής*. Μετά από την ανίχνευση πολλών μοριακών μοτίβων κινδύνου (damage-associated molecular patterns, DAMPs) από τραυματισμένα κύτταρα, τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την παραγωγή ανοσολογικών ρυθμιστών (Sionon *et al.*, 2006). Ακόμα, μειώνουν τη ροή του αίματος στα σημεία φλεγμονής (Perretti & Ahluwalia, 2000), μειώνοντας την αγγειοδιαστολή και την αυξημένη διαπερατότητα. Ενώ τα δίκτυα προφλεγμονωδών κυτταροκινών ενισχύουν και σχηματίζουν τη φλεγμονώδη απόκριση μέσω διάδοσης των σημάτων DAMPs, η έκφρασή τους παρεμποδίζεται από τα γλυκοκορτικοειδή. Στην ομάδα αυτών των κυτταροκινών συμπεριλαμβάνονται οι ιντερλευκίνες IL-1α, 1β, 2, 6, και ο TNF-α (Cain & Cidlowski, 2017). Τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν επίσης την παραγωγή κυτταροκινών σε μεταμεταφραστικό

επίπεδο. Η ρύθμιση του γονιδίου ZFP36 μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, μειώνει την ημιζωή του mRNA του *TNF* (Smoak & Cidlowski, 2006).

2. Φάση κινητοποίησης: τα λευκοκύτταρα εισβάλλουν στην τραυματισμένη περιοχή. Σε αυτό το στάδιο, τα γλυκοκορτικοειδή μειώνουν την εξαγγείωση των λευκοκυττάρων με την παρεμπόδιση μορίων προσκόλλησης σε κύτταρα (Cronstein *et al.*, 1992; Atsuta *et al.*, 1999). Ρυθμίζουν επίσης αρνητικά την παραγωγή αρκετών χυμοκινών και χημειοτακτικών παραγόντων, ελέγχοντας έτσι τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων. Άμεση πρόσδεση του GR σε mRNA που κωδικοποιούν για χυμοκίνες, προωθεί την αποδόμησή τους (Ishmael *et al.*, 2011).

3. Φάση επίλυσης: ο ιστός καθαρίζεται από τα κυτταρικά υπολείμματα. Στο τελευταίο στάδιο, στα μονοκύτταρα και στα μακροφάγα ενεργοποιούνται γονιδιακά προγράμματα μέσω γλυκοκορτικοειδών, που προωθούν τη φαγοκύτωση των αποπτωτικών κυττάρων και του debris (Ehrchen *et al.*, 2007; Giles *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 1999). Σε αυτό το στάδιο, τα μακροφάγα χαρακτηρίζονται από την έκκριση αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-10 (Martinez *et al.*, 2008). Μια ακόμη λειτουργία των γλυκοκορτικοειδών κατά αυτή τη φάση είναι η παρεμπόδιση πολλών διαδικασιών επούλωσης πληγών, συμπεριλαμβανομένων της εναπόθεσης κολλαγόνου, την επανεπιθηλιοποίηση και αγγειογένεση (Cain & Cidlowski, 2017).

Ρόλος στην ενεργοποίηση των T κυττάρων

Γενικά τα γλυκοκορτικοειδή μειώνουν τη δράση των δενδριτικών κυττάρων παρεμποδίζοντας την ωρίμανσή τους, μέσω μειορρύθμισης της έκφρασης MHC κλάσης II, μορίων αντιγονοπαρουσίασης, μορίων συνδιέγερσης και προφλεγμονωδών κυτταροκινών (π.χ. IL-12 και TNF), και αυξορρύθμισης αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών (π.χ. IL-10) (Szatmari & Nagy, 2008). Η έκθεση σε γλυκοκορτικοειδή κατά τη διάρκεια ωρίμανσης από μονοκύτταρα σε δενδριτικά αυξάνει την ικανότητα των δενδριτικών να πιάνουν αντιγόνα, αλλά μειώνει τη δράση τους σαν αντιγονοπαρουσιαστικά, άρα μάλλον τα γλυκοκορτικοειδή προάγουν τη διαφοροποίηση «ανεκτικών» δενδριτικών (Chamorro *et al.*, 2009).

Τα γλυκοκορτικοειδή επίσης μειώνουν την ενεργοποίηση των T κυττάρων εμπλεκόμενα στη σηματοδότηση του υποδοχέα τους (T Cell Receptor, TCR). Μελέτες έχουν υποδείξει ότι τα γλυκοκορτικοειδή προωθούν τη διαφοροποίηση και δράση των T ρυθμιστικών (T regulatory, Treg) κυττάρων, γιατί η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή σχετίζεται με υψηλότερη συχνότητα T reg κυττάρων στην κυκλοφορία και/ή στον φλεγμονώδη ιστό (Cain & Cidlowski, 2017).

Ρόλος στη χυμική ανοσία

Αν και δεν υπάρχουν πολλές μελέτες σχετικά με τη δράση των γλυκοκορτικοειδών στη χυμική ανοσία, τα γλυκοκορτικοειδή δείχνουν αποτελεσματικά στη θεραπεία αυτοάνοσων ασθενειών στις οποίες το αντίσωμα συμβάλλει στην παθολογία, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Επίσης, τα B κύτταρα εμφανίζουν ανοσορρυθμιστικές λειτουργίες, κυρίως μέσω την έκφραση της IL-10, της οποίας το γονίδιο είναι στόχος γλυκοκορτικοειδών (Cain & Cidlowski, 2017).

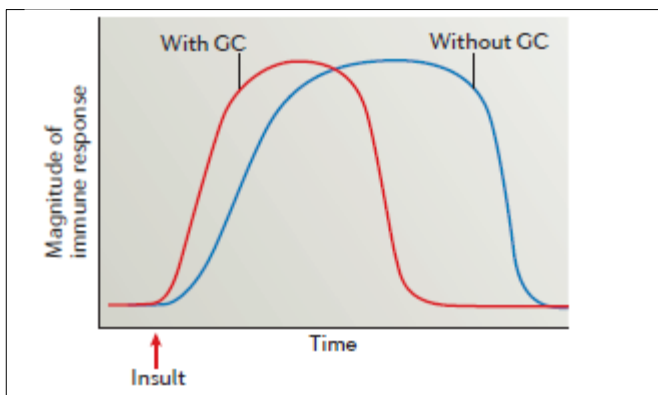
Τα B κύτταρα εκφράζουν τον GR κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης (Gruver-Yates *et al.*, 2014) και ο GR επηρεάζει αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες καθοδικά της

σηματοδότησης του υποδοχέα B κυττάρων (B cell receptor, BCR), κάτι που αυξάνει την πιθανότητα τα γλυκοκορτικοειδή να παίζουν ρόλο στην επιλογή των B κυττάρων.

Ανοσοβελτιωτικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών

Αν και το μεγαλύτερο μέρος της βιβλιογραφίας στα γλυκοκορτικοειδή εστιάζει στις ανοσοκατασταλτικές δράσεις τους, υπάρχουν πολλές μελέτες που αποδεικνύουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να βελτιώσουν τη φλεγμονή και την ανοσία. Οι ενισχυτικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών σχετίζονται με τη δόση, σε αντίθεση με τις κατασταλτικές τους ιδιότητες. Λόγου χάριν, στα μακροφάγα που ενεργοποιούνται από λιποπολυσακχαρίδια μικροοργανισμών (LipoPolySaccharide, LPS) και IFN- γ , υψηλές δόσεις κορτικοστερόνης παρεμποδίζουν τη μεταγραφή φλεγμονωδών γονιδίων, ενώ χαμηλές δόσεις βελτιώνουν τη φλεγμονώδη γονιδιακή έκφραση (Lim *et al.*, 2007; Dhabar & McEwen, 1999).

Παρόλο που τα γλυκοκορτικοειδή είναι γνωστά για τη μείωση της έκφρασης κυτταροκινών, έχει αναφερθεί ότι αυξάνουν την έκφραση αρκετών υποδοχέων κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων εκείνων των TNF, IL-1, IL-6 και IFN- γ (Wiegers & Reul, 1998). Η ταχεία αύξηση της συγκέντρωσης γλυκοκορτικοειδών στο αίμα λόγω φυσιολογικού στρες, ίσως να αποτελεί μια συστηματική προειδοποίηση και να ευαισθητοποιεί τα κύτταρα σε DAMPs, PAMPs και φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Επομένως, τα γλυκοκορτικοειδή (μαζί με τις κατεχολαμίνες) είναι σημαντικοί συνεισφορείς στην τροποποιημένη ανοσολογική λειτουργία που σχετίζεται με το χρόνιο στρες (Dhabhar *et al.*, 2012; Dhabhar, 2002).



Εικόνα 1. Υποθετικό χρονοδιάγραμμα ανοσοαπόκρισης παρουσία (κόκκινη γραμμή) ή απουσία (μπλε γραμμή) GCs. Προτείνεται ότι τα GCs ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα με διφασικό τρόπο, δηλαδή χαμηλές δόσεις προωθούν την έκφραση γονιδίων της εγγενούς ανοσίας και γρήγορες αποκρίσεις σε προσβολές, αλλά το στρες και/ή φαρμακολογικές συγκεντρώσεις καταστέλλουν τη σηματοδότηση μέσω ανοσολογικών υποδοχέων. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, τα ζώα με επάρκεια GCs (κόκκινη γραμμή) παρουσιάζουν γρήγορες ανοσοαποκρίσεις σε παθογόνα και τραυματισμό του ιστού, αλλά οι

αποκρίσεις αυτές είναι μικρότερες σε διάρκεια. Σε ζώα με ανεπάρκεια GCs (μπλε γραμμή), όμως, μη φυσιολογική έκφραση PRRs και υποδοχέων κυτταροκινών έχει ως αποτέλεσμα μια πιο αργή ανοσοαπόκριση. Επιπλέον, απουσία καταστολής της σηματοδότησης ανοσολογικών υποδοχέων μέσω των GCs, η ανοσοαπόκριση διαρκεί περισσότερο (Cain & Cidlowski, 2017).

Χρήση γλυκοκορτικοειδών στην κλινική πράξη

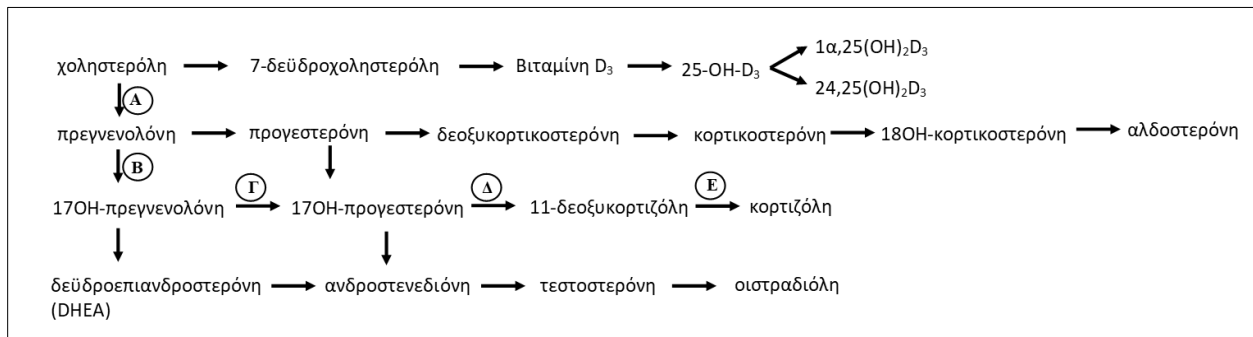
Το πρώτο γλυκοκορτικοειδές που χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη ήταν η συνθετική κορτιζόνη (που μέσα στα κύτταρα μετατρέπεται σε κορτιζόλη με το ένζυμο 11 β -HSD1). Παρόλο που είχε επιτυχία για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, η μακροχρόνια θεραπεία με κορτιζόνη προκαλεί διαταραχή της ισορροπίας ύδατος και ηλεκτρολυτών, και κατακράτηση

υγρών μέσω της ενεργοποίησης των (συγγενικών με τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών) υποδοχέων αλατοκορτικοειδών στους νεφρούς (Cain & Cidlowski, 2017).

Γενικά, τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή είναι πιο δραστικοί ανοσορρυθμιστές από την κορτιζόλη. Επιπλέον, τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή μπορούν να προσδένονται στους δικούς τους υποδοχείς τους με μεγαλύτερη συγγένεια από ότι στους υποδοχείς αλατοκορτικοειδών, συγκριτικά με τα ενδογενή, μειώνοντας έτσι τις ανεπιθύμητες ενέργειες (Cain & Cidlowski, 2017).

Βιοσύνθεση γλυκοκορτικοειδών – Στεροειδογένεση

Στα συστήματα των θηλαστικών, υπάρχουν πέντε βασικές οικογένειες στεροειδών ορμονών: τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα, τα προγεσταγόνα, τα αλατοκορτικοειδή και τα γλυκοκορτικοειδή. Όπως όλες οι στεροειδείς ορμόνες, τα γλυκοκορτικοειδή συντίθενται από τη χοληστερόλη, μέσω μιας ενζυμικής διαδικασίας που ονομάζεται στεροειδογένεση και πραγματοποιείται κυρίως στα μιτοχόνδρια (Miller & Auchus, 2011). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στον φλοιό των επινεφριδίων, για τα γλυκοκορτικοειδή πιο συγκεκριμένα στη ζона fasciculata, παρόλο που η τοπική παραγωγή γλυκοκορτικοειδών έχει αναφερθεί και στον θύμο, στο έντερο και στο δέρμα (Talaber *et al.*, 2013). Ακολουθεί ένα συνοπτικό διάγραμμα της στεροειδογένεσης με πρώτη ύλη τη χοληστερόλη.



Σχεδιάγραμμα 1. Βασικά μεταβολικά μονοπάτια της σύνθεσης ανθρώπινων στεροειδών ορμονών από τη χοληστερόλη (προσαρμογή από Miller, 1988).

Με κυκλωμένα κεφαλαία γράμματα εμφανίζονται τα ένζυμα που καταλύουν τις αντιδράσεις του μονοπατιού βιοσύνθεσης των γλυκοκορτικοειδών, σε αυτή την περίπτωση της κορτιζόλης:

A: P450_{scc} (P450_{side chain cleavage}, κωδικοποιείται από το γονίδιο *CYP11A*)

B: 17α-υδροξυλάση

Γ: 3β-αφυδρογονάση στεροειδών

Δ: 21-υδροξυλάση

Ε: 11β-υδροξυλάση

Έλεγχος της έκφρασης των γλυκοκορτικοειδών

Απόκριση στο στρες

Η απόκριση στο σωματικό ή συναισθηματικό στρες απαιτεί τη συνεργασία μοριακών, ορμονικών, και νευρωνικών μονοπατιών, και ποικίλλει σε μέγεθος ανάλογα με τη φύση, την ένταση και τη διάρκεια του ερεθίσματος. Γίνονται οι απαραίτητες προσαρμογές στον οργανισμό για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Ένα από τα πρωταρχικά συστήματα απόκρισης στο στρες είναι ο άξονας υποθαλάμου – υπόφυσης – επινεφριδίων (hypothalamic – pituitary – adrenal, HPA), (Chrousos & Gold, 1992), ο οποίος δίνει και το έναυσμα για την έκφραση των γλυκοκορτικοειδών.

Ενεργοποίηση του νευροενδοκρινικού συστήματος μέσω του άξονα HPA

Όταν, λοιπόν, η ομοιόσταση απειλείται (ή ο οργανισμός θεωρεί ότι απειλείται) από έναν στρεσογόνο παράγοντα, το σύστημα του στρες ενεργοποιείται μέσω δύο κυμάτων από ορμονικές εκκρίσεις που αποτελούν την προσαρμοζόμενη απόκριση στο στρες.

Το πρώτο ορμονικό κύμα ξεκινά μέσα σε δευτερόλεπτα και περιλαμβάνει:

1. αυξημένη έκκριση επινεφρίνης και νορεπινεφρίνης από το Συμπαθητικό Νευρικό Σύστημα
2. έκκριση της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (corticotrophin-releasing hormone, CRH) από τον υποθάλαμο, και αύξηση της έκκρισης της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (AdrenoCorticoTropic Hormone, ACTH) από την υπόφυση
3. μειωμένη έκκριση υποθαλαμικής εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (Gonadotropin-Releasing Hormone, GnRH) που ακολουθείται από μειωμένη έκκριση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (follicle-stimulating hormone, FSH) και ωχρινοτρόπου ορμόνης (luteinizing hormone, LH) από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και
4. αυξημένη έκκριση προλακτίνης και αυξητικής ορμόνης από την υπόφυση (Sapolsky *et al.*, 2000).

Το δεύτερο κύμα συμβαίνει πιο αργά και περιλαμβάνει τα γλυκοκορτικοειδή:

1. Ο υποθάλαμος εκκρίνει CRH και αργινίνη-βαζοπρεσίνη (arginine vasopressin, AVP), οι οποίες επάγουν την έκκριση της ACTH από την υπόφυση.
2. Η ACTH με τη σειρά της μπαίνει στην κυκλοφορία και προσδέεται σε υποδοχείς μελανοκορτίνης τύπου 2 στον φλοιό των επινεφριδίων, επάγοντας τη βιοσύνθεση των γλυκοκορτικοειδών.
3. Μετά το πέρας της διαδικασίας, τα γλυκοκορτικοειδή απελευθερώνονται στην κυκλοφορία για διανομή σε όλο το σώμα.
4. Τα γλυκοκορτικοειδή φτάνουν στον υποθάλαμο και στην υπόφυση και καταστέλλουν την έκκριση CRH, AVP και ACTH, μειορρυθμίζοντας έτσι την ευαισθησία του άξονα HPA στα εισερχόμενα ερεθίσματα μέσω ενός κύκλου αρνητικής ανατροφοδότησης (Εικόνα 2, Cain & Cidlowski, 2017)
5. Ο υποθάλαμος διεγείρεται επίσης και από την ιντερλευκίνη 1 (InterLeukin 1, IL-1), τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF) και την IL-6 (4, ΣΧΗΜΑ 1, Cain & Cidlowski, 2017). Η ενεργοποίηση του HPA άξονα λόγω κυτταροκινών προωθεί την έκκριση γλυκοκορτικοειδών, που μπορεί να καταστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Επομένως, ένας δεύτερος κύκλος ανατροφοδότησης συνδέει την ανοσοαπόκριση με τον άξονα HPA (Εικόνα 1, Bornstein *et al.*, 2006).

Στη συνέχεια, τα γλυκοκορτικοειδή που έχουν απελευθερωθεί στην κυκλοφορία του αίματος, αναζητούν τους αντίστοιχους μεμβρανικούς υποδοχείς (υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών, Glucocorticoid Receptors, GRs) ώστε να εξασκήσουν τις δράσεις τους. Ωστόσο, δεν προσδένονται μόνο σε GRs, αλλά πυροδοτούν και τον υποδοχέα αλατοκορτικοειδών (mineralocorticoid receptor, MR), μέλος της ίδιας οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων με τον GR. Φαίνεται ότι τα γλυκοκορτικοειδή προσδένονται σε MRs και αυξάνουν τη δραστηριότητα πολλαπλών κινασών που εμπλέκονται σε διάφορους καταρράκτες σηματοδότησης. Τόσο ο GR όσο και ο MR παίζουν σημαντικούς ρόλους στην γλουταμινεργική νευροδιαβίβαση (Nicolaidis *et al.*, 2014).

Συμπεριφορικές και σωματικές αλλαγές

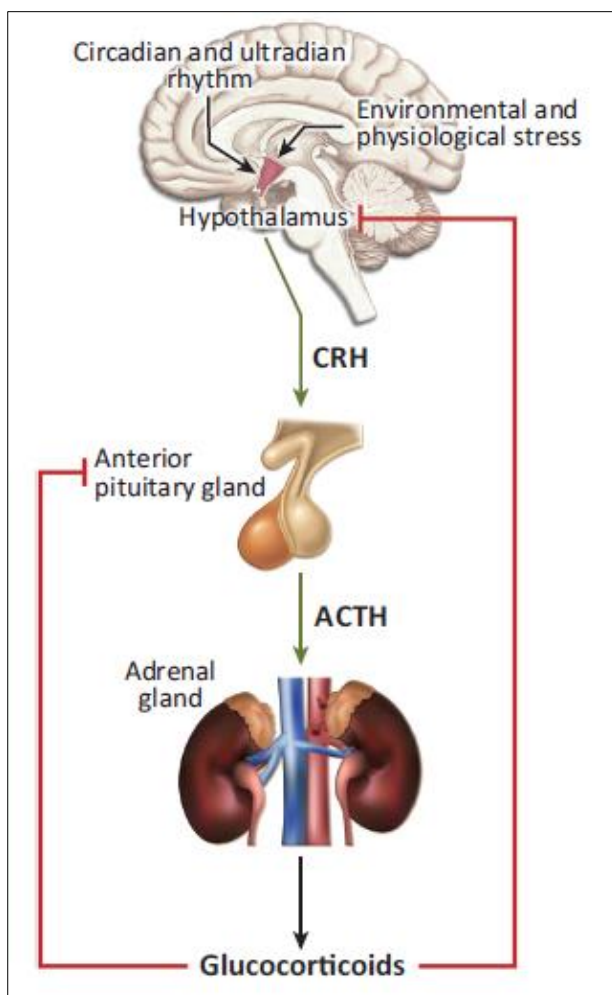
Η ενεργοποίηση του συστήματος του στρες μέσω των παραπάνω νευροενδοκρινικών μηχανισμών οδηγεί σε μια σειρά συμπεριφορικών και σωματικών προσαρμοστικών αλλαγών που αυξάνουν κατακόρυφα τις πιθανότητες επιβίωσης (Chrousos, 2009; Chrousos & Gold, 1992; Charmandari *et al.*, 2005; Chrousos & Kino, 2007; Charmandari *et al.*, 2003; Chrousos, 1998). Επομένως, οι οργανισμοί ίσως να παρουσιάζουν εγρήγορση, συγκεντρωμένη προσοχή, καθώς και ευφορία, αυξημένη αναλγησία, καταστολή της πείνας και παρεμπόδιση της αναπαραγωγικής λειτουργίας.

Εκτός από τις συμπεριφορικές αλλαγές, συμβαίνουν και σωματικές. Γίνεται, λοιπόν, εκτροπή του οξυγόνου και των θρεπτικών στο κεντρικό νευρικό σύστημα, μέσω αυξημένου ρυθμού αναπνοής και αυξημένης καρδιαγγειακής λειτουργίας, όπως επίσης και τάση του μεταβολισμού προς τον καταβολισμό. Συγχρόνως, οι οργανισμοί «ανοίγουν» τους περιοριστικούς μηχανισμούς κατά τη διάρκεια του στρες, που προλαμβάνουν μια υπερβολική

αντίδραση από το σύστημα του στρες. Εάν αυτοί δεν καταφέρουν να ελέγξουν τις προσαρμοστικές αλλαγές λόγω στρες, η απόκριση αυτή ίσως γίνει υπερβολική, παρατεταμένη και δυσπροσάρμοστη, άρα ίσως να συμβάλλει στην ανάπτυξη οξέων ή χρόνιων παθολογικών καταστάσεων (Nicolaidis *et al.*, 2014).

Κιρκάδιος – Ουλτράδιος ρυθμός

Ο άξονας HPA συντονίζει επίσης την παραγωγή γλυκοκορτικοειδών με τον κιρκάδιο (συχνότητα 24ώρου) και τον ουλτράδιο ρυθμό (συχνότητα μικρότερη του 24ώρου) (Spiga *et al.*, 2014). Η μέγιστη συγκέντρωση γλυκοκορτικοειδών εμφανίζεται αμέσως πριν ξυπνήσει ο οργανισμός, ενώ η ελάχιστη νωρίς στη φάση ύπνου. Παρόλο που αυτές οι διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών δεν είναι τόσο μεγάλες όσο εκείνες της



απόκρισης στο στρες, έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την ταχύτητα απόκρισης του ανοσοποιητικού και τη διακίνηση λευκοκυττάρων (Scheiermann *et al.*, 2013). Οι διακυμάνσεις στον αριθμό λευκοκυττάρων του αίματος στον άνθρωπο, για παράδειγμα, έχουν αντίστροφη συσχέτιση με τα ημερήσια μοτίβα της έκκρισης γλυκοκορτικοειδών (Dimitrov *et al.*, 2009).

Σε περίπτωση έκθεσης σε στρες, η απόκριση στο στρες υπερισχύει του κικκάλδιου και ουλτράδιου ρυθμού.

