



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ
ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ»**



ΣΕΜΑΝΙΑΚΟΥ ΠΟΛΙΑΝΑ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2013

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΣΕ
ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ»**

ΣΕΜΑΝΙΑΚΟΥ ΠΟΛΙΑΝΑ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π.Μουτσάτσου Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
(Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)

Ευανθία Ν. Κασσή Επίκουρη Καθηγήτρια

Χρήστος Κρούπης Επίκουρος Καθηγητής

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με την παρούσα διπλωματική εργασία ολοκληρώνεται το εκπαιδευτικό μου ταξίδι στο Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «ΚΛΙΝΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ», που διοργανώνεται από τα Τμήματα Βιολογίας, Χημείας και Νοσηλευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η εκπόνησή της πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα Οκτώβριος 2011 έως Φεβρουάριος 2013, στο εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας στο Χωρέμιο Ερευνητικό Εργαστήριο στο Νοσοκομείο Παίδων «Αγία Σοφία» υπό την επιστημονική καθοδήγηση της κ. Αμαλίας Σερτεδάκη (Βιοχημικός, PhD). Φτάνοντας στο τέλος αυτής της προσπάθειας θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες καθώς και την ευγνωμοσύνη μου σε όλα τα πρόσωπα που με την υποστήριξη, την εμπιστοσύνη, τις συμβουλές και την αγάπη τους συνέβαλαν στην επιτυχή διεξαγωγή της εργασίας αυτής.

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ.Μουτσάτσου Παρασκευή (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια) που με εμπιστεύτηκε ώστε να με εντάξει στην ερευνητική της ομάδα και μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω πάνω σε ένα επιστημονικό θέμα που προσέλκυσε από την αρχή το ενδιαφέρον μου. Σε όλη αυτήν την πορεία ήταν πάντοτε πρόθυμη να απαντά στα ερωτήματα και τις απορίες μου. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εργαστηριακή επίβλεψη την κ. Αμαλία Σερτεδάκη. Αισθάνομαι ευγνώμων για το χρόνο που μου έχει αφιερώσει και τη συμβολή της στην ανάπτυξη της επιστημονικής μου σκέψης, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές, την καθοδήγηση και τη συμπαράστασή της, που συνέβαλαν στην επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας αλλά και στο σχεδιασμό της μελλοντικής μου πορείας. Η υποστήριξή της στα καθημερινά προβλήματα και στις ανησυχίες μου και η εμπύχωσή της ότι όλα θα πάνε καλά ήταν πραγματικά πολύτιμη βοήθεια για μένα. Θα ήθελα τέλος να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στην κ. Έλμα Ευαγγελοπούλου (Ιατρός Νευρολόγος) για την πρόθυμη βοήθειά της στην επιλογή των ασθενών.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου, που μου έμαθαν τι σημαίνει προσπάθεια, επιμονή και υπομονή, με εφοδίασαν με τις σημαντικότερες ηθικές αξίες και με βοήθησαν να σπουδάσω με πολλούς αγώνες και θυσίες, αλλά και στην αδερφή μου, Κωνσταντίνα, που σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου με στήριζε και συμμεριζόταν το άγχος και τις ανησυχίες μου. Τους ευχαριστώ που με