Τοπική ρύθμιση της δράσης των γλυκοκορτικοειδών

Η στεροειδογένεση στα επινεφρίδια προκαλεί συστημικές αλλαγές στις συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών, αλλά οι εξωκυττάρια προσδεδεμένες πρωτεΐνες και τα ενδοκυττάρια ένζυμα ρυθμίζουν την τοπική δραστηριότητα των γλυκοκορτικοειδών. Η περισσότερη κορτιζόλη στην κυκλοφορία είναι προσδεδεμένη στην πρωτεΐνη-μεταφορέα CBG (σφαιρίνη πρόσδεσης στα κορτικοστεροειδή, corticosteroid-binding globulin) και μόνο το 5% μένει βιοενεργής στην κυκλοφορία. Η CBG παρέχει έναν μηχανισμό ισοαιδικής διανομής γλυκοκορτικοειδών στα κύτταρα στόχους. Για παράδειγμα, σε φλεγμαίνοντα ιστό, η ελασάση αποσυνδέει την CBG από τα κορτικοστεροειδή, άρα απελευθερώνει βιοενεργά γλυκοκορτικοειδή στους τόπους φλεγμονής (Pemberton *et al.*, 1988). Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι κακή ρύθμιση αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή (Meijer *et al.*, 2003).

Εικόνα 2. Η ρύθμιση των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών από τον άξονα HPA. Η σύνθεση και η απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών γίνεται υπό αυστηρό κικκάλδιο και ουλτράδιο έλεγχο μέσω του παρακοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου. Η CRH που εκκρίνεται από τον υποθάλαμο ενεργοποιεί την απελευθέρωση της ACTH από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Με τη σειρά της, η ACTH επάγει τη σύνθεση και έκκριση της κορτιζόλης από τον φλοιό των επινεφριδίων μέσα στην κυκλοφορία. Η ομοιόσταση στα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών διατηρείται από τον κύκλο αρνητικής ανατροφοδότησης που μειώνει τα επίπεδα ACTH στον cadmieoπίσθιο λοβό της υπόφυσης και τα επίπεδα CRH στον υποθάλαμο (Kadmiel & Cidlowski, 2013).

Τοπικός μεταβολισμός των γλυκοκορτικοειδών

Πιθανότατα ο πιο σημαντικός παράγοντας που ρυθμίζει την πρόσβαση των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών στους υποδοχείς τους είναι ο τοπικός μεταβολισμός των στεροειδών μέσα στα κύτταρα στόχους από τα ένζυμα αφυδρογονάσης 11β-υδροξυστεροειδών (11β-hydroxysteroid dehydrogenase, 11b-HSD). Υπάρχουν δύο τύπου 11β-HSD, τύπου 1 και 2.

Η 11β-HSD1 καταλύει την μετατροπή της ανενεργής κορτιζόνης στην ενεργή κορτιζόλη, επομένως αυξάνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα κορτιζόλης, πιθανώς συμβάλλοντας στην υπερευαισθησία των ιστών στα γλυκοκορτικοειδή. Εκφράζεται ευρέως, περισσότερο στο ήπαρ, αλλά επίσης και στους πνεύμονες, στον λιπώδη ιστό, στα αιμοφόρα αγγεία, στις ωοθήκες και στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Seckl & Walker, 2001) και υπόκειται ρύθμιση από ποικιλία παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των γλυκοκορτικοειδών, του στρες, των στεροειδών της αναπαραγωγής, κυτταροκινών και άλλων. Διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν την 11β-HSD1 στον λιπώδη ιστό αναπτύσσουν σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, συσσώρευση σπλαχνικού λίπους, υπερλιπιδαιμία, και αυξημένη αρτηριακή πίεση,

υποδεικνύοντας ότι αυτό το ένζυμο ίσως παίζει ρόλο στην ανάπτυξη μεταβολικού συνδρόμου που σχετίζεται με την σπλαχνική παχυσαρκία, μέσω αύξησης της διαθεσιμότητας της τοπικής κορτιζόλης στον λιπώδη ιστό (Masuzaki *et al.*, 2001, 2003). Είναι σίγουρο πάντως ότι η 11β-HSD1 αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη αντίστασης στην ινσουλίνη, παχυσαρκίας και άλλων μεταβολικών διαταραχών. Συνεπώς, φάρμακα που παρεμποδίζουν εκλεκτικά την 11β-HSD1 είναι σημαντικός στόχος για τη φαρμακευτική βιομηχανία (Buckingham, 2006).

Από την άλλη, η 11β-HSD2 δρα αποκλειστικά σαν αφυδρογονάση και καταλύει την μετατροπή της ενεργούς κορτιζόλης στην ανενεργή κορτιζόνη. Εκφράζεται στους κλασικούς ιστούς που αποκρίνονται στα αλατοκορτικοειδή, όπως οι νεφροί, το έντερο και οι ιδρωτοποιό αδένες (Masuzaki *et al.*, 2001). Αυτό το ένζυμο καθιστά τους ιστούς ικανούς να αποκριθούν στο αλατοκορτικοειδές αλδοστερόνη, προστατεύοντας τον υποδοχέα των αλατοκορτικοειδών MR από το να προσδεθεί στην περίσσεια της κυκλοφορούσας κορτιζόλης (Masuzaki *et al.*, 2001).

Έχει διαπιστωθεί ότι φλεγμονώδη σήματα, συμπεριλαμβανομένων των TNF και IL-1β, τροποποιούν την έκφραση των 11βHSD ενζύμων, επομένως αλλάζουν την κυτταρική ευαισθησία στα ενδογενή γλυκοκορτικοειδή (Woodward *et al.*, 2010).

Σηματοδότηση γλυκοκορτικοειδών

Σε κυτταρικό επίπεδο, οι δράσεις των γλυκοκορτικοειδών ρυθμίζονται από μια ενδοκυττάρια πρωτεΐνη, τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor, GR), του οποίου το γονίδιο ονομάζεται NRC3C1 (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1). Ο GR ανήκει στην υπεροικογένεια πυρηνικών trans-ενεργοποιητικών παραγόντων, που περιλαμβάνει υποδοχείς στεροειδών, στερολών, θυροειδών και ρετινοειδών (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Ο ανθρώπινος GR (human GR, hGR) αποτελείται από 777 αμινοξικά κατάλοιπα (Mangelsdorf *et al.*, 1995) και εκφράζεται άφθονα σε όλους σχεδόν τους ανθρώπινους ιστούς και όργανα (Androutsellis-Theotokis *et al.*, 2013). Λειτουργεί σαν ορμονοεξαρτώμενος μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων-στόχων που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή, δηλαδή περίπου το 3-10% του ανθρώπινου γονιδιώματος, και τα οποία μπορούν να επηρεαστούν από τον ενεργοποιημένο GR άμεσα ή έμμεσα (Galon *et al.*, 2002).

Τα λιπόφιλα γλυκοκορτικοειδή διαπερνούν με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη για να προσδεθούν στους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών. Μέσα στον πυρήνα, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών αλληλεπιδρά με το DNA και με άλλες πρωτεΐνες, για να ασκήσει τις βιολογικές του δράσεις. Η αφαίρεση του προσδέτη έχει ως αποτέλεσμα την πυρηνική εξαγωγή του υποδοχέα στο κυτταρόπλασμα, όπου και επανασυναρμολογείται το σύμπλοκο υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών – τσαπερονών, έτοιμο για άλλον ένα γύρο σύνδεσης με τον προσδέτη (Vandevyver *et al.*, 2001).

Μηχανισμοί δράσης γλυκοκορτικοειδών

Αφού τα βιοδιαθέσιμα γλυκοκορτικοειδή φθάσουν στα κύτταρα-στόχους, μπορούν να ακολουθήσουν δύο μηχανισμούς δράσης:

Μηχανισμοί γενωμικών δράσεων

Οι γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών κατηγοριοποιούνται σε τρεις γενικές ομάδες, ανάλογα με τον μηχανισμό που χρησιμοποιούν:

Μηχανισμός εξαρτώμενος από GREs

Μέσα στο κύτταρο ο ελεύθερος GR εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και σχηματίζει σύμπλοκο με τις τσαπερόνες θερμικού σοκ HSP90 και HSP70 (Heat Shock Proteins – HSP), αλλά και με άλλες πρωτεΐνες, όπως οι ανοσοφιλίνες (FK Binding Protein – FKBP). Μετά τη σύνδεση με τον προσδέτη (GC), ο ενεργοποιημένος GR αποχωρίζεται από το σύμπλοκο πρωτεϊνών, μετατοπίζεται στον πυρήνα και αλληλεπιδρά με τα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements – GREs). Τα GREs είναι ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA που εντοπίζονται στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων, των οποίων η μεταγραφή ρυθμίζεται θετικά ή αρνητικά από την πρόσδεση του συμπλόκου GC/GR (Strahle *et al.*, 1987; Luisi *et al.*, 1991).

Ακολούθως, ο υποδοχέας υποβάλλεται σε περαιτέρω δομικές τροποποιήσεις που οδηγούν σε συντονισμένη στρατολόγηση συνενεργοποιητών και συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Αυτό το μοριακό σύμπλοκο επηρεάζει τη δραστικότητα της RNA πολυμεράσης II και των βοηθητικών της παραγόντων, επομένως ρυθμίζει την έναρξη της μεταγραφής πολλών γονιδίων που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή (Nicolaidis *et al.*, 2010).

Μηχανισμός ανεξάρτητος από GREs

Εκτός από τη δράση τους ως θετικοί ή αρνητικοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι ενεργοποιημένοι GR μπορούν επίσης να ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση έμμεσα και ανεξάρτητα από τους GRE, μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλες πρωτεΐνες. Οι GR λοιπόν μπορούν να αλληλεπιδρούν φυσικά ή να συνδεθούν με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, χωρίς να έρχονται σε επαφή με το DNA (Ratman *et al.*, 2013). Η αλληλεπίδραση αυτή αλλάζει την ικανότητα του μεταγραφικού παράγοντα να προσδεθεί στο DNA, ή να προσελκύσει συν-ρυθμιστές και/ή το σύμπλοκο έναρξης μεταγραφής. Η πρόσδεση του GR στους παράγοντες αυτούς δεν είναι μια μονομερής σχέση, αλλά έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την ικανότητα του GR να ενεργοποιήσει τα γονίδια στόχους του (Ratman *et al.*, 2013).

Με αυτόν τον μηχανισμό, ο ενεργοποιημένος GR αλληλεπιδρά με τον p53, τους διαβιβαστές σημάτων και ενεργοποιητές μεταγραφής (Signal Transducer and Activator of Transcription, STATs) (Chrousos & Kino, 2005), αλλά και με τους προφλεγμονώδεις μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB και AP-1, γεγονός που εξηγεί τις αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών.

Επομένως, οι GR μπορούν να δρουν ως συνκαταστολείς ή συνενεργοποιητές άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως και ως μεταγραφικοί παράγοντες από μόνοι τους (Reichardt *et al.*, 1998; Barnes & Adcock, 2003; Wintermantel *et al.*, 2005).

Συνδυαστικός μηχανισμός

Ένας ακόμα μηχανισμός δράσης είναι η ρύθμιση μέσω της πρόσδεσης του GR σε σύνθετα στοιχεία, δηλαδή αλληλουχίες DNA που περιέχουν τόσο GRE όσο και κάποιο στοιχείο

απόκρισης σε μακρινό μεταγραφικό παράγοντα (Diamond *et al.*, 1990; Biddie *et al.*, 2011; Cain & Cidlowski, 2017)

Μηχανισμοί μη γενωμικών δράσεων

Εκτός των προαναφερθέντων γενωμικών δράσεων, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να επάγουν κάποιες από τις πλειοτροπικές τους δράσεις μέσα σε δευτερόλεπτα ή λεπτά. Οι δράσεις αυτές των γλυκοκορτικοειδών ονομάζονται μη γενωμικές, ακριβώς γιατί δεν απαιτούν μεταγραφή/μετάφραση ρυθμιζόμενη από τον GR. Μπορούν να επιδράσουν σε ποικίλα συστήματα, όπως το νευροενδοκρινικό, το καρδιαγγειακό και το ανοσοποιητικό (Ayroldi *et al.*, 2012; Song & Buttgereit, 2006; Lee *et al.*, 2012; Bellavance & Rivest, 2012). Μερικά παραδείγματα αποτελούν η άμεση καταστολή της έκκρισης της ACTH από την υπόφυση (Hinze & Hirschelmann, 2000), η ταχεία αύξηση της συχνότητας διεγερτικών μετασυναπτικών δυναμικών του υποκάμπου (Karst *et al.*, 2005), η ταχεία παροδική μείωση της αρτηριακής πίεσης και ταυτόχρονη αύξηση στη στεφανιαία και εγκεφαλική ροή του αίματος σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου ή εγκεφαλικό επεισόδιο (Hafezi-Moghadam *et al.*, 2002), και η ταχεία παρεμπόδιση της σηματοδότησης του υποδοχέα T κυττάρων μέσω παρεμβολής στο σύμπλοκο του υποδοχέα των T κυττάρων (T Cell Receptor, TCR) (Lowenberg *et al.*, 2006). Ακόμα, πολλές από τις μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών εμπλέκονται χωρίς αμφιβολία στην οξεία φάση της απόκρισης στο στρες (Groeneweg *et al.*, 2011; Prager & Johnson, 2009; Hammes & Levin, 2007).

Οι μη γενωμικές δράσεις πιστεύεται ότι ελέγχονται από μεμβρανικούς GR, που μετά την πρόσδεση του υποστρώματος, πυροδοτούν την έναρξη σηματοδοτικών καταρρακτών των κινασών, όπως της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνα (Mitogen Activated Protein Kinase, MAPK) (Ayroldi *et al.*, 2012; Song & Buttgereit, 2006; Lee *et al.*, 2012; Bellavance & Rivest, 2012).

Θεωρία των διαφορετικών μηχανισμών

Μια αμφιλεγόμενη θεωρία προτείνει ότι τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν ανοσοκατασταλτικές δράσεις κυρίως μέσω της πρόσδεσης του GR σε μεταγραφικούς παράγοντες όπως NF-κB και AP-1, που μειώνουν την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων (trans-καταστολή, transrepression), ενώ οι ανεπιθύμητες ενέργειες συμβαίνουν μέσω ενεργοποίησης γονιδίων από άμεση πρόσδεση του GR στα GREs (trans-ενεργοποίηση, transactivation). Η θεωρία ότι κλινικά ωφέλιμες και επιβλαβείς ιδιότητες των γλυκοκορτικοειδών διαχωρίζονται σε μοριακό επίπεδο προήλθε από παρατηρήσεις μεταλλαγμάτων του GR που δεν διμερίζονται και δεν επάγουν την έκφραση κάποιων γονιδίων με GREs, ωστόσο μπορούν να καταστείλουν τη δραστηριότητα των AP-1 και NF-κB (Tuckermann *et al.*, 1999).

Επιγενετική τροποποίηση μέσω γλυκοκορτικοειδών

Το στρες της καθημερινότητας και της γήρανσης συνεργάζονται σε μοριακό επίπεδο για να επάγουν επιγενετικές αλλαγές. Το στρες πυροδοτεί την έκκριση κορτιζόλης (cortisol, CORT), που προσδένεται στον GR και τον ενεργοποιεί ουσιαστικά σε κάθε σωματικό ιστό. Η πρόσδεση του GR σε GRE έχει αποδειχθεί ότι όχι μόνο ρυθμίζει την γονιδιακή μεταγραφή, αλλά επίσης επάγει μόνιμες αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA, σε νήσους CpG που βρίσκονται πάνω ή κοντά σε GREs (Klengel *et al.*, 2013; Thomassin *et al.*, 2001; Wiench *et al.*, 2011a; Wiench *et al.*, 2011b; Zannas *et al.*, 2015a). Γενικά, οι αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA που προκαλούνται από στρεσογόνους παράγοντες ή από τα γλυκοκορτικοειδή αντιπροσωπεύουν μιας μορφής μοριακή μνήμη που πιστεύεται ότι σχηματίζει επακόλουθες αποκρίσεις στα γλυκοκορτικοειδή και στους στρεσογόνους παράγοντες, επομένως συμβάλλουν στα άτομα με φαινοτύπους σχετιζόμενους με το στρες (Gassen *et al.*, 2017).

Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών

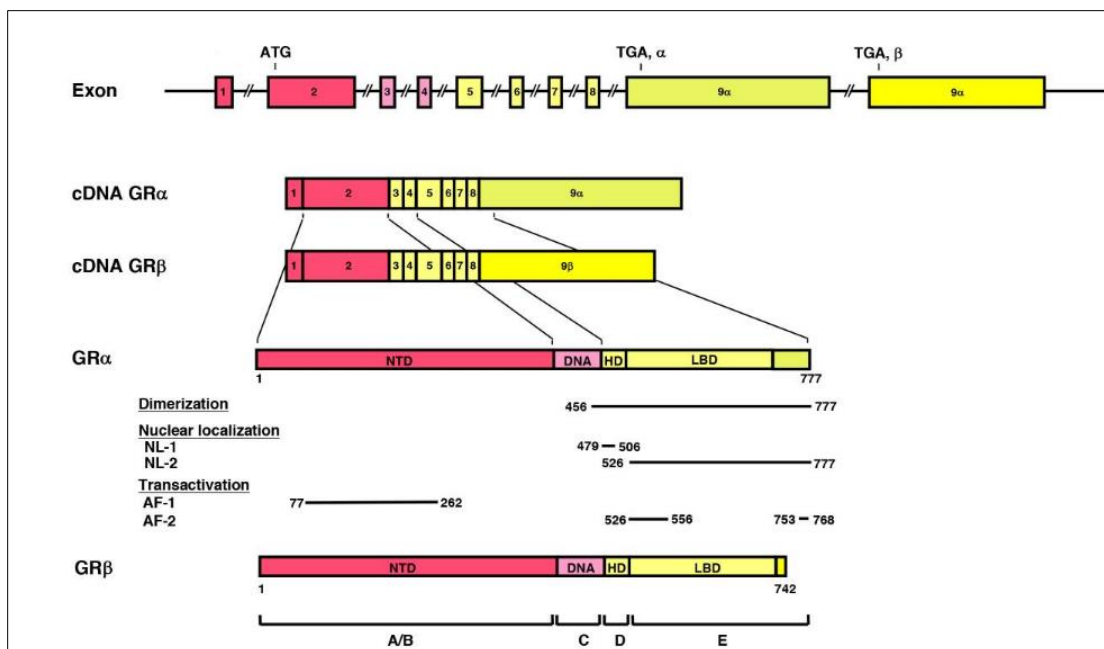
Οι πυρηνικοί ορμονικοί υποδοχείς (nuclear hormone receptors, NRs) σχηματίζουν μια υψηλά συντηρημένη πρωτεϊνική οικογένεια που παρατηρείται ακόμα και στα απλά μετάζωα. Ο GR είναι μέλος της υποοικογένειας των υποδοχέων στεροειδών ορμονών (steroid hormone receptor, SR) των NRs. Ο GR και ο κοντινότερος συγγενής του, MR, προέρχονται από διπλασιασμό του ίδιου προγονικού γονιδίου. Ο GR ενεργοποιείται από την κορτιζόλη, ενώ ο MR από την αλδοστερόνη και την δεοξυκορτικοστερόνη (deoxycorticosterone, DOC). Όμως, ο MR είναι επίσης ευαίσθητος στην κορτιζόλη, αν και λιγότερο από την αλδοστερόνη και την DOC (Bridgham *et al.*, 2006).

Δομή του ανθρώπινου γονιδίου GR και της πρωτεΐνης

Το ανθρώπινο GR γονίδιο αποτελείται από 9 εξόνια και βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (5q31.3) με αντίστροφη κατεύθυνση και με μήκος περίπου 160 kbs.

Εναλλακτικό μάτισμα του ανθρώπινου γονιδίου GR στο εξόνιο 9 παράγει δύο υψηλά ομόλογες ισομορφές του υποδοχέα, που ονομάζονται GRα και GRβ. Οι δυο ισομορφές είναι πανομοιότυπες μέχρι το αμινοξύ 727, αλλά έπειτα διαφοροποιούνται, με τον GRα να έχει επιπλέον 50 αμινοξέα (σύνολο 777 αμινοξέα), και τον GRβ να έχει επιπλέον 15 μη ομόλογα αμινοξέα (σύνολο 742 αμινοξέα, Chrousos & Kino, 2005). Τα μοριακά βάρη αυτών των ισομορφών είναι 97 και 94 kDalton, αντίστοιχα.

Ο GRα εκφράζεται πρακτικά σε όλα τα όργανα και ιστούς, βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, και αντιπροσωπεύει τον κλασικό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών που λειτουργεί σαν μεταγραφικός παράγοντας εξαρτώμενος απ'τον προσδέτη. Ο GRβ, που επίσης εκφράζεται άφθονα, δεν προσδένεται σε αγωνιστές των γλυκοκορτικοειδών και ασκεί επικρατούσα αρνητική δράση στη μεταγραφική ενεργότητα του GRα (Kino, 2017).



Εικόνα 3. Δομές γονιδιωματικού DNA, cDNA και πρωτεϊνών του hGR με τις λειτουργίες του κάθε τμήματος, και οι ισομορφές που παράγονται από το εναλλακτικό μάτισμα.

Το γονίδιο του hGR (*NR3C1*) αποτελείται από 10 εξώνια. Το 1ο είναι μια μη μεταφραζόμενη περιοχή (untranslated region, UTR), το 2ο κωδικοποιεί για την NTD (A/B), τα 3 και 4 για το DBD (C) και τα εξώνια 5-9 για την περιοχή-μεντεσέ (D) και LBD (E). Ο GR δεν έχει περιοχή F, σε αντίθεση με τους άλλους υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Το γονίδιο *NR3C1* περιέχει δύο τελικά εξώνια 9 (εξώνιο 9α και 9β), που ματίζονται εναλλακτικά για να παράγουν τον κλασικό GRα και την ισομορφή GRβ που δεν συνδέεται με τον προσδέτη. Επίσης αναφέρονται οι τοποθεσίες αρκετών λειτουργικών περιοχών. HD: ευκίνητη περιοχή (hinge domain), LBD: περιοχή σύνδεσης με τον προσδέτη (ligand-binding domain), NTD: N-τελική περιοχή (N-terminal domain), NL: σήμα πυρηνικής μετατόπισης (nuclear translocation signal) (Kino, 2017).

Όλοι οι SRs συμπεριλαμβανομένου του GR εμφανίζουν μια δομή που συνίσταται από πέντε έως έξι περιοχές:

- A/B - αμινοτελική ή ανοσογονική περιοχή (N-terminal domain, **NTD**)
- C - περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA binding domain, **DBD**)
- E - περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (ligand binding domain, **LBD**)
- D - ευκίνητη «περιοχή αρμού» (“hinge domain”)
- F - καρβοξυτελικό άκρο.

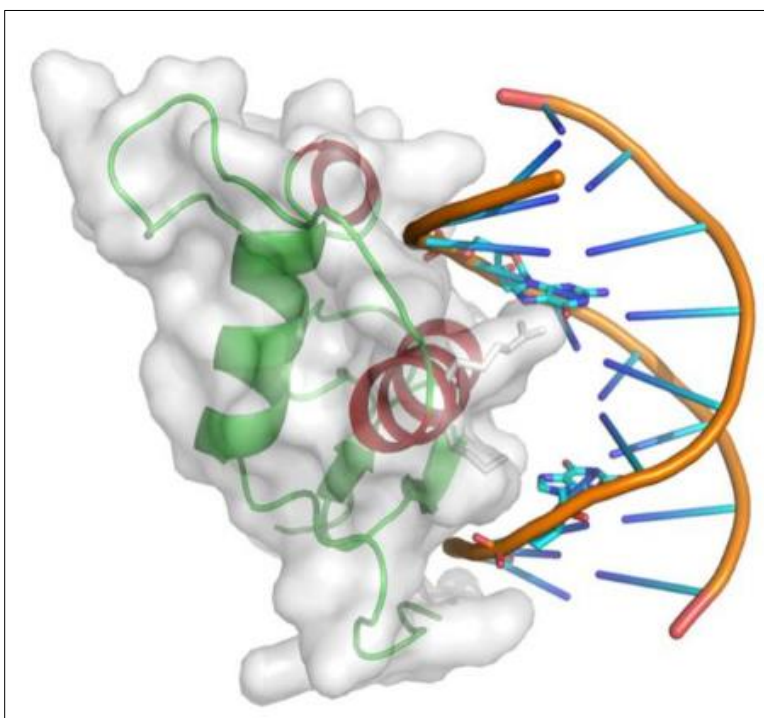
Ο GR δεν έχει περιοχή G. Επίσης, η περιοχή F εμφανίζει υψηλή ποικιλομορφία στους NRs (Kino, 2017).

Η περιοχή F ευθύνεται για το διμερισμό του υποδοχέα και οι περιοχές D (“hinge domain”) και E βοηθούν στην πυρηνική μετατόπιση.

Η NTD του GR (περιοχή A/B) αποτελείται από μια μεγάλη περιοχή trans-ενεργοποίησης της μεταγραφής, που ονομάζεται activation function-1 (AF-1) και διευκολύνει την επικοινωνία του GR με μόρια απαραίτητα για την έναρξη της μεταγραφής. Σε αυτά περιλαμβάνονται συν-ενεργοποιητές, τροποποιητές χρωματίνης και βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως η RNA πολυμεράση II και η πρωτεΐνη πρόσδεσης σε TATA κουτιά (TATA-binding protein, TBP)

(Warnmark *et al.*, 2000). Η AF-1 του GR είναι σχετικά ξεδιπλωμένη σε φάση ηρεμίας, ενώ σχηματίζει μια πολύπλοκη ελικοειδή δομή ως απόκριση σε συμπαράγοντες (Kumar *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2012). Μια αλλαγή στη διαμόρφωση της AF-1 λόγω του συμπαράγοντα TBP, μπορεί να διευκολύνει τη σύνδεση της AF-1 σε έναν άλλο συμπαράγοντα (Khan *et al.*, 2011).

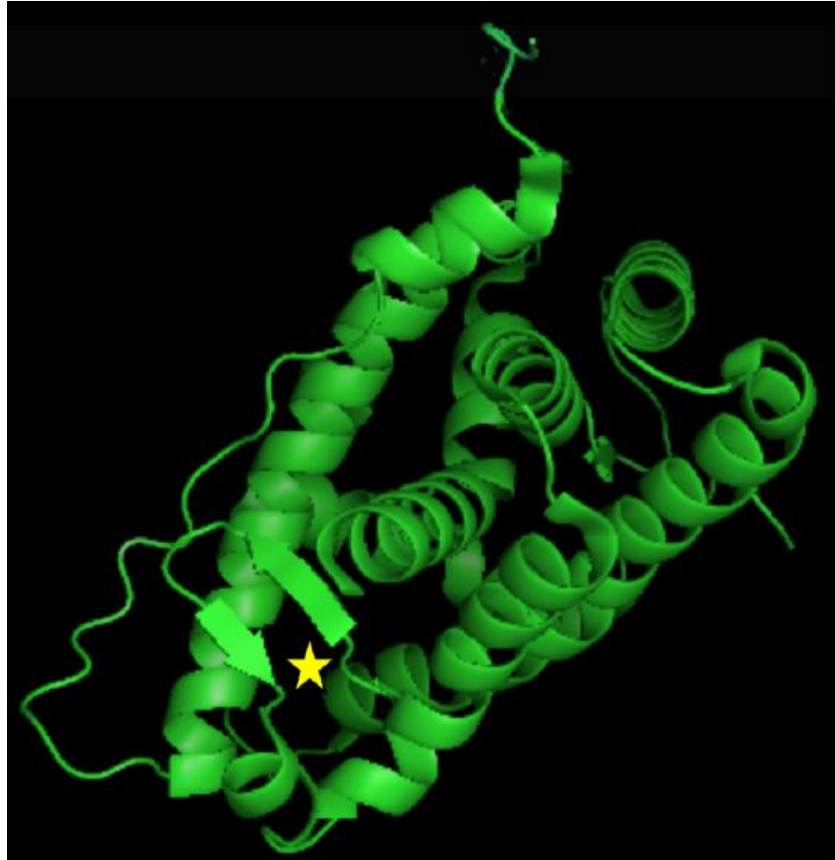
Η περιοχή C πρόσδεσης του DNA, DBD, περιέχει δύο δακτύλους ψευδαργύρου (Zinc finger) μέσω των οποίων ο GR προσδένεται στα GREs (Howard *et al.*, 1990; Schule *et al.*, 1990). Πρόκειται για την πιο συντηρημένη περιοχή της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων. Έχει δύο όμοια δομικά στοιχεία δακτύλων ψευδαργύρου, με το καθένα να έχει ένα ιόν ψευδαργύρου στο κέντρο στηριζόμενο από τέσσερα κατάλοιπα κυστεΐνης (C), και ακολουθείται από δύο α-έλικες. Το αμινοτελικό άκρο της πρώτης έλικας βρίσκεται στη μεγάλη αύλακα της δομής του DNA, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο της δεύτερης έλικας βρίσκεται πάνω από τη μικρή αύλακα (Εικόνα 4) (Kino, 2017).



Εικόνα 4. 3D μοντέλο της αλληλεπίδρασης μεταξύ του GR DBD και του GRE στο DNA. Η εικόνα ανήκει στον Dr. D.E. Hurt (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD)

Η περιοχή E του GR που συνδέεται στον προσδέτη, LBD, συνδέεται με τα γλυκοκορτικοειδή και παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του GR. Η κρυσταλλική δομή του LBD αναλύθηκε επιτυχώς με τη χρήση σημειακών μεταλλάξεων (Bledsoe *et al.*, 2002, Εικόνα 5). Οι έλικες 1 και 3 σχηματίζουν τη μία μεριά ενός “σάντουιτς” ελίκων, ενώ οι έλικες 7 και 10 σχηματίζουν την άλλη μεριά. Η μεσαία στρώση ελίκων (οι 4,5,8 και 9) βρίσκεται στο πάνω αλλά όχι στο κάτω μισό της πρωτεΐνης. Αυτή η διαμόρφωση δημιουργεί μια κοιλότητα στο κάτω μισό του LBD, που περιβάλλεται από τις έλικες 3, 4, 11 και 12, και λειτουργεί σαν μια “θήκη” για τον προσδέτη (Bledsoe *et al.*, 2002; Tanenbaum *et al.*, 1998; Williams & Sigler, 1998).

Αλληλεπίδραση του LBD με την HSP90 συμβάλλει στη διατήρηση της δομής που επιτρέπει στο LBD να συνδεθεί με τον προσδέτη. Η σύνδεση του προσδέτη επάγει αλλαγή στη διαμόρφωση του LBD και επιτρέπει στον GR να επικοινωνεί με αρκετά μόρια, όπως η ιμφορτίνη α του συστήματος πυρηνικής μεταφοράς, στοιχεία των συμπλόκων έναρξης της μεταγραφής και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που μεσολαβούν στις δράσεις του GR που εξαρτώνται από τα γλυκοκορτικοειδή. Η LBD επίσης περιέχει μια περιοχή trans-ενεργοποίησης, που ονομάζεται AF-2, της οποίας η λειτουργία εξαρτάται από τον προσδέτη (Kino, 2017).



Εικόνα 5 Δομή του GR LBD

Η κοιλότητα για τη σύνδεση του προσδέτη σημειώνεται με το κίτρινο αστέρι. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα MacPyMOL χρησιμοποιώντας την Protein Data Bank του RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). (Kino, 2017)

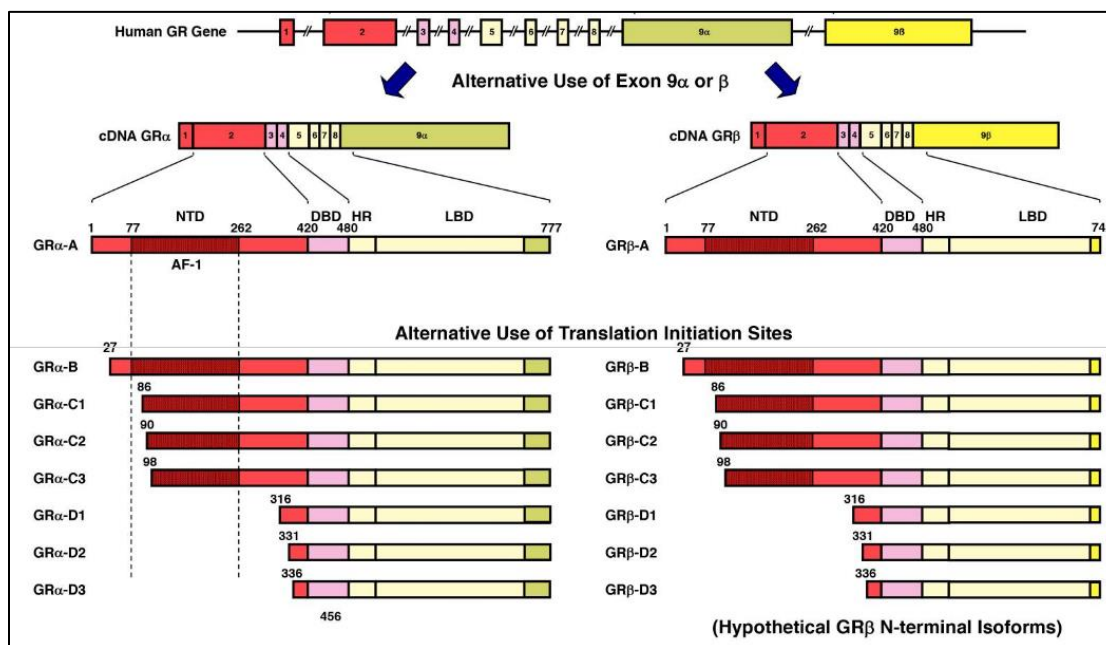
Μεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση των ισομορφών του GR

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, το ανθρώπινο γονίδιο *GR* μεταγράφεται σε δύο mRNAs μέσω εναλλακτικής χρήσης του εξωνίου 9α και 9β, και παράγει δύο παραλλαγές. Το ανθρώπινο GRα mRNA εκφράζει πολλαπλές ισομορφές με τη χρήση τουλάχιστον 7 εναλλακτικών σημείων έναρξης της μεταγραφής (Lu & Cidlowski, 2005, Εικόνα 6). Εφόσον ο ανθρώπινος GRβ (human GRβ, hGRβ) μοιράζεται τμήμα mRNA με τον hGRα (Hollenberg *et al.*,

1985), η παραλλαγή hGRβ φαίνεται επίσης να μεταφράζεται μέσω των ίδιων οκτώ διαφορετικών σημείων έναρξης μεταγραφής.

Οι ισομορφές του hGRα παράγονται από προβληματική (leaky) ριβοσωμική σάρωση και/ή ριβοσωμική παρέκκλιση από το αρχικό σημείο έναρξης της μεταγραφής και ονομάζονται GRα-B / C1 / C2 / C3 / D1 / D2 / D3 (Lu & Cidlowski, 2005) και προφανώς έχουν διαφορετικό μήκος στις NTD τους, αλλά τις ίδιες DBD και LBD. Σε σύγκριση με τον αυθεντικό GRα-A, οι ισομορφές C2 και C3 έχουν ισχυρότερες μεταγραφικές λειτουργίες σε έναν συνθετικό υποκινητή που καθοδηγείται από GRE, ενώ οι ισομορφές D1, D2 και D3 επιδεικνύουν ασθενέστερες λειτουργίες (Lu & Cidlowski, 2005).

Όλες οι ισομορφές του hGRα μετατοπίζονται μέσα στον πυρήνα ως απόκριση στον προσδέτη, ενώ διανέμονται διαφορετικά στο κυτταρόπλασμα και/ή στον πυρήνα απουσία προσδέτη, και επιδεικνύουν διακριτά μοτίβα trans-ενεργοποίησης ή trans-καταστολής στη γονιδιακή έκφραση (Lu & Cidlowski, 2005; Wu *et al.*, 2013).



Εικόνα 6 Οι ισομορφές του GR που παράγονται μέσω εναλλακτικού ματίσματος ή χρήσης διαφορετικών σημείων έναρξης της μεταγραφής. Το ανθρώπινο γονίδιο του GR (NR3C1) περιέχει δύο τερματικά εξώνια 9 (9α και 9β) που ματίζονται εναλλακτικά για να παράγουν τον κλασικό GR (GRα-A) και τον GRβ-A. Οι καρβοξυτελικές σκούρες κίτρινες περιοχές στον GRα-A και στον GRβ-A δείχνουν τις ακριβείς αναλογίες τους. Με τη χρήση τουλάχιστον 8 διαφορετικών σημείων έναρξης της μεταγραφής που βρίσκονται στη NTD, το γονίδιο *NR3C1* παράγει πολλαπλές ισομορφές του GR που ονομάζονται από το A μέχρι το D (A, B, C1-C3 και D1-D3) με διακριτές μεταγραφικές λειτουργίες στα γονίδια που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή. Εφόσον ο GRα και ο GRβ μοιράζονται ένα κοινό τμήμα mRNA που περιέχει τα ίδια σημεία έναρξης μεταγραφής, το mRNA της παραλλαγής GRβ φαίνεται να μεταφράζεται μέσω των ίδιων σημείων έναρξης μεταγραφής και να παράγει 8 ισομορφές με διαφορετικά μήκη NTD.

Τροποποιημένο από Chrousos & Kino, 2005; Kino & Chrousos, 2002.

Το ανθρώπινο γονίδιο *GR*, εκτός από τα οκτώ διαφορετικά σημεία έναρξης μεταγραφής, έχει και έντεκα διαφορετικούς υποκινητές με εναλλακτικά πρώτα εξώνια (Presul

et al., 2007; Turner & Muller, 2005. Επομένως, το ίδιο γονίδιο μπορεί να παράγει έντεκα διαφορετικά μετάγραφα από έντεκα διαφορετικούς υποκινητές, οι οποίοι κωδικοποιούν για τις ίδιες πρωτεΐνες GR και μοιράζονται το εξώνιο 2 με το κωδικόνιο έναρξης μεταγραφής ATG (Kino, 2017).

Η μεθυλίωση του υποκινητή στο ανθρώπινο γονίδιο GR είναι ένας από τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τη λειτουργικότητα των πολλαπλών υποκινητών. Το παιδικό τραύμα, που επηρεάζει την ανάπτυξη οριακής διαταραχής προσωπικότητας μέσω επιρροής στον άξονα HPA, αλλάζει τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA στον υποκινητή του *hGR* στον εγκέφαλο (Martin-Blanco *et al.*, 2014). Αυξημένη μεθυλίωση στον υποκινητή του *hGR* βρίσκεται επίσης στον υπόκαμπο του εγκεφάλου ασθενών με μείζονα κατάθλιψη (Na *et al.*, 2014).

Με τη χρήση πολλών εναλλακτικών μεταφραστικών ισομορφών GR που εκφράζονται από διαφορετικούς υποκινητές, ο ανθρώπινος GR φαίνεται να σχηματίζει τουλάχιστον 256 διαφορετικούς συνδυασμούς ομο- και ετερο-διμερών, με ποικίλα επίπεδα έκφρασης και μεταγραφικές λειτουργίες. Η αξιοσημείωτη πολυπλοκότητα στην μεταγραφή και μετάφραση του ανθρώπινου γονιδίου GR επιτρέπει σε κύτταρα και ιστούς να αποκρίνονται διαφορετικά στις συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών στην κυκλοφορία, ανάλογα τις ανάγκες του εκάστοτε ιστού (Chrousos & Kino, 2005).

Εφόσον σε αυτό το σημείο έχει γίνει η διάκριση μεταξύ του λειτουργικού υποδοχέα GR α και του μη λειτουργικού GR β , ο λειτουργικός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών, που έως τώρα αναφερόταν ως GR, θα αναφέρεται ως GR α . Γεγονότα που ισχύουν για κάθε ισομορφή GR, θα αναφέρονται στον GR γενικά.

Επιρροή μη κωδικοποιών (non coding) RNA στον GR

Το ανθρώπινο γονιδίωμα εκφράζει μεγάλο αριθμό μη κωδικοποιών RNA εκτός από εκείνα που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Τα ncRNA παράγονται επίσης από mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά μέσω επώασης με νουκλεάσες, όπως τα 3' UTR RNA (Mercer *et al.*, 2011). Πρόσφατα, κάποιες από αυτές τις διακριτές κλάσεις των ncRNA αποκαλύφθηκε ότι ρυθμίζουν την αποδόμηση mRNA/πρωτεϊνών και τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR α και άλλων πυρηνικών υποδοχέων (Kino, 2017).

Μέσα σε αυτά τα ρυθμιστικά RNAs συγκαταλέγεται και το εξειδικευμένο στην παύση της ανάπτυξης 5 (growth arrest-specific 5, Gas5). Πρόκειται για ένα long non-coding RNA, το οποίο συσσωρεύεται σε κύτταρα των οποίων η ανάπτυξη σταματά λόγω έλλειψης θρεπτικών ή παραγόντων αύξησης (Kino & Marr, 2016). Το Gas5 λειτουργεί σαν καταστολέας του GR α και κάποιων άλλων υποδοχέων στεροειδών (Kino *et al.*, 2010), μιμούμενο τους GREs. Προσδένεται λοιπόν στο DBD του GR α και συμπεριφέρεται σαν GRE, επομένως συναγωνίζεται με τα πραγματικά DNA GREs για την πρόσδεση στον GR α . Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι ο Gas5 είναι ένας καταστολέας του GR α , που επηρεάζει την κυτταρική επιβίωση και τις μεταβολικές δραστηριότητες κατά την έλλειψη τροφής, μέσω ρύθμισης της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR α .

Η ισομορφή GRβ

Η ισομορφή GRβ του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, που εκφράζεται από το ανθρώπινο γονίδιο *GR* μέσω εναλλακτικής χρήσης του εξωνίου 9β, είναι γνωστό ότι έχει επικρατούσα αρνητική δράση στην κλασική μεταγραφική δραστηριότητα που επάγεται από τον GRα (Bamberger *et al.*, 1995; Kino *et al.*, 2009). Αυτή η ισομορφή αναγνωρίστηκε πρώτη φορά στον άνθρωπο, και πρόσφατα αναφέρθηκε η ύπαρξή της στο ψάρι-ζέβρα, στους μύες και στους επίμυες (Hollenberg *et al.*, 1985; Schaaf *et al.*, 2008; Otto *et al.*, 1997; DuBois *et al.*, 2013).

Εφόσον ο hGRβ μοιράζεται τα πρώτα 727 αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο με τον hGRα (Hollenberg *et al.*, 1985; Kino & Chrousos, 2004, Εικόνα 6), ο hGRβ έχει κοινά NTD και DBD με τον hGRα, αλλά μοναδικό LBD. Το αμινοξύ 727 των hGRα και hGRβ, στο οποίο αρχίζει η απόκλιση, βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της α-έλικας 10 στο LBD του hGRα, επομένως το LBD του hGRβ δεν έχει τις α-έλικες 11 και 12 του hGRα. Καθώς αυτές οι έλικες είναι σημαντικές για τον σχηματισμό της κοιλότητας σύνδεσης του προσδέτη και για τη δημιουργία της AF-2 επιφάνειας μετά την σύνδεση του προσδέτη (Bledsoe *et al.*, 2002), **ο hGRβ δεν μπορεί να σχηματίσει μια ενεργή κοιλότητα για τον προσδέτη, δεν συνδέεται με γλυκοκορτικοειδή και, έτσι, δεν ρυθμίζει άμεσα τους υποκινητές των γονιδίων που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή.** Απουσία του hGRβ LBD, ο συντετμημένος hGR που αποτελείται από τη NTD και την DBD είναι μεταγραφικά ενεργός στους υποκινητές που περιέχουν GRE (Charmandari *et al.*, 2005), άρα το hGRβ LBD κάπως περιορίζει τη μεταγραφική λειτουργία των άλλων περιοχών του μορίου στους GRE-ελεγχόμενους υποκινητές (Kino, 2017).

Η επικρατούσα αρνητική δράση του GRβ παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε προσωρινές διαμολύνσεις με γονίδια αναφοράς που κατευθύνονταν από GRE (Bamberger *et al.*, 1995; Oakley *et al.*, 1999), και ακολούθως επιβεβαιώθηκε σε ενδογενή γονίδια απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή, όπως η φωσφατάση 1 πρωτεϊνικών κινάσων που ενεργοποιείται από μιτογόνα (Mitogen-activated protein Kinase Phosphatase-1, MKP-1) (Li *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005; Kino *et al.*, 2009). Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι ο GRβ περιορίζει την καταστολή των γονιδίων του TNF-α και της IL-6 λόγω γλυκοκορτικοειδών (Li *et al.*, 2006).

Έχουν αναφερθεί πολλοί μηχανισμοί που επεξηγούν αυτή τη δράση του GRβ, μερικοί εκ των οποίων είναι:

- ο ανταγωνισμός για την πρόσδεση στα GRE μέσω των κοινών DBD
- ο ετεροδιμερισμός με τον GRα
- η καταστολή του συνενεργοποιητή, μέσω του συντηρημένου τομέα AF-1 (Bamberger *et al.*, 1995; Charmandari *et al.*, 2005; Oakley *et al.*, 1999).

Όλοι αυτοί οι διαφορετικοί μηχανισμοί δράσης φαίνεται να είναι λειτουργικοί, ανάλογα τους υποκινητές και τους ιστούς που επηρεάζονται από αυτή την ισομορφή του GR. Πρόσφατα, ο hGRβ αποδείχθηκε ότι διαθέτει ενδογενή μεταγραφική ιδιότητα ανεξάρτητη από την επικρατούσα αρνητική δράση του στην GRα-επαγόμενη μεταγραφική δράση (Kino *et al.*, 2009a, b; Lewis-Tuffin *et al.*, 2007). Μέσα στα κύτταρα, ο hGRβ μπορεί να εντοπιστεί τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα (de Castro *et al.*, 1996; Oakley *et al.*, 1996).

Οι GRβ στον ποντικό (mouse, m) και πρόσφατα και στον αρουραίο (rat, r) αποδείχθηκε ότι παράγονται λόγω μη έκφρασης ιντρονίου, κάτι που ίσως αποτελεί γενικό μηχανισμό για την έκφραση αυτής της ισομορφής του υποδοχέα στους οργανισμούς, γιατί ο ίδιος μηχανισμός

παρατηρείται και στο ψάρι-ζέβρα (zebrafish). Αντιθέτως, ο μηχανισμός έκφρασης του GRβ μέσω ματίσματος, που παρατηρείται στον ανθρώπινο υποδοχέα, είναι κάπως μοναδικός (DuBois *et al.*, 2013; Hinds *et al.*, 2010). Εντούτοις, ο GRβ στο ψάρι-ζέβρα, στο ποντίκι και στον αρουραίο έδειξε τις ίδιες λειτουργικές ιδιότητες με εκείνες του hGRβ: αδυναμία πρόσδεσης σε γλυκοκορτικοειδή, επικρατούσα αρνητική δράση στους zGRα, mGRα και rGRα, αντίστοιχα που επάγεται από τους GRE ελεγχόμενους υποκινητές, και μια πολύ όμοια κατανομή στους ιστούς όπως ο hGRβ (Schaaf *et al.*, 2008; Hinds *et al.*, 2010). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η εξέλιξη έχει επιτρέψει την ανάπτυξη και τη διατήρηση τέτοιων εναλλακτικών πυρηνικών υποδοχέων, πιθανότατα γιατί παίζουν σημαντικούς βιολογικούς ρόλους.

Βιολογικές δράσεις του GRβ

Ο GRβ μετριάζει την έκφραση του ηπατικού γονιδίου *PEPCK* και της ηπατικής γλυκονογένεσης, ενώ ενεργοποιεί την έκφραση του *STAT1* μέσω GREs. Το δεύτερο εύρημα υποδεικνύει ότι ο GRβ μπορεί να ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση με την πρόσδεσή του στους κλασικούς GRE, σε αντίθεση με τα προηγούμενα ευρήματα που αποκτήθηκαν με γονίδια αναφοράς που καθοδηγούνταν από GRE (Kino, 2017).