έκαναν να νιώθω ότι βρίσκονται πάντα στο πλευρό μου και με βοήθησαν να πιστέψω στον εαυτό μου και τις δυνατότητές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	i
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	iii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	v
 ΜΕΡΟΣ Α΄	 1
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	 2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.1 Τι είναι η Σκλήρυνση Κατά Πλάκας (ΣΚΠ).....	2
1.1.1 Ιστορική ανασκόπηση.....	3
1.1.2 Η σημασία της μυελίνης των νευρών	4
1.1.3 Αιτιολογία-Παθογένεση της ΣΚΠ	4
1.1.4 Ιστοπαθολογικά ευρήματα.....	5
1.1.5 Κλινική εικόνα (Συμπτώματα)	5
1.1.6 Πορεία της νόσου-Υποτροπές	7
1.1.7 Εργαστηριακά ευρήματα: (εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ηλεκτροφυσικές εξετάσεις ελέγχου του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού).....	8
1.1.8 Διάγνωση	10
1.1.9 Φαρμακευτική αγωγή	11
 1.2 ΓΕΝΙΚΑ-ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ.....	 13
1.2.1 Βιοσύνθεση των γλυκοκορτικοειδών στα επινεφρίδια	13
1.2.2 Βιολογικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών	14
 1.3. ΑΞΟΝΑΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ-ΥΠΟΦΥΣΗ-ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ ΚΑΙ Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ	 16
 1.4. ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ	 20
1.4.1 Ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στη φλεγμονή στην ΣΚΠ	20
1.4.2 Η επαγωγή της απόπτωσης από γλυκοκορτικοειδή στην ΣΚΠ	22
 1.5 Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ.....	 27
1.5.1 Γενικά-Πυρηνικοί Υποδοχείς	27
1.5.2 Γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών	29
1.5.3 Πρωτεΐνη του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών	31
1.5.4 Ισομορφία α και β του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	32
1.5.6 Μηχανισμός δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών	38
1.5.7 Μη-γενωμική δράση των γλυκοκορτικοειδών.....	43
1.5.8 Μιτοχονδριακές επιδράσεις των GCs	45
 1.6 ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ	 46
1.6.1 Ουβικιτιλίωση.....	47
1.6.1.1 Ουβικιτιλίωση του GR	47
1.6.2 SUMO-υλίωση.....	48
1.6.2.1 Sumo-υλίωση του GR	49
1.6.3 Ακετυλίωση	50
1.6.3.1 Ακετυλίωση του GR	50
1.6.4 Γλυκοζυλίωση.....	51
1.6.4.1 Γλυκοζυλίωση του GR	51
1.6.5 Μεθυλίωση	51
1.6.5.1 Μεθυλίωση του GR.....	52

1.6.6 Φωσφορυλίωση.....	53
1.6.6.1 Φωσφορυλίωση του GR- Εντοπισμός Φωσφορυλιωμένων θέσεων του GR	55
1.6.7. Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης του GR στη λειτουργία του Υποδοχέα.	57
1.7.1. Περιφερική και Κεντρική αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή.....	66
1.7.3. Πολυμορφισμοί του GR γονιδίου στην ΣΚΠ	71
ΜΕΡΟΣ Β΄	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	79
1. ΥΛΙΚΑ	79
1.1. Πληθυσμός υπο μελέτη.....	79
1.1.1 Φυσιολογικοί Μάρτυρες.....	79
1.1.2 Ασθενείς.....	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	80
2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	80
2.1 Σχεδιασμός πειράματος	80
2.2 Απομόνωση DNA	80
2.4 Έλεγχος των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v	88
2.5 Μέθοδος προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA (DNA sequencing)	88
2.6 Κατανομή χ^2 ή Fisher	94
ΜΕΡΟΣ Γ΄	95
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	96
1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	96
1.1 Ηλεκτροφόρηση DNA δειγμάτων	96
1.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.....	97
1.3 DNA sequencing.....	98
1.4 Στατιστική Ανάλυση.....	108
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	111
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	114
SUMMARY	115
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	116

«Γηράσκω αεί διδασκόμενος», ΣΩΚΡΑΤΗΣ

ΜΕΡΟΣ Α΄

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τι είναι η Σκλήρυνση Κατά Πλάκας (ΣΚΠ)