Αρκετές κλινικά προσαρμοσμένες έρευνες προτείνουν ότι ο GRβ ευθύνεται για την ανάπτυξη ιστοειδικής αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή σε ποικίλες διαταραχές, οι περισσότερες εκ των οποίων σχετίζονται με προβληματική ρύθμιση της ανοσολογικής λειτουργίας. Οι διαταραχές αυτές περιλαμβάνουν το ανθεκτικό στα γλυκοκορτικοειδή άσθμα, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο, την αγκυλωτική σπονδυλίτιδα, την χρόνια λεμφογενή λευχαιμία και τον ρινικό πολύποδα (Goleva *et al.*, 2006; Derijk *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005; Longui *et al.*, 2000; Pujols *et al.*, 2003; Shahidi *et al.*, 1999; Piotrowski *et al.*, 2007). Σε αυτές τις έρευνες, ποικίλα ανοσολογικά κύτταρα εκφράζουν αυξημένα επίπεδα GRβ, που σχετίζονται με μειωμένη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή. Ιικές μόλυνσεις επίσης ενεργοποιούν την έκφραση του GRβ: για παράδειγμα, η έκφρασή του στα περιφερικά μονοκύτταρα επάγεται ισχυρά στα παιδιά με βρογχιολίτιδα που προκαλείται από προσβολή με τον ιό του αναπνευστικού συγκυτίου (syncytial virus), και τα επίπεδα έκφρασής του συσχετίζονται με τη βαρύτητα της ασθένειας (Diaz *et al.*, 2012). Αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως οι IL-1, -2, -4, -7, -8 και -18, ο TNFα, και οι ιντερφερόνες α και γ ίσως να ευθύνονται για την αυξημένη έκφραση του GRβ στα κύτταρα από ασθενείς με αυτές τις παθολογικές καταστάσεις, καθώς αυτές οι κυτταροκίνες πειραματικά επάγουν την έκφραση του GRβ στα λεμφοκύτταρα, στα ουδετερόφιλα ή τα λεία μυϊκά κύτταρα της αναπνευστικής οδού (Leung *et al.*, 1997; Webster *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2003; Strickland *et al.*, 2001; Orii *et al.*, 2002; Tliba *et al.*, 2008; Goulding, 2004).

Επιπλέον, η παρουσία ενός νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού στο 3' αμετάφραστο άκρο του hGRβ mRNA (rs6198G αλληλίο) αυξάνει τη σταθερότητά του και προκαλεί αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης του GRβ. Ο πολυμορφισμός αυτός σχετίστηκε με αυξημένα περιστατικά ρευματοειδούς αρθρίτιδας, συστηματικού ερυθηματώδη λύκου, αυξημένης αρτηριακής πίεσης, ισχαιμικής καρδιακής πάθησης και ρινικής μεταφοράς *Staphylococcus aureus* (Derijk *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2009; van den Akker *et al.*, 2006, 2008), πιθανώς μέσω παρεμπόδισης των δράσεων των γλυκοκορτικοειδών λόγω αυξημένων συγκεντρώσεων GRβ. Αυτές οι κλινικές αποδείξεις υποστηρίζουν περαιτέρω ότι ο GRβ έχει μια επικρατούσα

αρνητική δράση στην GRα-επαγόμενη μεταγραφή μέσα στο ανθρώπινο σώμα, λειτουργώντας σαν αρνητικός ρυθμιστής των δράσεων των γλυκοκορτικοειδών στους τοπικούς ιστούς (Kino, 2017).

Ασθένειες που σχετίζονται με τον υποδοχέα hGR

Πρωτογενής Γενικευμένη Αντίσταση στα Γλυκοκορτικοειδή (σύνδρομο Chrousos)

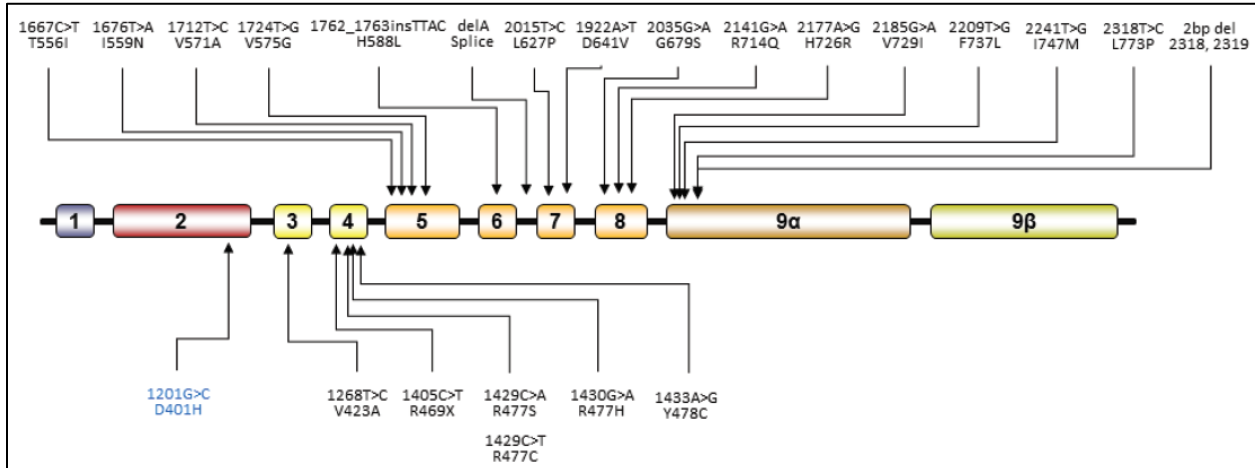
Φυσικές παθολογικές μεταλλάξεις του γονιδίου *GR*, έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του συνδρόμου οικογενούς ή σποραδικής γενικευμένης αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή (Primary Generalized Glucocorticoid Resistance, PGGR ή σύνδρομο Chrousos. Για να αντιρροπήσουν τη μειωμένη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή, ασθενείς με τη νόσο παρουσιάζουν αντισταθμιστική αύξηση των συγκεντρώσεων κορτιζόλης και ACTH, οι οποίες διατηρούν τον κίρκαδικό ρυθμό και την κατάλληλη απόκριση στους στρεσογόνους παράγοντες, και αντίσταση του άξονα HPA στην καταστολή από δεξαμεθαζόνη, αλλά δεν εμφανίζουν κλινικές εκδηλώσεις υπερκορτιζολαιμίας (Chrousos *et al.*, 1982; Vingerhoeds *et al.*, 1976). Η υπερέκκριση ACTH προκαλεί αυξημένη παραγωγή επινεφριδιακών στεροειδών με αλατοκορτικοειδική και ανδρογονική δράση. Το πρώτο εξηγεί τα συμπτώματα και τις ενδείξεις περίσσειας αλατοκορτικοειδών, όπως η υπέρταση και η υποκαλιαιμική αλκάλωση. Το δεύτερο ευθύνεται για τις κλινικές εκδηλώσεις της περίσσειας ανδρογόνων, όπως αμφίβολα γεννητικά όργανα και πρόωμη εφηβεία, ακμή, υπερτρίχωση και υπογονιμότητα και στα δύο φύλα, ανδρικού-τύπου αλωπεκία, ανωμαλίες στην έμμηνο ρύση και μειωμένη έως και καθόλου παραγωγή ώριμων ωαρίων στις γυναίκες, και ολιγοσπερμία στους άνδρες. Το κλινικό εύρος της πάθησης είναι μεγάλο και ένας μεγάλος αριθμός ασθενών μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί, επιδεικνύοντας μόνο βιοχημικές εκδηλώσεις (Charmandari *et al.*, 2008).

Έχουν αναφερθεί πάνω από 20 συγγενείς και σποραδικές περιπτώσεις με ανωμαλίες στον αριθμό των GR, στη συγγένεια του GR για τα γλυκοκορτικοειδή, στη σταθερότητα και στη μετατόπιση στον πυρήνα (Lamberts *et al.*, 1986, 1992; Nawata *et al.*, 1987; Iida *et al.*, 1985; Vecsei *et al.*, 1989; Hurley *et al.*, 1991; Karl *et al.*, 1993, 1996; Malchoff *et al.*, 1993).

Σύνδρομο υπερευαισθησίας λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο του *GR*

Ένας ασθενής παρουσίασε μια ετερόζυγη μετάλλαξη στην NTD του GRα, που αντικαθιστά το ασπαρτικό οξύ στη θέση 401 από ιστιδίνη (D401H) (Charmandari *et al.*, 2008). Τα συμπτώματα συνάδουν με την υπερευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή, και είναι σε συμφωνία με τα *in vitro* αποτελέσματα, όπου ο μεταλλαγμένος υποδοχέας hGRαD401H έδειξε αύξηση 2.4 φορές στην ικανότητά του να ενεργοποιεί τους υποκινητές που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή. Αυτή η κατάσταση είναι το ακριβώς αντίθετο του συνδρόμου Chrousos. Παρόλο που δε συμβαίνει στον άνθρωπο, μια ετερόζυγη υποκατάσταση στον χοίρο που αντικαθιστά την αλανίνη στο αμινοξύ 610 με βαλίνη (A610V) στο LBD του GR του χοίρου

προκαλεί έναν φαινότυπο προσθήκης λειτουργίας (gain-of-function), αυξάνοντας τη συγγένεια του υποδοχέα στα γλυκοκορτικοειδή (Murani *et al.*, 2012)



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση των γνωστών μεταλλάξεων του γονιδίου NR3C1 που προκαλούν αλλαγές στην ευαισθησία των ιστών στα γλυκοκορτικοειδή. Οι μεταλλάξεις που σημειώνονται με σκούρο χρώμα σχετίζονται με το σύνδρομο Χρούσος ή PGGR, ενώ η μετάλλαξη D401H (μπλε) είναι η μόνη που σχετίζεται με το σύνδρομο PGGH (Nicolaidis & Charmandari, 2017).

Ο ρόλος του GRβ στην αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή

Ο Leung και η ομάδα του έχουν δείξει ότι ασθενείς με άσθμα ανθεκτικό στα γλυκοκορτικοειδή παρουσίαζαν αλλαγές στην πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών στον υποδοχέα GR. Για αυτό το αποτέλεσμα ενοχοποιήθηκε η αυξημένη έκφραση του GRβ, έπειτα από πειράματα με COS-7 κύτταρα (Bamberger *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 1997).

Βρέθηκε επίσης ότι η έκφραση του GRβ επαγόταν από συνδυασμό κυτταροκινών (IL-2 και IL-4) στα κύτταρα περιφερικού αίματος, σε υγιή άτομα, και επανερχόταν στα φυσιολογικά επίπεδα σε κύτταρα με αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή που επώαστηκαν χωρίς κυτταροκίνες. Ο μηχανισμός με τον οποίο οι κυτταροκίνες αυτές προωθούσαν την έκφραση του GRβ δεν είχε βρεθεί ακόμα (Leung *et al.*, 1997).

Αυτές οι παρατηρήσεις έχουν σημαντικές εφαρμογές στη μελέτη της παθογένειας κλινικών καταστάσεων που σχετίζονται με αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή. Η παρατήρηση ότι η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού επάγει την έκφραση του GRβ και άρα μειώνει τις λειτουργικές αποκρίσεις στα γλυκοκορτικοειδή, συμφωνεί με την ιδέα ότι η φλεγμονή μειώνει τις αποκρίσεις στα ενδογενή και εξωγενή γλυκοκορτικοειδή (Leung *et al.*, 1997).

Σκοπός

Ο σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να μελετηθεί συστηματικά για πρώτη φορά ο ρόλος και να προσδιοριστούν οι κλινικές επιπτώσεις της αυξημένης έκφρασης του hGRβ in vivo στη λειτουργία των επινεφριδίων, του καρδιοκυκλοφορικού και του ανοσοποιητικού συστήματος. Η μελέτη αυτή αναμένεται να βοηθήσει στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας παθήσεων που χαρακτηρίζονται από γενικευμένη ή/και ιστοειδική αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή. Τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να συμβάλλουν στον μελλοντικό προσδιορισμό διαγνωστικών βιοδεικτών για την ανίχνευση ασθενών με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διαταραχής της ευαισθησίας των ιστών στα γλυκοκορτικοειδή ή/και προβλήματα με την απόκριση σε θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή.

Δημιουργήθηκαν, λοιπόν, διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών με δυνατότητα επαγωγής της έκφρασης του hGRβ σε διάφορους ιστούς, μέσω του συστήματος της τετρακυκλίνης (Tet On/Off). Μέσω του συστήματος αυτού, ρυθμίζεται αυστηρά η έκφραση του hGRβ με τη χορήγηση δοξυκυκλίνης. Επίσης, με αυτόν τον «διακόπτη» έκφρασης, εξασφαλίζεται η δημιουργία λειτουργικών διαγονιδιακών σειρών, διότι η συνεχής έκφραση του hGRβ πιθανόν να αποβεί θνησιγόνος για τα διαγονιδιακά ζώα.

Τα μοντέλα ποντικών υπερεκφράζουν τον hGRβ, παρεμποδίζοντας τη δράση του hGRα, επομένως απορρυθμίζουν τη λειτουργία του άξονα HPA και μαζί όλα τα συστήματα τα οποία ρυθμίζουν τα γλυκοκορτικοειδή.

Σκοπός αυτών των πειραμάτων είναι να διευκρινισθούν τα ακόλουθα:

1. Πώς επηρεάζεται η έκφραση των γονιδίων CYP11A και PNMT στα επινεφρίδια και των 11β-HSD1, PEPCK, TAT και G6Pase στο ήπαρ των ποντικών;
2. Παρατηρούνται αλλαγές στις συγκεντρώσεις των προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών παραγόντων;

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για όλες τις διαδικασίες ακολουθήθηκαν τα προτεινόμενα πρωτόκολλα της εκάστοτε εταιρείας. Όλα τα πειράματα σε ποντίκια πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους Εθνικούς και Ιδρυματικούς κανόνες δεοντολογίας για τη χρήση πειραματοζώων στην έρευνα.

Οι υπό μελέτη μύες φιλοξενήθηκαν στην μονάδα ζωικών προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα (Animal Welfare Assurance #A5736-01, Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW), National Institutes of Health (NIH). Εξετάστηκαν αρσενικά και θηλυκά ζώα σε όλες τις ομάδες αντίστοιχα.

Σύνοψη της πειραματικής διαδικασίας

Παρακάτω αναφέρεται συνοπτικά η πειραματική διαδικασία, με τελικό σκοπό τη μελέτη της υπερέκφρασης του hGRβ *in vivo* σε ποντίκια:

- Δημιουργία κατασκευών του διαγονιδίου του ανθρώπινου GRβ και του ανάστροφου διενεργηγοποιητή rtTA.
- Μικροένεση για την εισαγωγή των κατασκευών σε ωάρια στο στάδιο του ενός κυττάρου και εμφύτευση σε ψευδοέγκυα θηλυκά.
- Γέννες και γονοτύπηση των απογόνων με PCR και στύπωμα κατά Southern.
- Διασταύρωση των ποντικών-ιδρυτών που φέρουν τα γονίδια ομόζυγα, με ποντίκια αγρίου τύπου (C57B/6 – “black 6”).
- Γονοτύπηση των απογόνων με PCR για το αν φέρουν κανένα, ένα ή και τα δύο γονίδια.
- Διαχωρισμός των ποντικών σε τέσσερις βασικές ομάδες προς μελέτη:
 - Δεν φέρουν κανένα διαγονίδιο (- / -)
 - Φέρουν το διαγονίδιο του rtTA αντίστροφου διενεργηγοποιητή (- / rtTA)
 - Φέρουν το διαγονίδιο του hGRβ (hGRβ / -)
 - Φέρουν και τα δύο διαγονίδια (hGRβ / rtTA)
- Τα μισά ποντίκια κάθε ομάδας εκτέθηκαν σε δοξυκυκλίνη και τα άλλα μισά όχι, με αποτέλεσμα να προκύψουν τελικά οκτώ ομάδες ποντικών, εκ των οποίων μία ήταν η επιθυμητή (Tet On), ενώ οι υπόλοιπες αποτελούσαν επιβεβαίωση ότι το σύστημα λειτουργεί με τον σωστό τρόπο:

	Παρουσία διαγονιδίων			
Doxycycline	Κανένα διαγονίδιο	Διαγονίδιο hGRβ	Διαγονίδιο rtTA	Και τα δύο διαγονίδια
Όχι	(- / -) -	(hGRβ / -) -	(- / rtTA) -	(hGRβ / rtTA) -
Ναι	(- / -) +	(hGRβ / -) +	(- / rtTA) +	(hGRβ / rtTA) +

Πίνακας 1

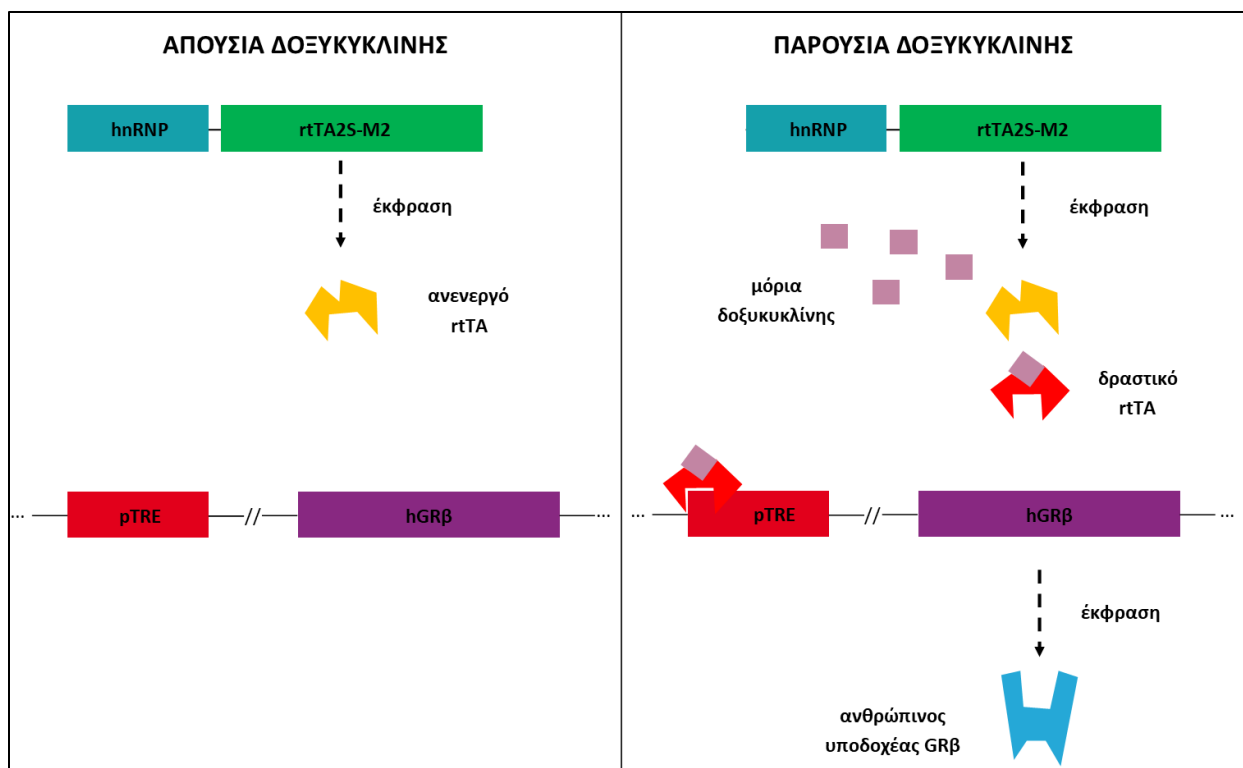
- Προσθήκη δοξυκυκλίνης στο πόσιμο νερό των ποντικών των τεσσάρων ομάδων για 2 εβδομάδες στην ηλικία του ενός μήνα, με σκοπό την επαγωγή έκφρασης του hGRβ, όπου αυτό είναι δυνατό.
- Θυσία των ποντικών σε ηλικία 6 εβδομάδων, απομόνωση ορού του αίματος και συλλογή των οργάνων.
- Ενδοκρινολογικές εξετάσεις στον ορό του αίματος.
- Απομόνωση RNA και πρωτεϊνών από επινεφρίδια και ήπαρ.
- Έλεγχος με Real Time RT- PCR για επίπεδα έκφρασης γονιδίων σε ήπαρ και επινεφρίδια.
- Έλεγχος με στύπωμα κατά Western για την επιβεβαίωση υπερέκφρασης του ανθρώπινου GRβ.

Ελεγχόμενη έκφραση του διαγονιδίου του hGRβ

Για την ελεγχόμενη επαγωγή της έκφρασης του ανθρώπινου υποδοχέα hGRβ, έγινε χρήση του συστήματος rtTA2S-M2, που ανήκει στα συστήματα Tet On / Tet Off. Για τη λειτουργία αυτού του συστήματος απαιτούνται δύο σειρές διαγονιδιακών ποντικών. Η πρώτη σειρά παράγει έναν διενεργοποιητή (transactivator) που προσδέεται σε ρυθμιστικές αλληλουχίες που ανταποκρίνονται σε τετρακυκλίνη (Tetracycline Response Elements – TRE) και καθορίζουν την έκφραση του διαγονιδίου (hGRβ) της δεύτερης σειράς. Συνοπτικά, το σύστημα βασίζεται στην ιδιότητα της τετρακυκλίνης να αλλάζει τη διαμόρφωση του διενεργοποιητή, με σκοπό αυτός να συνδεθεί στις TRE αλληλουχίες και να ενεργοποιήσει την έκφραση του διαγονιδίου. Επομένως, η εξωγενής χορήγηση τετρακυκλίνης μπορεί να επάγει την έναρξη (Tet On) ή την παύση (Tet Off) της έκφρασης ενός γονιδίου (Σχεδιάγραμμα 2).

Μεταγραφικός έλεγχος σε διαγονιδιακά ποντίκια μέσω συστημάτων Tet On/Tet Off

Με σκοπό την ελεγχόμενη έκφραση σε διαγονιδιακά ζώα, έχει δημιουργηθεί μια σειρά από συστήματα γονιδιακής έκφρασης βάσει του οπερονίου αντίστασης στην τετρακυκλίνη (tet operon) του *Escherichia coli*. Το πρώτο σύστημα της σειράς, *tTA* (tetracycline-controlled TransActivator), εκμεταλλεύτηκε τον καταστολέα του οπερονίου της τετρακυκλίνης (tet Repressor – tetR) και τον VP16 ισχυρό επαγωγέα μεταγραφής. Απουσία τετρακυκλίνης, το γονίδιο αναφοράς εκφράζεται κανονικά. Παρουσία τετρακυκλίνης, εκείνη συνδέεται με τον tetR, εμποδίζοντας την πρόσδεσή του σε ρυθμιστικές περιοχές DNA, συνεπώς το γονίδιο παύει να εκφράζεται (Gossen & Bujard, 1992).



Σχεδιάγραμμα 2. Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του συστήματος Tet On που χρησιμοποιήσαμε με την προσθήκη δοξυκυκλίνης.

Έπειτα από βελτιώσεις με τυχαία μεταλλαγμένη στο γονίδιο του καταστολέα tetR (Hillen & Berens, 1994), προέκυψε μετάλλαγμα του οποίου η ικανότητα καταστολής εξαρτάται από την τετρακυκλίνη *in vivo* (Hecht *et al.*, 1993). Όπως αποδείχθηκε από την κρυσταλλική δομή, τα τέσσερα αμινοξέα που μεταλλάχθηκαν δεν έρχονται σε άμεση επαφή με την τετρακυκλίνη, όμως πιθανότατα συμμετέχουν στην αλλαγή διαμόρφωσης του tetR κατά την επαγωγή της έκφρασης (Hinrichs *et al.*, 1994). Το μετάλλαγμα αυτό αναφέρεται ως αντίστροφος καταστολέας Tet (reverse Tet repressor - *rTetR*).

Ο αντίστροφος διενεργοποιητής **rtTA** (reverse tetracycline-controlled TransActivator) προέκυψε από αντικατάσταση τμημάτων του tTA με τα αντίστοιχα μεταλλαγμένα τμήματα του rTetR (Southern & Berg, 1982). Το γονίδιο rtTA τοποθετήθηκε καθοδικά του υποκινητή του ανθρώπινου κυτταρομεγαλοϊού (human cytomegalovirus - CMV), και συνδιαμόλυνε κύτταρα HeLa μαζί με πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο της λουσιφεράσης με tTA-εξαρτώμενο υποκινητή (Gossen & Bujard, 1992). Παρατηρήθηκε αύξηση δραστηριότητας της λουσιφεράσης, παρουσία τετρακυκλινών. Ένα από τα πλεονεκτήματα αυτού του συστήματος είναι ότι περιορίζεται κατά πολύ η έκθεση στην τετρακυκλίνη.