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση (ΠΣ) ή Σκλήρυνση κατά πλάκας (ΣΚΠ), είναι μια χρόνια πολυπαραγοντική νευρολογική νόσος, η οποία επηρεάζει κυρίως τους νεαρούς ενήλικες. Είναι η πιο κοινή νευρολογική νόσος που προσβάλλει το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), το οποίο αποτελείται από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό ^[1]. Η ΣΚΠ συμπεριφέρεται ως αυτοάνοση νόσος. Χρησιμοποιούμε τον όρο αυτό, όταν ο οργανισμός δεν αναγνωρίζει κάποιους ιστούς για δικούς του και τους επιτίθεται προκαλώντας βλάβες. Στην ΣΚΠ για λόγους που η ιατρική δεν μπορεί ακόμα να εξηγήσει, το ανοσοποιητικό σύστημα και συγκεκριμένα τα Τ-λεμφοκύτταρα επιτίθενται στη μυελίνη, που περιβάλλει και μονώνει τους νευράξονες (άξονες των νευρικών κυττάρων), μέσω των οποίων μεταδίδεται η πληροφορία σ' ένα άλλο κύτταρο, με αποτέλεσμα τα μηνύματα από και προς τον εγκέφαλο να μη μεταδίδονται σωστά ^[2]. Πρόκειται λοιπόν για μια απομυελινωτική νόσο που χαρακτηρίζεται από επαναλαμβανόμενες εστιακές και πολυεστιακές προσβολές του ΚΝΣ ^[3]. Μετά από μια πρώτη προσβολή από την ασθένεια, μπορεί να επέλθει ίαση και επιστροφή σε μια κανονική λειτουργία. Όμως δημιουργείται μια πλάκα, ένα είδος ουλής μέσα στο ΚΝΣ, η οποία μπορεί να επηρεάζει μόνιμα την κινητική και αισθητική λειτουργία. Η νόσος μπορεί να παρουσιάσει υποτροπή, με νέες προσβολές της μυελίνης, οι οποίες μπορούν να πλήξουν οποιοδήποτε μέρος του ΚΝΣ. Με την εξέλιξη αυτή δημιουργούνται πολλές πλάκες στο εγκέφαλο και στο νωτιαίο μυελό ^[2]. Ο κάθε ασθενής παρουσιάζει τη δική του ξεχωριστή εικόνα ανάλογα με το που ακριβώς θα προσβληθεί η μυελίνη του. Για το λόγο αυτό οι ερευνητές την έχουν παρομοιάσει με δακτυλικό αποτύπωμα, λόγω της μοναδικότητας που τη χαρακτηρίζει ανά περίπτωση ^[3]. Η ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων κυμαίνεται συνήθως μεταξύ των 20 με 40 ετών, με αυξημένη συχνότητα στις γυναίκες και στα ψυχρά κλίματα. Υπολογίζεται ότι η χρόνια αυτή ασθένεια έχει προσβάλλει παγκοσμίως πάνω από

2,5 εκατομμύρια ανθρώπους ^[2], ενώ στην Ελλάδα οι πάσχοντες ανέρχονται στους 8.000, σύμφωνα με στοιχεία της Ελληνικής Εταιρίας Σκλήρυνσης Κατά Πλάκας ^[4].

1.1.1 Ιστορική ανασκόπηση

Το 1395 στην Ολλανδία τοποθετείται το πρώτο πιθανό περιστατικό ΣΚΠ όταν μία δεκαεξάχρονη μετά από πτώση στον πάγο, παρουσίασε συμπτώματα πόνου και κινητικής δυσλειτουργίας των ποδιών. Με το πέρασμα του χρόνου τα συμπτώματα επιδεινώθηκαν με αύξηση της αναπηρίας, ενώ προστέθηκαν αισθητηριακές διαταραχές καθώς και διαλείπουσα τύφλωση στο ένα μάτι. Τελικά η ασθενής πέθανε 38 χρόνια αργότερα σε ηλικία 54 ετών.