Μελετήθηκαν πολλά παράγωγα τετρακυκλίνης για την ικανότητά τους να ενεργοποιούν την έκφραση λουσιφεράσης σε κύτταρα, με τις καλύτερες επιδόσεις να παρουσιάζουν η δοξυκυκλίνη και η ανυδροτετρακυκλίνη. Μετά από ανάλυση της εξάρτησης δόσης-απόκρισης, η **δοξυκυκλίνη** αποδείχθηκε ο ισχυρότερος τελεστής, παρόλο που ήταν προφανώς αναποτελεσματική σε συγκεντρώσεις κάτω από 10ng/mL (Gossen *et al.*, 1995). Ανάμεσα στα

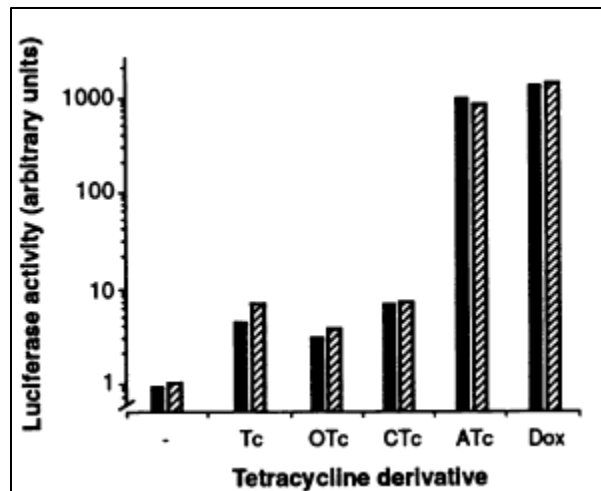
πλεονεκτήματα της δοξυκυκλίνης συγκαταλέγονται επίσης η μικρότερη τοξικότητα, ο μεγαλύτερος χρόνος ημιζωής και η υψηλή βιοδιαθεσιμότητα.

Το πρόβλημα θέσης ένθεσης του διαγονιδίου και η επίλυσή του

Απαιτούνται δύο διαγονιδιακές σειρές ζώων για την εφαρμογή του συστήματος *rtTA*: η μία εκφράζει τον διενεργοποιητή *rtTA* και η άλλη φέρει το διαγονίδιο του *hGRB*, συνδεδεμένο σε ένα στοιχείο που αποκρίνεται στην τετρακυκλίνη (*Tet responsive element – TRE*). Ωστόσο, η χρωμοσωμική θέση ένθεσης του διαγονιδίου συνήθως μειώνει την αποδοτικότητα του συστήματος *tet*. Αυτό αποτελεί σημαντικό πρόβλημα όταν επιχειρείται επαγωγή έκφρασης σε αρκετούς ιστούς. Ενώ το φαινόμενο χρωμοσωμικής θέσης μπορεί να μειωθεί μερικώς με τη χρήση ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδιακού τύπου, όπως περιοχές ελέγχου (*Locus Control Regions – LCR*) ή μονωτές (*insulators*) (*West et al., 2002*), αυτά τα στοιχεία είναι συνήθως ιστοειδικά. Αντιθέτως, τα ρυθμιστικά στοιχεία των στοιχειωδών γονιδίων σταθερής έκφρασης σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού (*housekeeping genes*) είναι πάντα ενεργά σε όλους τους ιστούς. Για παράδειγμα, οι CpG νήσοι που δε μεθυλιώνονται και σχετίζονται με τα 5' άκρα των *housekeeping* γονιδίων, βρίσκονται σε περιοχές ενεργής χρωματίνης (*Tazi & Bird, 1990*). Πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων έχουν αποδείξει ότι τα διαγονίδια που περιέχουν CpG νήσους προστατεύουν από τα φαινόμενα θέσης, ακόμα και όταν ενσωματώνονται στην ετεροχρωματίνη. Για παράδειγμα, μεγάλα τμήματα που γεφυρώνουν τις CpG νήσους στους γονιδιακούς τύπους των ανθρώπινων TBP-PSMB1 και hnRNPA2B1-CBX3 μπόρεσαν να τα προστατεύσουν από τη σίγηση της ετεροχρωματίνης (*Antonίου et al., 2003; Harland et al., 2002*).

Στον γονιδιακό τόπο hnRNPA2B1-CBX3, τα δύο ανεξάρτητα εκφραζόμενα γονίδια κωδικοποιούν για την ετερογενή ριβονουκλεοπρωτεΐνη A2/B1 (*RiboNucleoProtein A2/B1*) και για το ομόλογο χρωμοκουτί 3 (*ChromoBox 3*) (*Hatfield et al., 2002*). Δοκιμασίες σε κύτταρα θηλαστικών απέδειξαν ότι η CpG νήσος του hnRNPA2B1-CBX3 έδωσε επαναλήψιμη, σταθερή και ομοιογενή έκφραση υπό τον έλεγχο του ενδογενούς υποκινητή του hnRNPA2B1, ακόμα και όταν ενσωματωνόταν σε κεντρομερική ετεροχρωματίνη (*Antonίου et al., 2003*). Επιπλέον, ο συνδυασμός της CpG νήσου του hnRNPA2B1-CBX3 με τον υποκινητή CMV βελτίωσε το επίπεδο και τη σταθερότητα της έκφρασης, δίνοντας συνεπώς καλύτερη παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα ωθηκών Κινεζικού χάμστερ (*Chinese Hamster Ovaries – CHO, Williams et al., 2005*).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι οι μη μεθυλιωμένες CpG νήσοι ίσως να περιέχουν επικρατούσες λειτουργίες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Έχει παρατηρηθεί



Εικόνα 8. Διαφορική απόκριση HR5-CL1 κυττάρων σε διάφορες τετρακυκλίνες (*Gossen et al., 1995*). Tc – τετρακυκλίνη-HCl, OTc – οξυτετρακυκλίνη-HCl, CTc – χλωροτετρακυκλίνη, ATc – ανυδροτετρακυκλίνη-HCl, Dox – δοξυκυκλίνη-HCl. (*Gossen et al., 1995*)

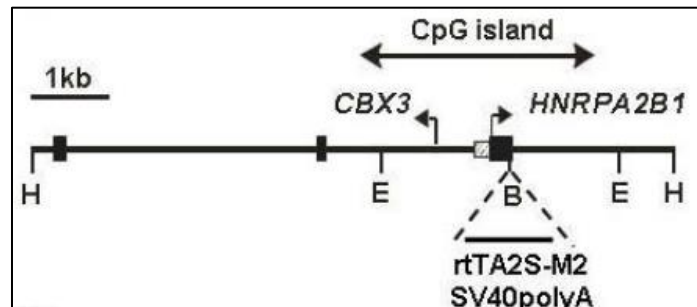
επίσης ότι η CpG νήσος του hNRPA2B1-CBX3 αρκεί για να παράγει ένα επαρκές, αφθόνως εκφραζόμενο επαγόμενο rtTA σύστημα στα διαγονιδιακά ποντίκια (Katsantoni *et al.*, 2007).

Δημιουργία των κατασκευών hGRβ και rtTA

Κατασκευή του rtTA2S-M2

Η παραλλαγή *rtTA2S-M2* που χρησιμοποιείται στο παρόν πείραμα, προήλθε από μεταλλαξιγένεση του rtTA. Υπερέχει του rtTA γιατί επάγεται με 10 φορές χαμηλότερη συγκέντρωση δοξυκυκλίνης και είναι πιο σταθερό σε κύτταρα θηλαστικών (Urlinger *et al.*, 2000).

Για τη δημιουργία του *rtTA2S-M2* χρησιμοποιήθηκε τμήμα από τη μη μεθυλιωμένη CpG νήσο του ανθρώπινου hNRPA2B1-CBX3 housekeeping γονιδίου. Το *rtTA2S-M2* μαζί με την αλληλουχία SV40 αποκόπηκε από το πλασμίδιο pUHRt62-1 (Urlinger *et al.*, 2000) με EcoRI/HindIII και κλωνοποιήθηκε στο πρώτο εξώνιο του γονιδίου HNRPA2B1 με BglIII. Η κατασκευή HNRPA2B1/*rtTA2S-M2* αφαιρέθηκε από τους φορείς με HindIII σαν ένα τμήμα 8 kb (Σχεδιάγραμμα 3).



Σχεδιάγραμμα 3. Το γονιδιωματικό τμήμα μήκους 8kb, στο οποίο φαίνονται οι hNRPA2B1 και CBX3 υποκινητές στην CpG νήσο που τους γεφυρώνει. Εμφανίζεται επίσης η θέση κοπής του BglIII (B) που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του cDNA *rtTA2S-M2SV40polyA*. Οι θέσεις κοπής EcoRI (E) χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό του αριθμού των αντιγράφων του διαγονιδίου. Η θέση HindIII (H) είναι εκείνη που χρησιμοποιήθηκε για να γίνει το τμήμα γραμμικό (Katsantoni *et al.*, 2007).

Δημιουργία κατασκευής hGRβ υπό τον υποκινητή Tet responsive P tight

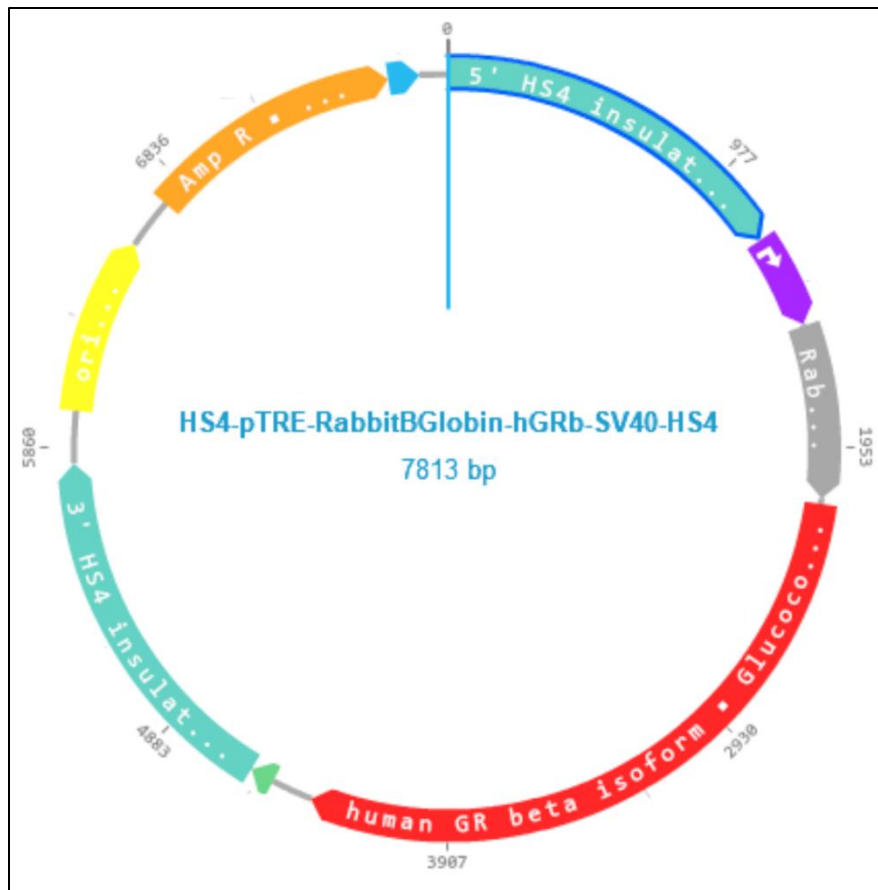
Αρχικά, για την υποκλωνοποίηση του cDNA του hGRβ υπό τον έλεγχο του υποκινητή Tet responsive P tight έγινε χρήση του φορέα *pTRE-Tight* (Clontech, Catalog Nr. 631059), ο οποίος ενδείκνυται για τα συστήματα Tet On / Tet Off, καθώς έχει υποκινητή με αλληλουχίες που αποκρίνονται στο σύστημα rtTA (Tet Responsive Elements – TRE).

Ανοδικά του hGRβ κλωνοποιήθηκε τμήμα αλληλουχίας από το γονίδιο της σφαιρίνης του κουνελιού (*Rabbit β Globin*, ιντρόνιο 2 - εξώνιο 2 - ιντρόνιο 3), το οποίο είναι απαραίτητο για την εξασφάλιση της έκφρασης του hGRβ σε μεγάλες ποσότητες, τη σωστή επεξεργασία του

πρόδρομου mRNA (pre-mRNA) και τη σταθεροποίηση του ώριμου mRNA (Miyazaki *et al.*, 1989). Ακολούθησε η μετατροπή της κατασκευής σε γραμμική, με χρήση του περιοριστικού ενζύμου XhoI.

Μετά από PCR με ειδικούς εκκινητές για την εισαγωγή θέσεων περιορισμού, προέκυψε τροποποιημένος φορέας pBluescript II SK (+) – HS4, από τον οποίον και ελήφθησαν οι αλληλουχίες HS4 (*insulators*). Το υπερευαίσθητο στη DNάση I τμήμα της β σφαιρίνης της όρνιθας (Hypersensitive Site 4 chicken β globin - HS4) έχει μονωτική (*insulator*) δράση, όταν βρίσκεται πλευρικά ενός γονιδίου προς μεταγραφή στο χρωμόσωμα: α. υποβοηθά την έκφραση διαγονιδίων σε διαγονιδιακά ποντίκια, β. καθιστά δυνατή την έκφραση των ενσωματωμένων ξένων γονιδίων, ανεξάρτητα από τη θέση τους στη χρωματίνη (μειώνει το φαινόμενο θέσης), γ. αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης και δ. εμποδίζει την αλληλεπίδραση υποκινητή και ενισχυτών, όταν βρίσκεται ανάμεσά τους (Bushey *et al.*, 2008; Hassan-Zadeh *et al.*, 2012; Ramezani & Hawley, 2010; Rival-Gervier *et al.*, 2003).

Τέλος, μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα και λιγοποίηση, η κασέτα HS4-TRE-RabbitBGlobin-hGRβ-SV40-HS4 επέστρεψε στον αρχικό φορέα pTRE-Tight (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Η κατασκευή για την έκφραση του hGRβ. Από την αρχή (0) και δεξιόστροφα: γαλάζιο - insulators HS4 αμφοτερόπλευρα της κασέτας προς έκφραση, μοβ - υποκινητής Tet responsive P Tight, γκρι - τμήμα της αλληλουχίας ιντρόνιο 2 – εξώνιο 3 – ιντρόνιο 3 από τη σφαιρίνη Β του κουνελιού (Rabbit B-Globin), κόκκινο - human Glucocorticoid Receptor beta isoform, πράσινο - SV40 poly-A ουρά, κίτρινο - έναρξη της αντιγραφής του πλασμιδίου (origin of replication), πορτοκαλί - γονίδιο αντίστασης στην αμικικιλίνη (Amp Resistance), μπλε - υποκινητής του Amp R γονιδίου. Η εικόνα της κατασκευής δημιουργήθηκε με το λογισμικό Genome Compiler.

Η προσθήκη όλων αυτών των στοιχείων έγινε με σκοπό την αύξηση της πιθανότητας δημιουργίας λειτουργικών διαγονιδιακών ζώων.

Έλεγχος της επαγωγής του hGRβ σε κυτταροκαλλιέργειες

Κύτταρα COS7 συνδιαμολύνθηκαν με την κατασκευή HS4-pTRE-RabbitBGlobin-hGRβ-SV40-HS4 (που από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως «κατασκευή του GRβ») και με την κατασκευή του ανάστροφου διενεργοποιητή rtTA. Οι παροδικές διαμολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο των λιποσωμάτων και το αντιδραστήριο Lipofectamine 2000 (Invitrogen), σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της κατασκευάστριας εταιρείας.

Μετά από την προσθήκη δοξυκυκλίνης στα κύτταρα COS7, έγινε απομόνωση των ολικών πρωτεϊνών και έλεγχος για την παρουσία του hGRβ με στύπωμα κατά Western.

Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών

Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών με την κατασκευή του rtTA

Τα διαγονιδιακά ποντίκια rtTA2S-M2 υπό τον υποκινητή hnRNP είχαν ήδη δημιουργηθεί και ελεγχθεί στο εργαστήριό μας (Katsantoni *et al.*, 2007) για την επαγωγή της έκφρασης πλήθους γονιδίων.

Δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών με την κατασκευή του hGRβ

Έπειτα από πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση SacII, έγινε εξαγωγή της κασέτας του hGRβ από την κατασκευή. Ακολούθησε διαχωρισμός των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης, επώαση με αγαράση και τέλος καθαρισμός με το Gene Clean Kit (MP Biomedicals), σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της κατασκευάστριας εταιρείας. Η κατασκευή σε συγκεντρώσεις 0,3-2 ng/μL ενέθηκε σε γονιμοποιημένα ωάρια ποντικών C57/CBA, τα οποία έπειτα μεταφέρθηκαν σε ψευδοέγκυα θηλυκά ποντίκια B10 x CBA (Kollias *et al.*, 1986). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε την ημέρα των μικροενέσεων, στο στάδιο του ενός κυττάρου.

Έλεγχος διαγονιδιακών ιδρυτών (founders)

Με τις μικροενέσεις δημιουργήθηκαν διαγονιδιακοί ιδρυτές (founders), στους οποίους έγινε αρχικά έλεγχος για την ύπαρξη του διαγονιδίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) και έπειτα με στύπωμα κατά Southern (Southern blot).

Αρχικά, απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA από βιοψίες ουρών σύμφωνα με τη μέθοδο των Laird *et al.* (Laird *et al.*, 1991) και η ύπαρξη του διαγονιδίου ελέγχθηκε με PCR όπως λεπτομερώς περιγράφεται παρακάτω.

Απομόνωση DNA από ουρά ποντικού

- Λήψη βιοψίας από ουρά ποντικού (1,5-2 mm σε μήκος), ηλικίας περίπου 15 ημερών και τοποθέτησή της σε σωλήνα τύπου eppendorf.
- Προσθήκη 250 μ L διαλύματος λύσης (Lysis buffer - για 50 mL: 2,5 mL Tris 1M (pH 8.0), 5 mL EDTA 500mM, 1mL NaCl 5M, 2,5 mL SDS 20%, 39 mL H₂O) και 15 μ L πρωτεΐνάσης k (10 mg/mL).
- Επώαση για 18 ώρες στους 55°C
- Έντονη ανάδευση για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 85 μ L NaCl 6M και έντονη ανάδευση για 5 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 10 λεπτά. Σχηματισμός ιζήματος.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα.
- Προσθήκη 220 μ L ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 5 λεπτά. Σχηματισμός λευκού ιζήματος.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου με προσοχή να μην αποκολληθεί το ίζημα του DNA.
- Προσθήκη 150 μ L EtOH 70% και έντονη ανακίνηση, για να γίνει έκπλυση.
- Φυγοκέντρηση στα 13.000 rpm για 2 λεπτά.
- Αφαίρεση του υπερκείμενου και στέγνωμα του ιζήματος στον απαγωγό για 10 λεπτά (ανοιχτός σωλήνας).
- Προσθήκη 30 μ L TE (10M Tris pH 8.0, 1mM EDTA) και επαναδιαλυτοποίηση του DNA με έντονη ανάδευση.

Έλεγχος παρουσίας διαγονιδίου με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Κατά κανόνα χρησιμοποιούνται 1-2 μ L DNA στην αντίδραση. Βέλτιστη συγκέντρωση είναι τα 200 – 300 ng. Ακολουθεί ο πίνακας των αντιδραστηρίων:

PCR για το γονίδιο του hGR β

Αντιδραστήριο	Όγκος (μ L)
Buffer HF (5X)	4.0
dNTPs (10mM)	0.4
hGR β Forward (5 μ M)	1.6
hGR β Reverse (5 μ M)	1.6
DMSO	0.2
MgCl ₂	0.2
Phusion Polymerase	0.4
ddH ₂ O	10.6
DNA	1.0
Συνολικός όγκος	20 μL

Πίνακας 2

Εκκινητές για το γονίδιο hGRβ:

hGRβ Forward: 5' – ATCTGGATCCTATGGACTCCAAAGAAT – 3'

hGRβ Reverse: 5' – ATCAGCGGCCGCTCAGATTAATGTGTGAGA – 3'

Πρόγραμμα της αντίδρασης:

1. 98°C για 3 λεπτά
2. 98°C για 10 δευτερόλεπτα
3. 71°C για 1 λεπτό
4. 72°C για 1 λεπτό
5. Επανάληψη των βημάτων 2 έως 4 για ακόμα 34 κύκλους
6. 72°C για 5 λεπτά

PCR για το γονίδιο του διενεργοποιητή rtTA

Αντιδραστήριο	Όγκος (μL)
Buffer HF (5X)	4.0
dNTPs (10mM)	0.5
rtTA Forward (5μM)	0.5
rtTA Reverse (5μM)	0.5
DMSO	0.5
MgCl ₂	0.1
Phusion Polymerase	0.4
ddH ₂ O	12.5
DNA	1.0
Συνολικός όγκος	20 μL

Πίνακας 3

Εκκινητές για τον διενεργοποιητή rtTA:

rtTA Forward: 5' – TTACCCGGGGAGCATGTCAAGG – 3'

rtTA Reverse: 5' – CCACCATGTCTAGACTGGACAAGAGC – 3' (Sheng *et al.*, 2010)

Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρόγραμμα αντίδρασης με πριν. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν στους θερμοκυκλοποιητές PTC-200 και PTC-220 Dyad της MJ Research.

Έλεγχος παρουσίας διαγονιδίου με στύπωμα κατά Southern (Southern blot)

Ακολούθησε πέψη του γονιδιωματικού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Μετά από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης και επεξεργασία με διάλυμα αποπουρινοποίησης (0.2 N HCl) και αποδιάταξης (0.5M NaOH/1.5M NaCl), τα προϊόντα μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech) (Sambrook & Russell, 2001). Ακολούθησε υβριδισμός της μεμβράνης με ραδιενεργό ανιχνευτή για τον hGRβ, του οποίου η σήμανση έγινε με την DNA πολυμεράση I, Large Klenow Fragment (5U/μL), [α-³²P]GTP και το Prime-a-Gene Labeling Kit (Promega). Μετά τη ραδιενεργή σήμανση του ανιχνευτή,

έγινε καθαρισμός των μη ενσωματωμένων ραδιενεργών νουκλεοτιδίων με κολόνα G-50 (Sambrook & Russell, 2001). Ακολούθησε προϋβριδοποίηση, προσθήκη του καθαρισμένου και αποδιατεταγμένου ανιχνευτή στον κύλινδρο υβριδοποίησης και υβριδοποίηση για 18 ώρες, στους 65°C σε περιστρεφόμενο επωαστήρα. Την επόμενη ημέρα η μεμβράνη εκπλύθηκε σε διάλυμα 0.3X SSC/0.1% SDS δύο φορές επί 1 ώρα στους 65°C και στη συνέχεια εκτέθηκε για λίγες ώρες σε κασέτα PhosphorImager (του Molecular Dynamics PhosphorImager). Τέλος, η κασέτα σαρώθηκε σε μηχάνημα Typhoon PhosphorImager και το αποτέλεσμα αναλύθηκε χρησιμοποιώντας το ImageQuant software (Molecular Dynamics). Η ακεραιότητα του διαγονιδίου ελέγχθηκε με ανιχνευτή και το συνολικό διαγονίδιο HS4-pTRE-RabbitBGlobin-hGRβ-SV40-HS4.

Εγκαθίδρυση διαγονιδιακών σειρών και έλεγχος αριθμού αντιγράφων της κατασκευής

Εγκαθιδρύθηκαν διαγονιδιακές σειρές με διασταυρώσεις των διαγονιδιακών ιδρυτών με μη διαγονιδιακά ποντίκια C57. Σε ποντίκια της πρώτης και δεύτερης γενιάς, προσδιορίστηκε ο ακριβής αριθμός των αντιγράφων της κατασκευής του hGRβ με Southern blot, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται ανωτέρω. Εκτός των ραδιενεργών ανιχνευτών για τον hGRβ, έγινε και χρήση ανιχνευτών για το ενδογενές γονίδιο του ποντικού που κωδικοποιεί για την καρβονική ανυδράση II (carbonic anhydrase II - CAII), όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (Katsantoni *et al.*, 2003, 2004, 2007). Υπολογίστηκε ο λόγος έντασης των ζωνών hGRβ/CA-II για τις διαγονιδιακές σειρές, και συγκρίθηκε με το λόγο έντασης σειρών που περιλαμβάνουν ένα αντίγραφο TRE γονιδίων -το γονιδιωματικό τους DNA υπήρχε ήδη στον Τομέα Πνευμόνων-Αίματος του IIBEAA. Η ανάλυση της έντασης των ζωνών έγινε στο PhosphorImager χρησιμοποιώντας το ImageQuant software (Molecular Dynamics).

Δημιουργία διπλών διαγονιδιακών ποντικών

Στη συνέχεια, η διαγονιδιακή σειρά με τα περισσότερα αντίγραφα της κατασκευής του hGRβ σε ευχρωματική ένθεση, χρησιμοποιήθηκε σε διασταυρώσεις με τα ποντίκια rtTA υπό τον υποκινητή hnRNP (HNRPA2B1/rtTA2S-M2), τα οποία είχαν ήδη δημιουργηθεί και ελεγχθεί στο Εργαστήριό μας (Katsantoni *et al.*, 2007). Η ύπαρξη των δύο διαγονιδίων ελέγχθηκε με PCR και Southern blot, με ανιχνευτές το hGRβ και το rtTA2S-M2.

Ενεργοποίηση της έκφρασης του διαγονιδίου

Μετά την επιλογή των ποντικών που έφεραν το ένα από τα δύο γονίδια, ακολούθησαν διασταυρώσεις μεταξύ ποντικών που έφεραν το γονίδιο του hGRβ και εκείνων που έφεραν εκείνο του ενεργοποιητή rtTA, με σκοπό τη δημιουργία διπλών διαγονιδιακών ποντικών. Με όμοιο τρόπο, έγινε έλεγχος και των απογόνων για το εάν φέρουν κανένα, ένα ή και τα δύο γονίδια.

Τα διπλά διαγονιδιακά ποντίκια σε ηλικία ενός μήνα και τους χορηγήθηκε δοξυκυκλίνη σε συγκέντρωση 2 mg/mL πόσιμου νερού, για δύο εβδομάδες. Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν δοξυκυκλίνη υκλάτης της Cayman [Υδροχλωρική ημιαιθανολική

ημιένυδρη δοξυκυκλίνη, Doxycycline hydrochloride hemiemethanolate hemihydrate – Doxycycline hyclate].

Μέτρηση επιπέδων έκφρασης γονιδίων που επάγονται από τα γλυκοκορτικοειδή

Μέτρηση επιπέδων RNA των γονιδίων CYP11A και PNMT στα επινεφρίδια

Η σύνθεση των γλυκοκορτικοειδών γίνεται στα επινεφρίδια και ξεκινά με το κυτόχρωμα P450_{sc} (αντίστοιχο γονίδιο το *CYP11A*), το οποίο μετατρέπει τη χοληστερόλη σε πρεγνενολόνη. Το γονίδιο *PNMT* εμπλέκεται στην παραγωγή επινεφρίνης.

Μέτρηση επιπέδων RNA των γονιδίων 11β-HSD1, PEPCK, TAT και G6Pase στο ήπαρ

Το γονίδιο 11β-HSD1 κωδικοποιεί το αντίστοιχο ένζυμο (11β-HydroxySteroid Dehydrogenase type 1), του οποίου η λειτουργία είναι να ανάγει την κορτιζόνη σε ενεργή κορτιζόλη, που με τη σειρά της ενεργοποιεί τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών. Τα ένζυμα PEPCK (PhosphoEnol-Pyruvate CarboxyKinase) και G6Pase (Glucose-6-Phosphatase) συμμετέχουν στη διαδικασία της γλυκονεογένεσης, ενώ το γονίδιο της TAT (Tyrosine AminoTransferase) ρυθμίζεται από τα γλυκοκορτικοειδή μέσω απομεθυλίωσης ενός γονιδιακού ενισχυτή του.

Η έκφραση των γονιδίων που αναφέρονται παραπάνω, μετρήθηκε με αρχική απομόνωση του RNA από τους ιστούς των ποντικών (που ήταν αποθηκευμένοι σε υγρό άζωτο), αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA (Reverse Transcription, RT) και τέλος PCR αληθούς χρόνου.

Απομόνωση RNA από ήπαρ και επινεφρίδια με TRIzol®

Έγινε απομόνωση του RNA από τους ιστούς των επινεφριδίων και του ήπατος των ποντικών, με σκοπό την τελική μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων. Το πρωτόκολλο ήταν της Invitrogen, η οποία παρείχε και το βασικό αντιδραστήριο TRIzol® (Cat. No 15596-026).

Ομογενοποίηση

- Ομογενοποίηση του ιστού (50 - 100mg) με 1mL κρύο TRIzol® με τη βοήθεια μηχανικού ομογενοποιητή.

Διαχωρισμός φάσεων

- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, για να σχηματιστούν πλήρως τα σύμπλοκα πυρηνικών πρωτεϊνών.
- Προσθήκη 200μL χλωροφορμίου και έντονη ανάδευση με το χέρι για 15 δευτερόλεπτα.
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά.

- Φυγοκέντρηση στα 11200rpm (12000g) και στους 4°C για 15 λεπτά. Το μίγμα διαχωρίζεται σε μια κόκκινη φάση φαινόλης-χλωροφορμίου, μια ενδιάμεση φάση και μια διάφανη υδατική φάση πάνω πάνω. Το RNA μένει στην υδατική φάση. Ο όγκος της υδατικής φάσης είναι περίπου το 60% του όγκου του TRIzol® που χρησιμοποιήθηκε για την ομογενοποίηση.

Κατακρήμνιση του RNA

- Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωλήνα φυγοκέντρησης. Αποθήκευση της οργανικής και της ενδιάμεσης φάσης.
- Προσθήκη 500 μL ισοπροπυλικής αλκοόλης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στα 11200rpm (12000g) στους 4°C για 10 λεπτά.

Έκπλυση του RNA

- Αφαίρεση του υπερκειμένου και αποθήκευσή του σε άλλο σωλήνα τύπου eppendorf.
- Ξέπλυμα του ιζήματος με 1 mL 75% αιθανόλη.
- Έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 8900rpm (7500g) στους 4°C για 5 λεπτά.

Επαναδιάλυση του RNA

- Αφαίρεση του υπερκειμένου και στέγνωμα του ιζήματος RNA για 5 λεπτά στον πάγκο.
- Επαναδιάλυση του RNA σε νερό ελεύθερο νουκλεασών με πιπετάρισμα και επώαση για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 55°C.

Μετά την απομόνωση του RNA, έγινε μέτρηση της συγκέντρωσής του σε φασματοφωτόμετρο τύπου nanodrop.

Αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA και PCR (Reverse Transcription – PCR, RT-PCR)

Επώαση του RNA με DNάση

Χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες 2 - 5mg RNA για επώαση με την DNάση της Promega (Catalog Nr. M6101), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας:

- Η κάθε πέψη περιείχε:

Αντιδραστήριο	Όγκος / Ποσότητα
RNA σε νερό ελεύθερο νουκλεασών	1 - 8μl (ποσότητα 2 - 5mg)
Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης της RQ1 DNάσης (ελεύθερο RNασών) 10X	1μl
DNάση ελεύθερη RNασών	1 Unit/μg RNA
Νερό ελεύθερο νουκλεασών	Μέχρι τελικό όγκο 10μl

Πίνακας 4

- Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.

- Προσθήκη 1μL από το διάλυμα παύσης της RQ1 DNάσης για να τερματιστεί η αντίδραση.
- Επώαση στους 65°C για 10 λεπτά, με σκοπό την απενεργοποίηση της DNάσης.

RT-PCR

Μετά την πέψη με DNάση, ακολούθησε η αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA με χρήση της M-MLV αντίστροφης μεταγραφάσης της Invitrogen, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που παρείχε η εταιρεία. (M-MLV Reverse Transcriptase, Catalog Nr. 28025-013 & 28025-021)

- Προσθήκη των ακόλουθων αντιδραστηρίων σε σωλήνα τύπου erpendorf ελεύθερο νουκλεασών:

Αντιδραστήριο	Όγκος / Ποσότητα
Τυχαίοι εκκινητές 50 - 250ng	1μl
RNA	1 - 5μg
dNTP mix 10mM	1μl
Αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό	Μέχρι τα 12μl

Πίνακας 5

- Επώαση του κάθε μίγματος για 5 λεπτά στους 65°C και γρήγορη ψύξη στον πάγο. Συλλογή του περιεχομένου μετά από γρήγορη φυγοκέντρηση και προσθήκη:

Αντιδραστήριο	Όγκος
5X ρυθμιστικό διάλυμα πρώτης αλυσίδας	4μl
0.1M DTT	2μl
RNase OUT ανασυνδυασμένος αναστολέας ριβονουκλεασών (40U/μl)	1μl

Πίνακας 6

- Ελαφριά ανάδευση των περιεχομένων του κάθε σωλήνα και επώαση στους 37°C για 2 λεπτά.
- Προσθήκη 1μL (200 Units) της M-MLV αντίστροφης μεταγραφάσης και ανάμιξη με πιπेटάρισμα. Επώαση του κάθε σωλήνα στους 25°C για 10 λεπτά.
- Επώαση στους 37°C για 50 λεπτά.
- Απενεργοποίηση της αντίδρασης με θέρμανση στους 70°C για 15 λεπτά.

Η αντίδραση πρώτης αλυσίδας cDNA χρησιμοποιήθηκε έπειτα για PCR:

- Προσθήκη των ακόλουθων αντιδραστηρίων σε σωλήνα τύπου erpendorf, κατάλληλο για PCR αντιδράσεις, σε τελικό όγκο 50μL:

Αντιδραστήριο	Όγκος
10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl)	5μl
50mM MgCl ₂	1.5μl
Εκκινητής 1 (10μM)	1μl
Εκκινητής 2 (10μM)	1μl
Taq DNA πολυμεράση (5U/μl)	0.4μl
cDNA	2μl
Αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό	38.1μl

Πίνακας 7

- Ελαφριά ανάδευση και επώαση στους 94°C για 2 λεπτά, για αποδιάταξη.
- Ακολουθήσε PCR.

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR) για μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων

Έγινε χρήση της SsoFast EvaGreen της BioRad (Catalog Nr. 172-5201) και προσθήκη 10 - 30ng/μL cDNA σε τελική συγκέντρωση στην κάθε αντίδραση.

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο προτεινόμενο από την εταιρεία:

- Για κάθε δείγμα έγιναν δύο επαναλήψεις:

Αντιδραστήριο	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
SsoFast EvaGreen Master Mix	10μl	1X
Εκκινητής 1	1.2μl	300nM
Εκκινητής 2	1.2μl	300nM
Πρότυπο DNA	Μεταβλητός	10 - 30ng/μl
Νερό ελεύθερο νουκλεασών	Μέχρι τα 20μl	-

Πίνακας 8

Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ο θερμοκυκλοποιητής πραγματικού χρόνου CFX96 της BioRad και για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων το λογισμικό Bio-Rad CFX Manager.

Το πρόγραμμα ήταν το εξής:

1. 95°C για 3 sec, για την ενεργοποίηση του ενζύμου
2. 95°C για 10 sec, για αποδιάταξη
3. 60°C για 42 sec, για επιμήκυνση
4. Επανάληψη για ακόμα 41 φορές από το βήμα 2.

Καμπύλη τήξης 65-95 °C για 2-5 sec ανά βήμα.

Έλεγχος επαγωγής της έκφρασης του hGRβ

Απομόνωση πρωτεϊνών από ήπαρ και επινεφρίδια

Συνεχίστηκε το προαναφερθέν πρωτόκολλο της απομόνωσης του RNA από το βήμα διαχωρισμού οργανικής και υδατικής φάσης προς απομόνωση πρωτεϊνών.

Κατακρήμνιση του DNA

- Αφαίρεση της εναπομείνουσας υδατικής φάσης πάνω από την ενδιάμεση φάση και προσθήκη 300μL αιθανόλης 100% και ανάδευση.
- Διατήρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση στα 4600 rpm (2000g) για 5 λεπτά στους 4°C.

Κατακρήμνιση των πρωτεϊνών

- Προσθήκη 1.5mL ισοπροπανόλης και διατήρηση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Φυγοκέντρηση στα 11200rpm (12000g).

Έκπλυση των πρωτεϊνών

- Αφαίρεση του υπερκειμένου και έκπλυση του ιζήματος πρωτεϊνών 3 φορές με διάλυμα 0.3M υδροχλωρικής γουανιδίνης σε 95% αιθανόλη.
- Για κάθε έκπλυση: προσθήκη 2mL του διαλύματος και αναμονή 20 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκέντρηση στα 8900rpm (7500g) για 5 λεπτά στους 4°C και αφαίρεση του υπερκειμένου.
- Ακολουθεί έκπλυση με αιθανόλη 100% κατά όμοιο τρόπο.

Επαναδιάλυση του ιζήματος πρωτεϊνών

- Στέγνωμα του ιζήματος για 10 λεπτά στον πάγκο. Διάλυσή του σε 1% SDS με πιπετάρισμα και επώαση στους 50°C για 30 λεπτά. Πιπετάρισμα για καλύτερη επαναδιάλυση στο SDS.
- Φυγοκέντρηση των αδιάλυτων πρωτεϊνών του ιζήματος στα 10300rpm (10000g) για 10 λεπτά στους 4°C και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf.

Στύπωμα κατά Western για την επιβεβαίωση της έκφρασης του μεταλλαγμένου υποδοχέα GRβ στο ήπαρ και στα επινεφρίδια

Διαχωρισμός σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

- Αρχικά έγινε διαχωρισμός των πρωτεϊνών κάθε δείγματος βάσει μοριακού βάρους σε πηκτή ακρυλαμίδης 10%, με το σύστημα Mini-PROTEAN Tetra Cell της BioRad.
- Χρειάστηκαν δύο πηκτές πολυακρυλαμίδης, με κάθε μία να αποτελείται από δύο διαφορετικές πυκνότητες πολυακρυλαμίδης (4% πηκτή στοίβαξης - stacking gel, 10% πηκτή ανάλυσης - resolving gel). Η κάθε πηκτή περιείχε τα ακόλουθα:

	Νερό	Ακρυλαμίδη /Bis	Tris-HCl	SDS 10% w/v	APS 10%	TEMED
Stacking gel 4%	6.1ml	1.3ml	2.5ml (0.5M pH 6.8)	0.1ml	50μl	10μl
Resolving gel 10%	4.1ml	3.3ml	2.5ml (1.5M pH 8.8)	0.1ml	50μl	5μl

Πίνακας 9

- Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 6X (loading ή sample buffer: 937.5μL Tris-HCl pH 6.8, 3.75mL SDS 10%, 750 μL mercaptoethanol, 3mL glycerol 50%, 3.75mg bromophenol blue, 1.563 mL νερό) και την θέρμανσή τους στους 70°C για 15 λεπτά.
- Οι πηκτές, αφού στερεοποιήθηκαν, τοποθετήθηκαν στη βάση της συσκευής και προστέθηκε άφθονο ρυθμιστικό διάλυμα τρεξίματος (running buffer: 25mM Tris, 190mM glycine, 0.1% SDS).
- Τα δείγματα φορτώθηκαν με την εξής σειρά:

1η πηκτή ήπαρ	Wild Type				ladder	GRβ/rtTA +				
	1	2	3	4		1	2	3	4	5
2η πηκτή επινεφρίδια	GRβ/rtTA +					ladder	Wild Type			
	1	2	3	4	5		1	2	3	4

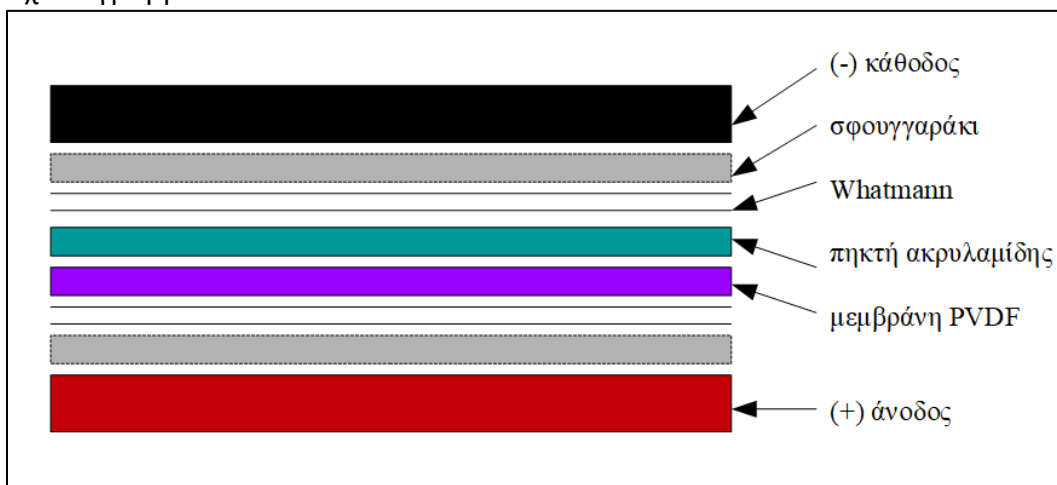
Πίνακας 10

Το ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ProSieve Color Protein Marker (Catalog Nr. 50552) της Lonza.

- Οι πρωτεΐνες πρώτα πέρασαν από το 4% gel ώστε να μπουν σε μία σειρά και έπειτα διαχωρίστηκαν στο 10% gel σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος.
- Οι πηκτές έτρεξαν στα 100V μέχρι να φτάσουν στην άκρη του stacking gel και έπειτα η διαφορά δυναμικού ανέβηκε στα 180V, μέχρι η χρωστική bromophenol blue να φτάσει στο τέρμα της πολυακρυλαμίδης.

Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

- Ετοιμάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer: 25mM Tris base, 10% methanol, 192mM glycine). Για κάθε πηκτή κόπηκαν 4 κομμάτια χαρτιού Whatmann στις διαστάσεις του resolving gel και εμποτίστηκαν σε μεθανόλη για 2-3 λεπτά. Κόπηκαν επίσης και δύο κομμάτια PVDF μεμβράνης στις ίδιες διαστάσεις.
- Με τη βοήθεια σπάτουλας, κόπηκε το κομμάτι του stacking gel από την κάθε πηκτή. Πάνω στην κάθε άνοδο τοποθετήθηκαν ένα σφουγγαράκι, 2 χαρτιά Whatmann και η μεμβράνη PVDF.
- Με τη βοήθεια σπάτουλας αφαιρέθηκε η κάθε πηκτή από το τζάμι και τοποθετήθηκε προσεκτικά πάνω σε μία μεμβράνη. Από πάνω τοποθετήθηκαν άλλα 2 χαρτιά Whatmann, το άλλο σφουγγαράκι και η κάθοδος. Το τελικό αποτέλεσμα φαίνεται στο Σχεδιάγραμμα 4.



Σχεδιάγραμμα 4

- Οι συσκευές μεταφοράς τοποθετήθηκαν στη βάση τους και η μεταφορά των πρωτεϊνών έγινε για 1 ώρα στη μέγιστη διαφορά δυναμικού (300V).

Επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα

- Ετοιμάστηκε διάλυμα TBS-T (Tris-buffered saline with Tween-20: 20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20).
- Οι μεμβράνες επώαστηκαν για 1 ώρα σε TBS-T με 5% άπαχο γάλα σε σκόνη, με σκοπό την παρεμπόδιση (blocking) δημιουργίας μη ειδικού σήματος.
- Μετά το πέρας της 1 ώρας blocking, οι μεμβράνες κόπηκαν στη μέση με γνώμονα το ladder, ανάμεσα στα 34 και 90KDa όπου ήταν τα αναμενόμενα μοριακά βάρη του GAPDH (house keeping gene) και του GRβ, αντίστοιχα.
- Οι 4 πλέον μεμβράνες επώαστηκαν ως εξής: οι μεμβράνες που περιείχαν τα χαμηλότερα μοριακά βάρη επώαστηκαν με αντίσωμα αίγας για το GAPDH (goat polyclonal GAPDH antibody V-18, Santa Cruz Biotechnology, Catalog Nr. sc-20357) και τα μεγαλύτερα με αντίσωμα κουνελιού για τον GRβ (rabbit polyclonal Glucocorticoid Receptor beta antibody, Thermo, Catalog Nr. PA3-514).

- Τα αντισώματα αραιώθηκαν 500 φορές σε TBS-T με 5% άπαχο γάλα σε σκόνη, και η επώαση έγινε για 18 ώρες στους 4°C με ανακίνηση.

Επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα

- Οι μεμβράνες εκπλύθηκαν 3 φορές με TBS-T, για 15 λεπτά κάθε φορά.
- Ακολούθησε η επώαση με τα δευτερογενή αντισώματα που ήταν συνδεδεμένα με την υπεροξειδάση του αγριοράπανου (HRP - horse radish peroxidase): αντίσωμα γαϊδάρου αντί της αίγας για το GAPDH (donkey anti-goat IgG, F(ab')₂-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Catalog Nr. sc-3851) και αντίσωμα αίγας αντί του κουνελιού για τον GRβ (goat anti-rabbit IgG, F(ab')₂-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Catalog Nr. sc-3837).
- Τα αντισώματα αυτά αραιώθηκαν 1000 φορές σε TBS-T με 5% άπαχο γάλα σε σκόνη, και η επώαση έγινε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανακίνηση.
- Ακολούθησαν άλλες 3 εκπλύσεις διάρκειας 15 λεπτών η κάθε μία, με TBS-T.

Προσθήκη υποστρώματος και εμφάνιση σήματος

- Αναμίχθηκαν ίσες ποσότητες από τα δύο μέρη του υποστρώματος της υπεροξειδάσης (SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, ThermoFisher Scientific, Catalog Nr. 34577) και έπειτα οι μεμβράνες επωάστηκαν με το υπόστρωμα για 1 λεπτό ή κάθε μία.
- Σε σκοτεινό θάλαμο έγινε η εμφάνιση των μεμβρανών, έπειτα από έγκλεισή τους μαζί με φιλμ ακτίνων χ (Fujifilm) σε ειδική κασέτα εμφάνισης για 1 λεπτό.

Ενδοκρινολογικές εξετάσεις

Στον ορό που απομονώθηκε από το αίμα των ποντικών, πραγματοποιήθηκαν ενδοκρινολογικές εξετάσεις. Έγιναν μετρήσεις στα επίπεδα ποικίλων ορμονών και κυτταροκινών με την ανοσολογική μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Μετρήθηκαν οι εξής ορμόνες και κυτταροκίνες: αδιπονεκτίνη, ιντερλευκίνες 1β, 2, 6 και 10, λεπτίνη, ρεζιστίνη και ο TNF-α. Τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν ήταν τα προτεινόμενα από την εκάστοτε εταιρεία. Ενδεικτικά αναφέρεται ένα γενικό πρωτόκολλο, το οποίο διαφέρει ελάχιστα ανάμεσα στις δύο εταιρείες.

ELISA

Πρώτη μέρα:

- Προσθήκη 100μL διαλύματος αντισώματος πρόσδεσης (capture antibody) σε κάθε θέση της πλάκας, αεροστεγής κάλυψη και επώαση στους 4°C για 18 ώρες.

Δεύτερη μέρα:

- Έκπλυση της πλάκας 4 φορές με διάλυμα έκπλυσης (PBS φιλτραρισμένο από 0.2μm, Tween-20 0.05% v/v) και στέγνωμα σε απορροφητικό χαρτί. Προσθήκη 200μL

διαλύματος αραιώσης δειγμάτων (assay/sample buffer) σε κάθε θέση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ανακίνηση.

- Έκπλυση 4 φορές, στέγνωμα και προσθήκη 100μL διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης και αραιωμένων δειγμάτων ορού στις κατάλληλες θέσεις.
- Αεροστεγής κάλυψη της πλάκας και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες με ανακίνηση.
- Έκπλυση 4 φορές, στέγνωμα και προσθήκη 100μL διαλύματος αντισώματος ανίχνευσης (detection antibody) σε κάθε θέση. Αεροστεγής κάλυψη και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ανακίνηση.
- Έκπλυση 4 φορές, στέγνωμα και προσθήκη 100μL συμπλέγματος αβιδίνης-υπεροξειδάσης (avidin-Horse Radish Peroxidase, avidin-HRP) σε κάθε θέση. Αεροστεγής κάλυψη και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά με ανακίνηση.
- Έκπλυση 5 φορές, με αναμονή ενός λεπτού σε κάθε έκπλυση. Αφαίρεση του διαλύματος έκπλυσης και στέγνωμα της πλάκας. Προσθήκη 100μL διαλύματος του υποστρώματος της υπεροξειδάσης σε κάθε θέση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 15 λεπτά.
- Προσθήκη 100μL διαλύματος παύσης αντίδρασης σε κάθε θέση. Μέτρηση της απορρόφησης στα 570 και στα 450nm. Το αποτέλεσμα προκύπτει από την αφαίρεση της απορρόφησης στα 570 από την αντίστοιχη στα 450nm.

Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας με τα σετ (kits) που χρησιμοποιήθηκαν για τις ορμονολογικές εξετάσεις στους ποντικούς:

Όνομα σετ	Εταιρεία	Κωδικός
Mouse Adiponectin/Acrp30 DuoSet ELISA Kit	R & D, USA	DY1119
Mouse IL-1 β ELISA MAX Deluxe Set	Biolegend, USA	432604
Mouse IL-2 ELISA MAX Deluxe Set	Biolegend, USA	431004
Mouse IL-6 ELISA MAX Deluxe Set	Biolegend, USA	431304
Mouse IL-10 ELISA MAX Deluxe Set	Biolegend, USA	431414
Mouse Leptin DuoSet ELISA Kit	R & D, USA	DY498
Mouse Resistin DuoSet ELISA Kit	R & D, USA	DY1069
Mouse TNF- α ELISA MAX Deluxe Set	Biolegend, USA	430904

Πίνακας 11

Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων έγινε με τον εξής τρόπο:

Αρχικά έγινε αφαίρεση της απορρόφησης κάθε δείγματος από την απορρόφηση του δείγματος αναφοράς, ώστε να προκύψει η σχετική απορρόφηση του κάθε δείγματος. Έπειτα, η καμπύλη αναφοράς σχεδιάστηκε ως η σχετική απορρόφηση του κάθε δείγματος γνωστής συγκέντρωσης προς την αντίστοιχη συγκέντρωση του δείγματος. Τέλος, η συγκέντρωση των ορμονών στα δείγματα ορού ποντικού υπολογίστηκε με τη μαθηματική μέθοδο της παρεμβολής (interpolation) από την καμπύλη αναφοράς, με τη βοήθεια των διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

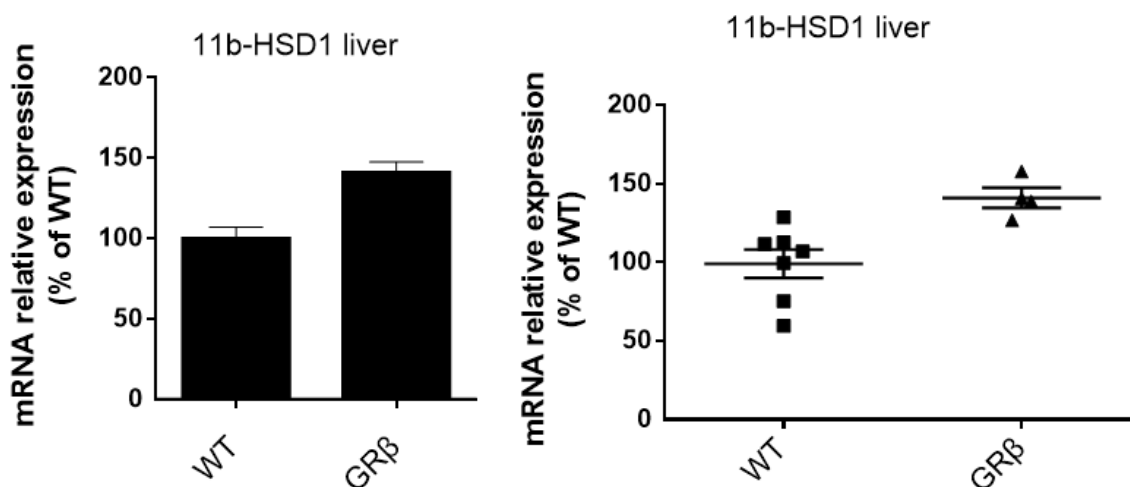
Οι ομάδες ποντικών που μελετήθηκαν αρχικά ήταν, όπως προαναφέρθηκε, οκτώ (βλ. Πίνακα 1). Από αυτές τις οκτώ όμως μόνο μία είναι εκείνη που έχει ουσιαστικά ενεργοποιημένο το σύστημα του διενεργοποιητή και επάγεται η υπερέκφραση του hGRβ από τους ιστούς των ποντικών, η hGRβ/rtTA με έκθεση στη δοξυκυκλίνη (Tet On). Επειδή οι μικροδιαφορές που παρουσιάζονται ανάμεσα στις υπόλοιπες επτά ομάδες είναι αμελητέες, έγινε σύμπτυξη όλων αυτών των δειγμάτων σε μια μεγάλη ομάδα που ονομάστηκε "Tet Off". Επομένως, οι τέσσερις ομάδες που δεν εκτέθηκαν σε δοξυκυκλίνη (με κανένα, ένα ή δύο διαγονίδια), όπως και οι τρεις ομάδες ποντικών που δεν είχαν και τα δύο διαγονίδια,

Real Time PCR για μελέτη των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη δράση των γλυκοκορτικοειδών

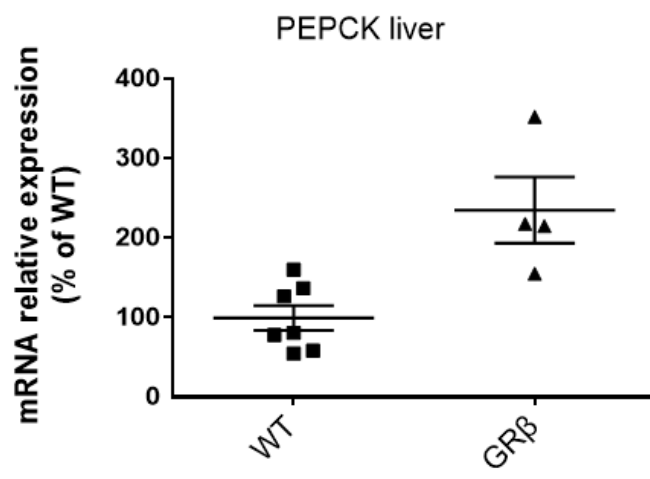
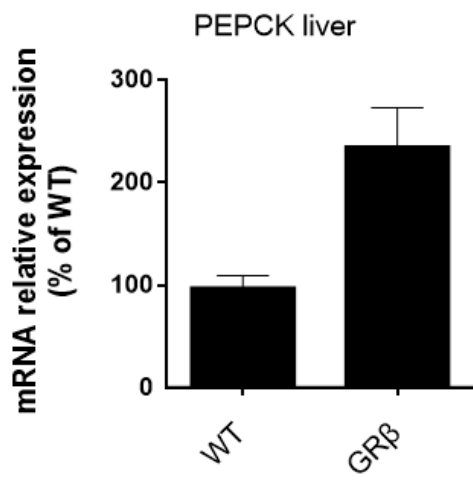
Τα διαγράμματα στα αριστερά απεικονίζουν τη σχετική έκφραση του mRNA των γονιδίων στα GRβ/rtTA δείγματα, συγκριτικά με τα αγρίου τύπου. Εκείνα στα δεξιά απεικονίζουν το εύρος των τιμών μέσα στις ίδιες ομάδες μελέτης.

Να σημειωθεί ότι όλες οι διαφορές κρίθηκαν στατιστικά σημαντικές.

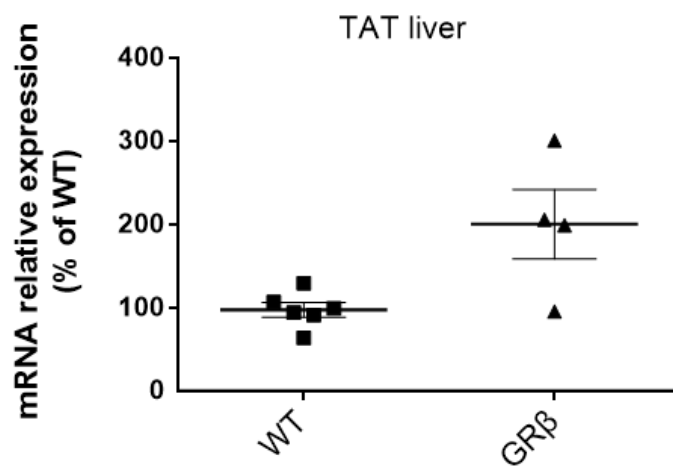
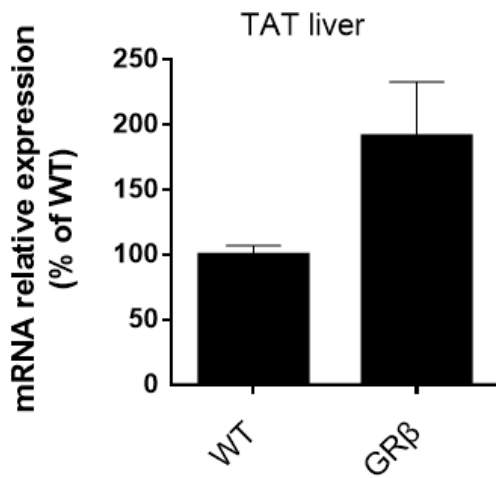
Γονίδια στο ήπαρ: *11b-HSD1*, *PEPCK*, *TAT*, *G6Pase*



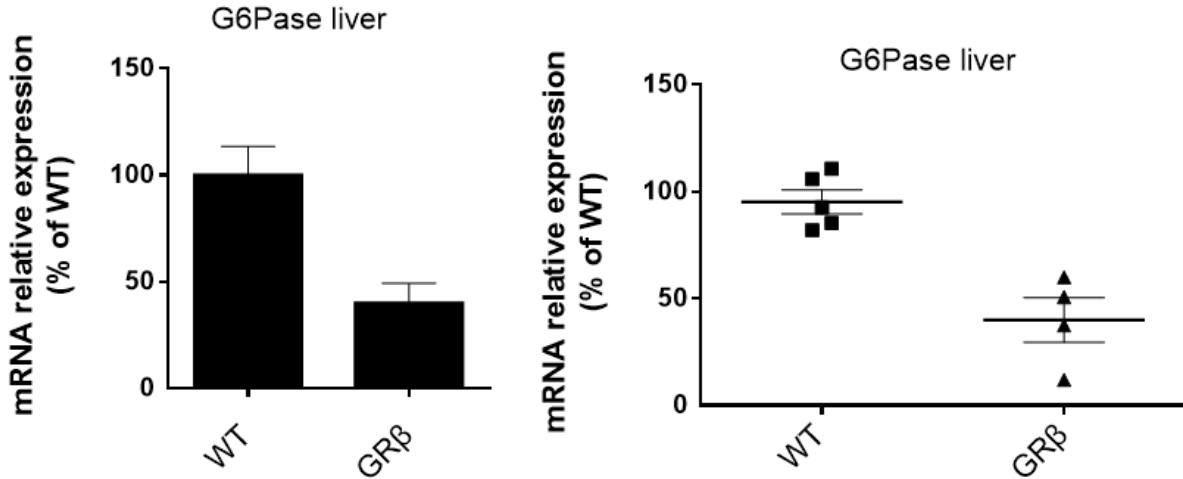
11βHSD1		
	On	Off
Αρ. ποντικών	4	12
Mean ± SEM	141,0 ± 6,369	100,0 ± 6,941
p value	0,0063	



PEPCK		
	On	Off
Αρ. ποντικών	8	13
Mean ± SEM	235,2 ± 37,86	97,44 ± 11,80
ρ value	0,0005	

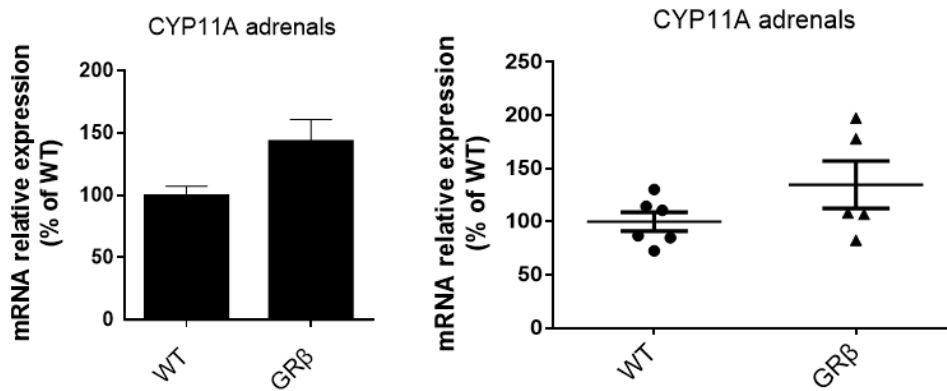


TAT		
	On	Off
Αρ. ποντικών	6	10
Mean ± SEM	191,3 ± 41,47	100,0 ± 6,990
ρ value	0,0143	

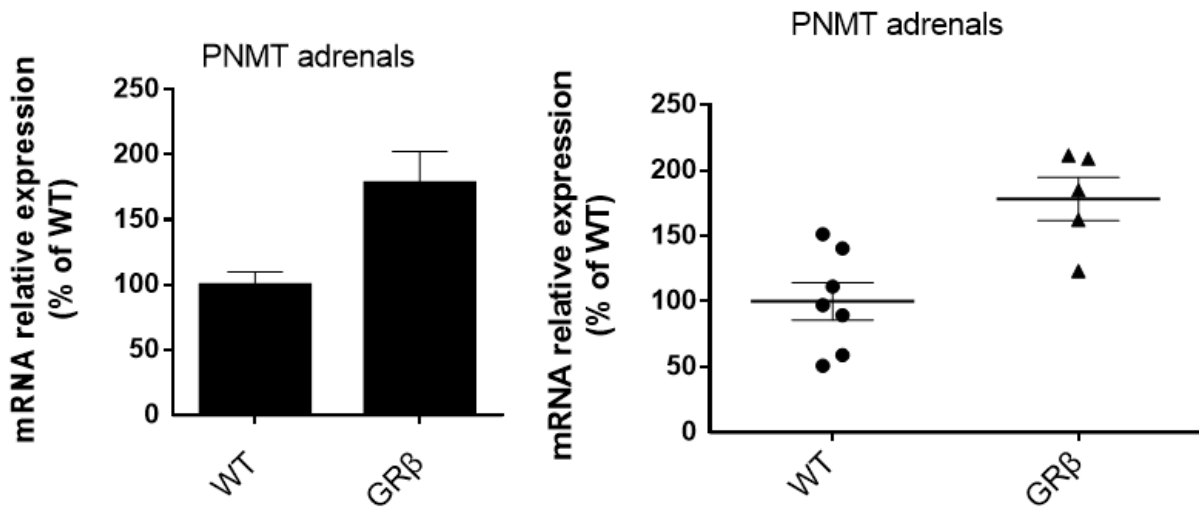


G6Pase		
	On	Off
Αρ. ποντικών	8	11
Mean ± SEM	40,00 ± 9,340	100,0 ± 13,57
p value	0,0037	

Γονίδια στα επινεφρίδια: *CYP11A*, *PNMT*

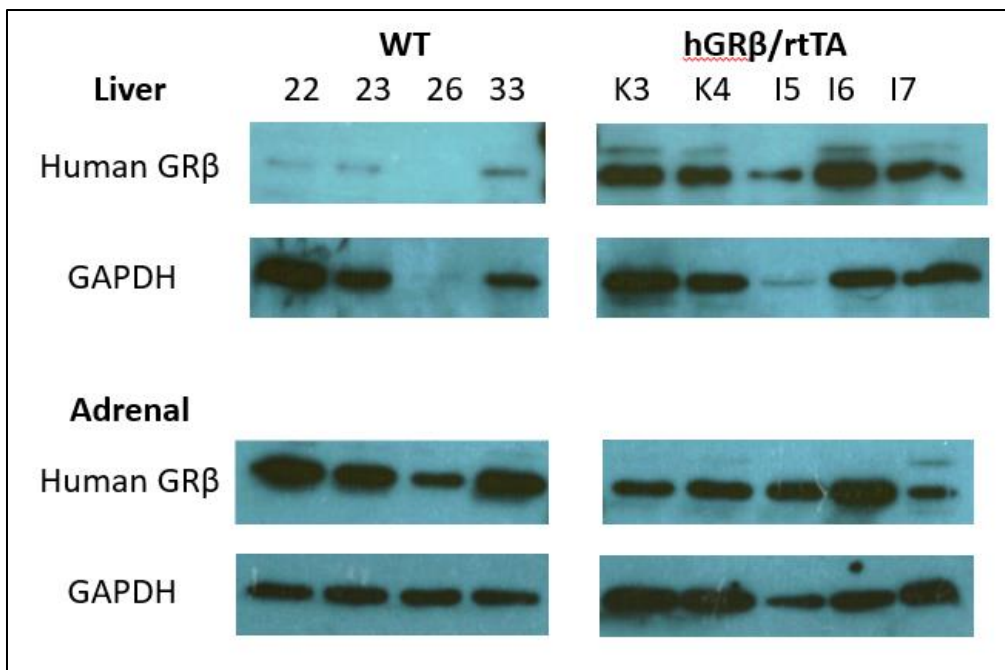


CYP11A		
	On	Off
Αρ. ποντικών	9	12
Mean ± SEM	143,6 ± 17,28	100,0 ± 7,411
p value	0,0198	



PNMT		
	On	Off
Αρ. ποντικών	10	14
Mean ± SEM	178,2 ± 24,21	100,0 ± 10,1
p value	0,0032	

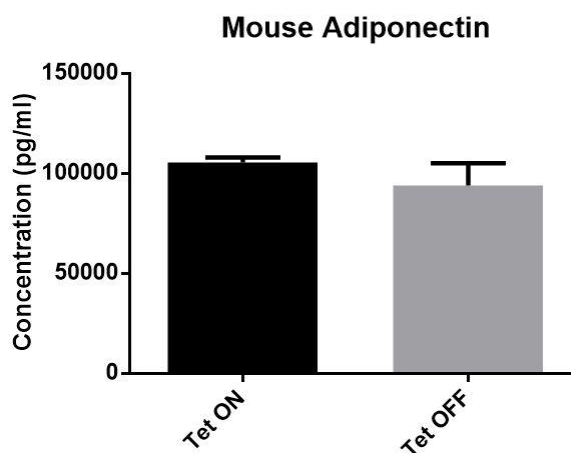
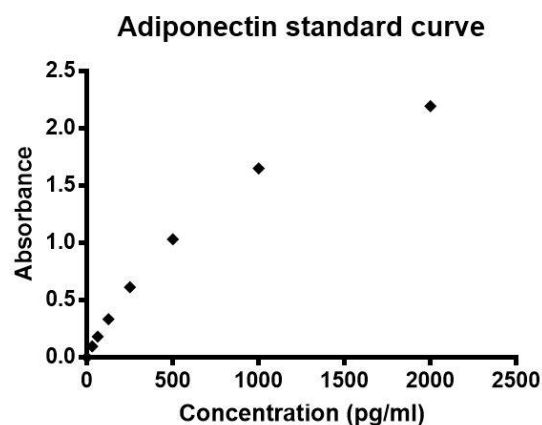
Στύπωμα κατά Western για εντοπισμό του hGRβ στο ήπαρ και στα επινεφρίδια



Γίνεται σύγκριση της έκφρασης του ανθρώπινου GRβ με την έκφραση ενός γονιδίου σταθερής έκφρασης σε όλους τους ιστούς (housekeeping gene), σε αυτή την περίπτωση του ενζύμου GAPDH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης, GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase) στον ποντικό.

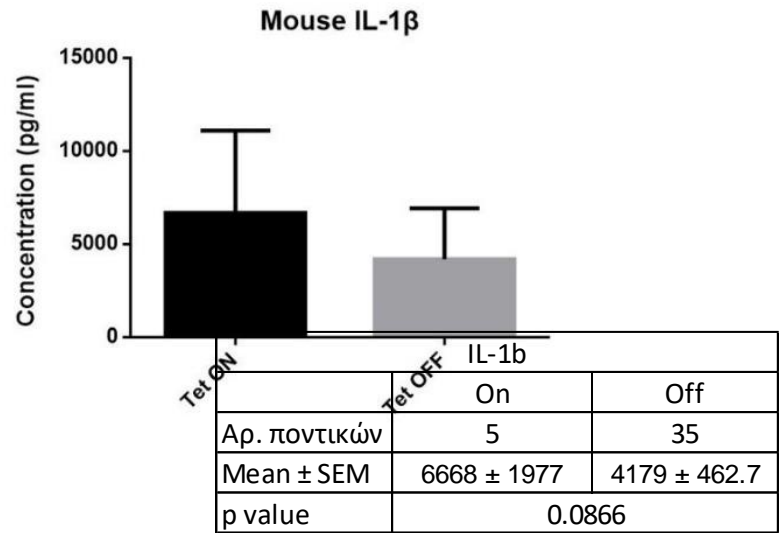
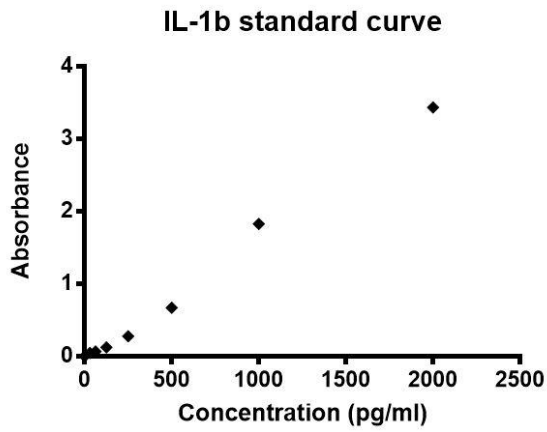
Ενδοκρινολογικές εξετάσεις

Αδιπονεκτίνη

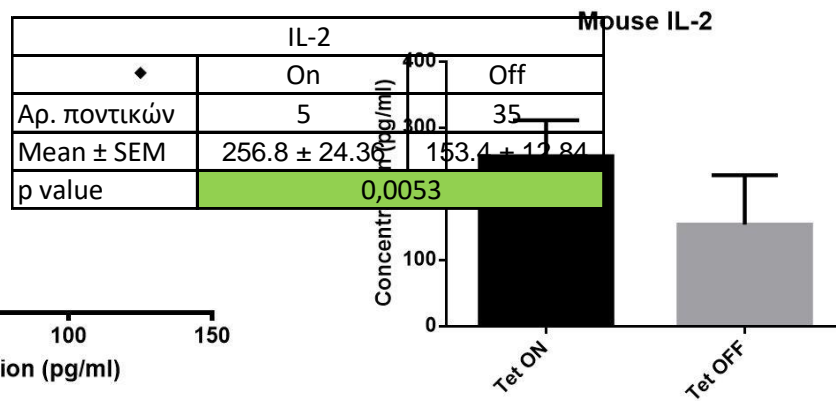
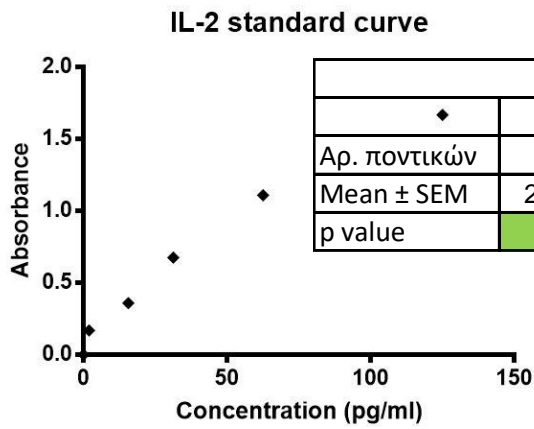


Adiponectin		
	On	Off
Αρ. ποντικών	5	35
Mean ± SEM	105378 ± 1143	93983 ± 1872
p value	0.0111	

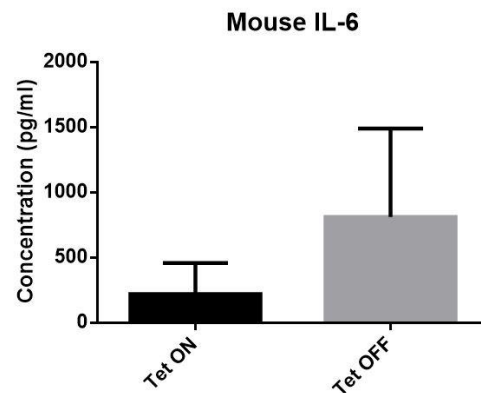
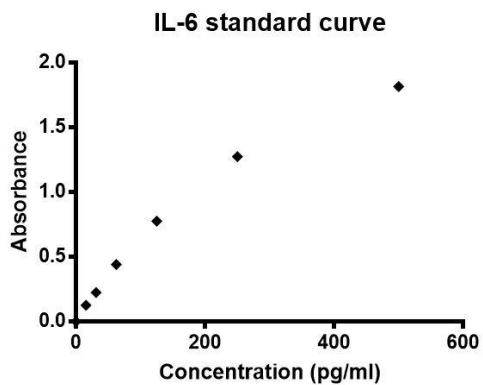
Ιντερλευκίνη 1β



Ιντερλευκίνη 2

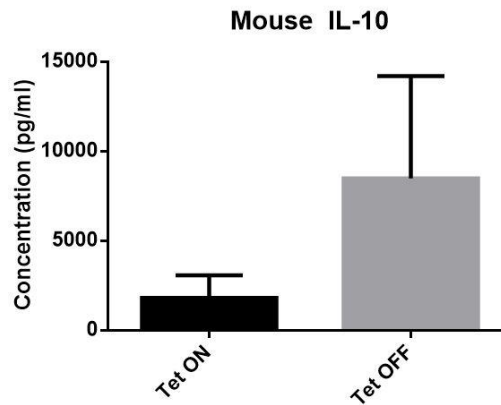
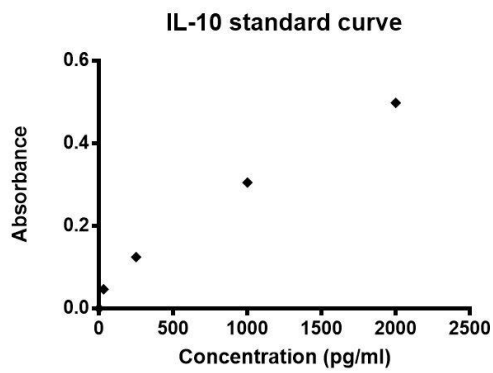


Ιντερλευκίνη 6



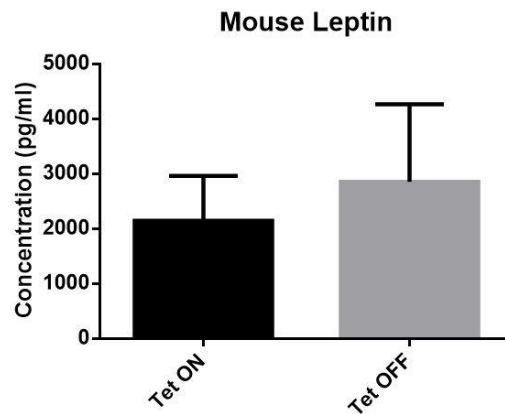
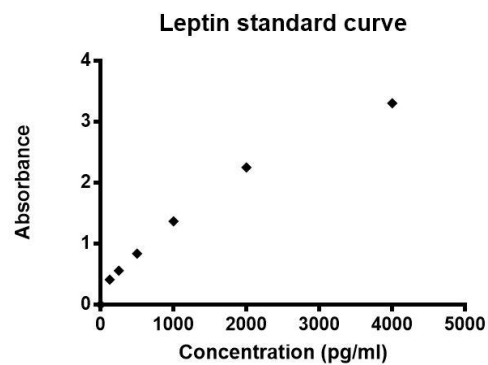
IL-6		
	On	Off
Αρ. ποντικών	5	35
Mean ± SEM	219.0 ± 106.7	811.0 ± 125.9
p value	0,0651	

Ιντερλευκίνη 10



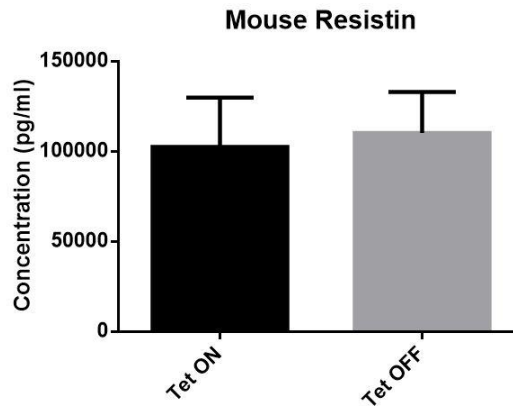
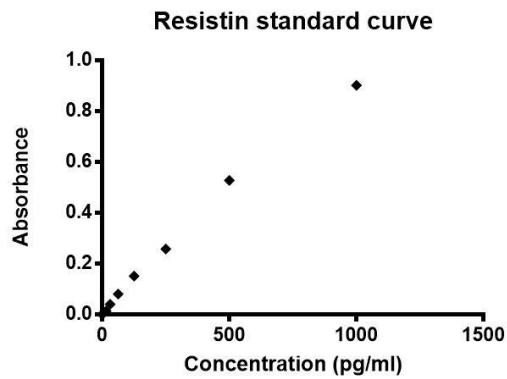
IL-10		
	On	Off
Αρ. ποντικών	5	35
Mean ± SEM	1805 ± 566.0	8477 ± 1026
p value	0,0146	

Λεπτίνη



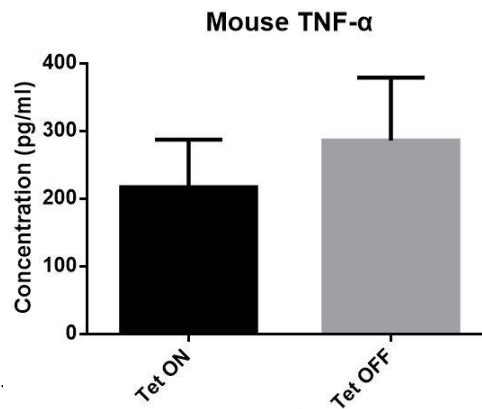
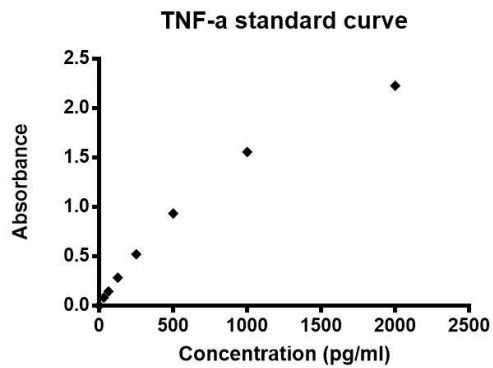
Leptin		
	On	Off
Αρ. ποντικών	5	35
Mean ± SEM	2146 ± 363.7	2851 ± 239.1
p value	0,286	

Ρεζιστίνη



Resistin		
	On	Off
Αρ. ποντικών	5	35
Mean ± SEM	102487 ± 12194	110243 ± 3835
p value	0,4889	

Παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF-α)



TNF-a		
	On	Off
Αρ. ποντικών	5	35
Mean ± SEM	216.8 ± 31.51	285.9 ± 15.69
p value	0,1192	

Παρατηρούμε ότι οι p values των ορμονών αδιπονεκτίνη, ιντερλευκίνη 2 και ιντερλευκίνη 10 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p value < 0.05).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μέσω της δημιουργίας των διπλών γονιδιακών ζώων που υπερεκφράζουν τον hGRβ, έχουμε στόχο να παρομοιάσουμε την κατάσταση της αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή σε μοντέλο ποντικών. Σε υπερέκφραση του υποδοχέα human GRβ, η δράση του λειτουργικού υποδοχέα mouseGRα **θεωρούμε ότι «φθίνει»** λόγω της επικρατούσας αρνητικής δράσης του πρώτου. Άρα, τα γλυκοκορτικοειδή που παράγονται στον οργανισμό του ποντικού, δεν μπορούν να έρθουν σε επαφή με τον λειτουργικό τους υποδοχέα. Αυτό επιφέρει συσσώρευση γλυκοκορτικοειδών στο αίμα των ποντικών, και αναμένονται όλα τα μονοπάτια δράσης τους που προϋποθέτουν λειτουργικό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, να μη δείξουν μεγάλη δραστηριότητα.

Από την άλλη μεριά, αν και είναι πιο σπάνιο φαινόμενο, είναι πιθανό να μη βλέπουμε τα επιθυμητά αποτελέσματα επειδή ο GR έχει σε κάποιες περιπτώσεις την ικανότητα να ασκεί **μη γενωμικές δράσεις σαν μονομερές** (π.χ. αλληλεπιδράσεις με τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 και NF-κΒ, Tuckermann *et al.*, 1999). Αυτό σημαίνει ότι δεν είναι απαραίτητη η πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών στον λειτουργικό υποδοχέα για όλες τις μη γονιδιωματικές δράσεις.

Μελέτη έκφρασης γονιδίων σε ήπαρ και επινεφρίδια

Το εξαρτώμενο από τα γλυκοκορτικοειδή γονίδιο **TAT** (Tyrosine AminoTransferase) κωδικοποιεί μια τυροσινική αμινοτρανσφεράση του ήπατος που καταλύει τη μετατροπή της L-τυροσίνης σε p-υδροξυφαινυλοπυροσταφυλικό. Παρατηρείται αύξηση της έκφρασής του στα ποντίκια με υπερέκφραση του hGRβ, κάτι που μπορεί να σημαίνει ότι είτε η υπερέκφραση του ανθρώπινου GRβ δεν επηρεάζει τον GRα του ποντικού είτε ότι τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν ρυθμιστικές δράσεις που ακόμα δεν είναι γνωστές.

Όπως εκτενώς αναφέρθηκε στην εισαγωγή, η **11β-HSD1** μετατρέπει την κορτιζόνη σε ενεργή κορτιζόλη. Η αύξηση της 11β-HSD1 σημαίνει ότι, εάν δεν ελέγχεται μόνο από τα γλυκοκορτικοειδή, κάποιος άλλος παράγοντας αυξορρυθμίζει την έκφρασή της, γιατί ανιχνεύει αυξημένες συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών στην κυκλοφορία. Επομένως, σαν ένας μηχανισμός ρύθμισης του οργανισμού, αυξάνεται η παραγωγή του ενζύμου, για να μπορεί να υπάρχει ένας έλεγχος στις συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών, μέσω της μετατροπής της κορτιζόλης σε ανενεργή, μη δραστική κορτιζόνη.

Γνωρίζουμε ότι ο GRβ ρυθμίζει την έκφραση του ηπατικού γονιδίου **PEPCK** (PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase) και της ηπατικής γλυκονεογένεσης (Kino, 2017). Παρατηρείται μια αύξηση στην έκφρασή του, σχεδόν 2,5 φορές σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια, η οποία υποδεικνύει άμεση συσχέτιση της υπερέκφρασης του GRβ με την υπερέκφραση της PEPCK.

Ομοίως, το γονίδιο **G6Pase** (Glucose 6-Phosphatase) εμπλέκεται στη διαδικασία της γλυκονεογένεσης, αλλά και της γλυκόλυσης, μετατρέποντας την 6-φωσφορική γλυκόζη σε γλυκόζη. Παρατηρείται μια μείωση στο μισό της έκφρασής της, κάτι που ίσως να συμφωνεί με το μοντέλο αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή που επιθυμούμε να αναπαραστήσουμε, αλλά έρχεται σε αντίθεση με την έκφραση των υπόλοιπων γονιδίων στο ήπαρ. Ίσως, λοιπόν, η

G6Pase να ρυθμίζεται ισχυρότερα από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, σε σχέση με τα γλυκοκορτικοειδή.

Το γονίδιο **CYP11A** κωδικοποιεί (στα επινεφρίδια) μέρος του κυτοχρώματος P450, του πρώτου ενζυμικού συμπλόκου της στεροειδογένεσης. Καταλύει τη μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη. Στην περίπτωση της υπερέκφρασης του GRβ, η αύξηση της έκφρασης του CYP11A ίσως να εξηγείται από αποτυχία του hGRβ να καταστείλλει τον mGRα και τελικά το σύστημα να λειτουργεί μερικώς όπως πριν.

Τέλος, το γονίδιο της **PNMT** (N-Methyl Transferase, N-μεθυλοτρανσφεράσης), που εμπλέκεται στην παραγωγή της επινεφρίνης και περιορίζει την παραγωγή κατεχολαμινών στα επινεφρίδια (Adams *et al.*, 2003), παρουσιάζει αύξηση. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την πιθανή ενεργοποίηση άλλων μεταγραφικών παραγόντων που αυξορρυθμίζουν την έκφραση της PNMT, λόγω της αυξημένης ανάγκης των hGRβ ποντικών να περιορίσουν την έκφραση των κατεχολαμινών, επειδή έχουν όμοια δράση με τα γλυκοκορτικοειδή. Άρα, ο οργανισμός αυτών των ποντικών ίσως να έχει δράσει εδώ με μια αντισταθμιστική ρύθμιση παρόμοιας ομάδας ορμονών με τα γλυκοκορτικοειδή, για να αποφορτίσει τον ήδη βεβαρυσμένο άξονα HPA από το στρες που δεν επιλύεται.

Στύπωμα κατά Western για εντοπισμό του hGRβ στο ήπαρ και στα επινεφρίδια

Πρώτα απ' όλα να διευκρινιστεί ότι θα ήταν σωστότερο να χρησιμοποιηθεί ανθρώπινο δείγμα για σύγκριση, ωστόσο είναι σπάνια τα άτομα με αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή λόγω υπερέκφρασης του GRβ. Συνεπώς, ήταν αδύνατο να βρεθεί ανθρώπινος ιστός από ήπαρ και επινεφρίδια, ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν αγρίου τύπου (WT) δείγμα.

Στην εικόνα 12, συγκρίνοντας τα δείγματα από το ήπαρ: μηδαμινή έκφραση του humanGRβ στο ήπαρ των αγρίου τύπου ποντικών, και αναμενόμενη αυξημένη έκφρασή του στο ήπαρ των hGRβ ποντικών. Για οδηγό είχαμε και τις συγκεντρώσεις του σταθερής έκφρασης γονιδίου (housekeeping gene) GAPDH. Το δείγμα 15 προφανώς είχε μικρή ποσότητα ολικών πρωτεϊνών, γι'αυτό και παρατηρούνται μικρές ποσότητες τόσο στον hGRβ όσο και στην GAPDH.

Όσον αφορά στα επινεφρίδια, παρατηρείται μια καθολική σταθερή έκφραση τόσο του hGRβ όσο και της GAPDH και στις δύο εξεταζόμενες ομάδες ποντικών. Αυτό μπορεί να αποδοθεί σε:

- μεγαλύτερη επαγωγή της έκφρασης του hGRβ στο ήπαρ, διότι εκεί μεταβολίζεται η δοξυκυκλίνη
- μεγαλύτερη ποσότητα mouseGRβ στα επινεφρίδια των αγρίου τύπου ποντικών και λόγω περίσσειας, το αντίσωμα για humanGRβ να προσδένεται και στον mouseGRβ λόγω συγγένειας
- αδυναμία εξειδικευμένης πρόσδεσης του αντισώματος στον humanGRβ, γιατί ναι μεν το αντίσωμα είναι σχεδιασμένο εξειδικευμένα για το μη ομόλογο τμήμα των υποδοχέων, αλλά δεν υπάρχει ακόμα 3D μοντέλο του GRβ για τον άνθρωπο.

Το πιθανότερο σενάριο φαίνεται να είναι το τρίτο.

Ενδοκρινολογικές εξετάσεις

Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, στις οποίες ανήκουν οι IL-1β, IL-2, IL-6 και ο TNF-α, είναι εκείνες που προάγουν τη φλεγμονώδη απόκριση και αναμενόμενο είναι τα γλυκοκορτικοειδή να καταστέλλουν την παραγωγή τους (Beutler *et al.*, 1986; Boumpas *et al.*, 1993). Στην παρούσα μελέτη όμως, που προσπαθήσαμε να αναπαραστήσουμε αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή μέσω του hGRβ, αναμένεται αύξηση της παραγωγής τους. Αντιθέτως, οι αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, δηλαδή ο IL-10, είναι εκείνες που με τη δράση τους προσπαθούν να καταστείλουν τη φλεγμονώδη απόκριση, και σε αυτές περιμένουμε να δούμε μειωμένα επίπεδα.

Όπως ήταν αναμενόμενο, οι **IL-1β** και **IL-2** είχαν αυξημένα επίπεδα. Ωστόσο, η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική μόνο στην IL-2. Η στατιστικά μη σημαντική αλλαγή στα επίπεδα IL-1β πιθανότατα οφείλεται στα λίγα και ανομοιογενή τυχαία δείγματα. Αντιθέτως, η **IL-6** δείχνει να έχει μειωθεί, κάτι που θα μπορούσε να αποδοθεί σε κάποιον ρόλο της που ακόμα δεν είναι γνωστός, εάν η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική. Ομοίως για τον **TNF-α**.

Ο κύριος ρόλος της αντιφλεγμονώδους **IL-10** είναι η επίλυση της φλεγμονής (Martinez *et al.*, 2008) και η έκφρασή της ρυθμίζεται θετικά από τα γλυκοκορτικοειδή (Szatmari & Nagy, 2008). Στο πείραμά μας, όπως ήταν αναμενόμενο, βλέπουμε μια στατιστικά σημαντική μεγάλη μείωση της IL-10, κάτι που εξηγείται από τη συνεχή φλεγμονή στην οποία βρίσκονται τα διπλά διαγονιδιακά ζώα, εφόσον τα γλυκοκορτικοειδή δεν μπορούν να προσδεθούν στον ανενεργό υποδοχέα, άρα δεν παύει η φλεγμονώδης απόκριση.

Η πτώση στα επίπεδα **αδιπυροκίνης** σχετίζεται με αντίσταση στην ινσουλίνη (Diez & Iglesias, 2003). Στη μελέτη μας, παρατηρείται μεν μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκκριση αδιπυροκίνης στα διπλά διαγονιδιακά ποντίκια, σε σχέση με τα αγρίου τύπου.

Η **ρεζιστίνη** δεν παρουσιάζει μεγάλες διαφορές μεταξύ διαγονιδιακών ποντικών με υπερέκφραση του hGRβ και αγρίου τύπου ποντικών. Μπορεί αυτό να οφείλεται σε μη αρκετά παρατεταμένη επαγωγή της έκφρασης του hGRβ στα ποντίκια.

Η **λεπτίνη** ρυθμίζει την πρόσληψη τροφής και την κατανάλωση ενέργειας και η αύξηση των γλυκοκορτικοειδών επιφέρει την αύξησή της (Tomabechi *et al.*, 2018). Άρα, στα ποντίκια μας αναμέναμε μια πτώση της λεπτίνης, όπως και παρατηρήθηκε, παρόλο που δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Σε γενικές γραμμές, μια πιο σίγουρη εικόνα με στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα θα μπορούσε να δοθεί μετά από συλλογή περισσότερων δειγμάτων και επανάληψη του πειράματος.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Buckingham JC (2006) Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *British Journal of Pharmacology* 147, S258–S268
- Bushey AM, Dorman ER, Corces VG (2008) Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance. *Mol Cell*. 32(1): 1–9.
- Cain DW, Cidlowski JA (2017) Immune regulation by Glucocorticoids, *Nature Reviews Immunology* 17:233–247
- Charmandari E, Ichijo T, Jubiz W, Baid S, Zachman K, Chrousos GP, 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: 4963 - 4968
- Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Chrousos GP. (2008) Generalized glucocorticoid resistance: clinical aspects, molecular mechanisms, and implications of a rare genetic disorder. *J Clin Endocrinol Metab*, 93:1563-1572
- Chrousos GP, Charmandari E, Kino T (2004) Editorial: Glucocorticoid Action Networks—An Introduction to Systems Biology. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(2):563 - 564
- Chrousos GP, Charmandari E, Kino T (2004) Editorial: Glucocorticoid Action Networks—An Introduction to Systems Biology. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(2):563–564
- Chrousos GP, Kino T (2009) Glucocorticoid Signaling in the Cell Expanding Clinical Implications to Complex Human Behavioral and Somatic Disorders. *Glucocorticoids and Mood: Ann NY Acad Sci* 1179: 153–166
- Elenkov IJ, Chrousos GP (2002) Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines, and Autoimmunity. *Ann NY Acad Sci*, 966: 290–303
- Gan, W., Li, T., Ren, J. *et al.* (2018) Serum–glucocorticoid-regulated kinase 1 contributes to mechanical stretch-induced inflammatory responses in cardiac fibroblasts *Mol Cell Biochem*, 445: 67
- Gassen NC, Chrousos GP, Binder EB, Zannas AS (2017) Life stress, glucocorticoid signaling, and the aging epigenome: Implications for aging-related diseases. *Neurosci Biobehav Rev*, 74(B):356-365
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 5547-5551
- Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujardt H (1995) Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian Cells. *Science*, 268: 1766-1769
- Hassan-Zadeh V, Chilaka S, Cadoret J-C, Kit-Wan Ma M, Boggetto N, *et al.* (2012) USF Binding Sequences from the HS4 Insulator Element Impose Early Replication Timing on a Vertebrate Replicator. *PLoS Biol* 10(3)

- Kadmiel M, Cidlowski JA (2013) Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(9): 518-530
- Katsantoni EZ, Anghelescu NE, Rottier R, Moerland M, Antoniou M, de Crom R, Grosveld F, Strouboulis J (2007). Ubiquitous expression of the rtTA2S-M2 inducible system in transgenic mice driven by the human hnRNPA2B1/CBX3 CpG island. *BMC Dev Biol* 7: 108
- Kino T, Manoli I, Kelkar S, Wang Y, Su YA, Chrousos GP. (2009) Glucocorticoid receptor (GR) b has intrinsic, GR α -independent transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 381:671-675
- Kino T, Su YA, Chrousos GP. (2009) Human glucocorticoid receptor isoform b: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci*, 66:3435-3448
- Kino T. (2000) Glucocorticoid Receptor [Updated 2017 Aug 15]., De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, *et al.* editors, Endotext, South Dartmouth
- Laird PW, Zijderfeld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch, R, Berns A (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*, 19: 4293
- Leung DYM, Hamid Q, Vottero A, Szeffler SJ, Surs W, Minshall E, Chrousos GP, Klemm DJ (1997) Association of Glucocorticoid Insensitivity with Increased Expression of Glucocorticoid Receptor b. *The Journal of Experimental Medicine* 186: 9, 1567–1574
- Michalon A, Koshibu K, Baumgartel K, Spirig DH, Mansuy IM (2005). Inducible and neuron-specific gene expression in the adult mouse brain with the rtTA2S-M2 system. *Genesis* 43(4):205-212
- Miller, W. L. (1988). Molecular biology of steroid hormone biosynthesis. *Endocr. Rev.* 9, 295-318
- Miyazaki J, Takaki S, Araki K, Tashiroe F, Tominaga A, Takatsu K, Yamamura K (1989) Expression vector system based on the chicken β -actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene*; 79: 269-277
- Nicolaidis N, Kyratzi E, Lamprokostopoulou A, Chrousos G, Charmandari E (2015) Stress, the Stress System and the Role of Glucocorticoids, *Neuroimmunomodulation* 22:6-19
- Nicolaidis NC, Charmandari E (2015) Chrousos syndrome: from molecular pathogenesis to therapeutic management. *Eur J Clin Invest*, 45 (5):504–514
- Nicolaidis NC, Charmandari E (2017) Novel insights into the molecular mechanisms underlying generalized glucocorticoid resistance and hypersensitivity syndromes. *Hormones*, 16(2): 124-138
- Norman AW, Litwack G (1997) Steroid Hormones: Chemistry, Biosynthesis and Metabolism. *Hormones (Second Edition)*, 49-86
- Ramezani A, Hawley RG (2010) Strategies to Insulate Lentiviral Vector-Expressed Transgenes. *Methods Mol Biol.* ; 614: 77–100

- Rival-Gervier S, Pantano T, Viglietta C, Maeder C, Prince S, Attal J, Jolivet G, Houdebine LM. (2003) The insulator effect of the 5'HS4 region from the beta-globin chicken locus on the rabbit WAP gene promoter activity in transgenic mice. *Transgenic Res.* 12(6):723-30
- Sheng Y, Lin C-C, Yue J, Sukhwani M, Shuttleworth JJ, Chu T, Orwig KE (2010) Generation and characterization of a Tet-On (rtTA-M2) transgenic rat. *BMC Developmental Biology*, 10:17
- Souverein PC, Berard A, Van Staa TP, Cooper C, Egberts ACG, Leufkens HGM, Walker BR (2004) Use of oral glucocorticoids and risk of cardiovascular and cerebrovascular disease in a population based case-control study. *Heart*, 90:859-865
- Stahn C, Lowenberg M, Hommesc DW, Buttgereit F (2007) Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists, *Molecular and Cellular Endocrinology* 275:71-78
- Tasker JG (2006) Rapid Glucocorticoid Actions in the Hypothalamus as a Mechanism of Homeostatic Integration. *Obesity (Silver Spring)*. Vol. 14 Suppl 5: 259S-265S.
- Urlinger, S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, Hillen W (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci* 97: 7963-7968
- Webster MK, Goya L, Ying GE, Maiyar AC, Firestone GL (1993) Characterization of sgk, a Novel Member of the Serine/Threonine Protein Kinase Gene Family Which Is Transcriptionally Induced by Glucocorticoids and Serum. *Molecular and Cellular Biology*, 13:4, 2031-2040
- Zhu D, *et al.*, (2016) A novel role for the mineralocorticoid receptor in glucocorticoid driven vascular calcification, *Vascul. Pharmacol*, 1537-1891
- Zou C, Li W, Pan Y, Khan ZA, Li J, Wu X, Wang Y, Deng L, Liang G, Zhao Y (2017) 11 β -HSD1 inhibition ameliorates diabetes-induced cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis through modulation of EGFR activity. *Oncotarget*, 8: 56, 96263-96275