Η επόμενη γνωστή καταγραφή της ΣΚΠ χρονολογείται τον 19^ο αιώνα και η διάγνωσή της έγινε αναδρομικά. Τα στοιχεία τα αντλούμε από το ημερολόγιο του ίδιου του ασθενή, του Sir Augustus d' Este, ο οποίος κατέγραψε την εικοσιεξάχρονη πορεία της νόσου του. Τα συμπτώματα που κατέγραψε ήταν αταξία, μούδιασμα από τη μέση και κάτω, σπασμούς στη διάρκεια της νύχτας, μείωση της όρασης, αστάθεια βαδίσματος και γενικευμένη μυϊκή αδυναμία. Στον Jean-Martin Charcot (διάσημος νευρολόγος του δεύτερου μισού του 19^{ου} αιώνα) έχει αποδοθεί η πρώτη σαφής περιγραφή των κλινικών εκδηλώσεων της ΣΚΠ, η συσχέτιση κλινικής συμπτωματολογίας με τις παθολογο-ανατομικές αλλοιώσεις και η οριστική διαφοροποίησή της από την τρομώδη παράλυση. Ο Charcot υποστήριξε ότι η ΣΚΠ χαρακτηρίζεται από σπαστική παραπληγία, αταξία, τρόμο κατά τις εκούσιες κινήσεις, διαταραχές του λόγου, οφθαλμολογικές ανωμαλίες και νυσταγμό. Με πρωτοπόρο τον Charcot λοιπόν η νόσος άρχισε να αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο. Έτσι ο νευρολόγος Joseph Francois Felix Babinski μετά τη διδακτορική του διατριβή με θέμα, «Μελέτη ανατομική και κλινική πάνω στη σκλήρυνση κατά πλάκας» παρουσίασε το 1896 την εργασία του πάνω στο φαινόμενο των δακτύλων του ποδιού, στο οποίο αργότερα δόθηκε το όνομά του και είναι γνωστό ως «αντανεκλαστικό Babinski».

Από την εποχή των Charcot και Babinski μέχρι σήμερα η Κλινική Νευρολογία ήκμασε και έκανε σημαντικά βήματα προόδου. Μπορεί η αιτιολογία της ΣΚΠ να παραμένει άγνωστη, ωστόσο με την καταλυτική συμβολή της Παθολογικής

Ανατομίας, έχει διαλευκανθεί πλήρως η κλινική εικόνα της νόσου, που είναι καθοριστικής σημασίας για τη διάγνωση [3].

1.1.2 Η σημασία της μυελίνης των νεύρων

Μυελίνη είναι η λευκή λιπαρή ουσία που περιβάλλει και μονώνει τα νεύρα μας, επιτρέποντάς τους να μεταβιβάζουν σήματα μεταξύ του εγκεφάλου και του υπόλοιπου σώματος. Αποτελείται από ένα στρώμα πρωτεΐνης μεταξύ δύο στρωμάτων λιπιδίων.

Η μυελίνη παράγεται από εξειδικευμένα κύτταρα. Από τα κύτταρα Schwann, και τα ολιγοδενδροκύτταρα που σχηματίζουν τα έλυτρα της μυελίνης που περιβάλλουν τους νευράξονες [5, 6]. Ένα ολιγοδενδροκύτταρο μπορεί να περιβάλλει πολλούς νευράξονες σε διαφορετικές κατευθύνσεις. Διαδοχικά έλυτρα από πολλά ολιγοδενδρο-κύτταρα εξασφαλίζουν τη συνεχή κάλυψη των νευραξόνων από μυελίνη. Το μυελινικό έλυτρο ευοδώνει την ταχύτερη και αποτελεσματικότερη μετάδοση του δυναμικού ενέργειας.

Στις 11 απομυελινωτικές παθήσεις και κατ' επέκταση στη ΣΚΠ (που είναι η κύρια απομυελινωτική νόσος), η μυελίνη καταστρέφεται με επακόλουθη λειτουργική έκπτωση. Έτσι τα μηνύματα που ξεκινούν από τον εγκέφαλο, για να κινηθούν για παράδειγμα ένα μέλος του σώματος δε μεταδίδονται σωστά, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται προβλήματα κινητικότητας. Το ίδιο συμβαίνει και αντίστροφα, με τα μηνύματα δηλαδή που έχουν σχέση με την αίσθηση και μεταφέρονται από ένα μέρος του σώματος προς τον εγκέφαλο [2].

1.1.3 Αιτιολογία-Παθογένεση της ΣΚΠ

Η αιτιολογία της νόσου μέχρι και σήμερα παραμένει άγνωστη. Η νόσος, γενικά, τοποθετείται μεταξύ των νόσων αυτοανοσολογικής προέλευσης με πιθανό ουσιαστικό ρόλο τη λοίμωξη από βραδέως δρώντες ιούς. Υπάρχουν δύο βασικές θεωρίες στην παθογένεια.

Η πρώτη βασίζεται στις λοιμώξεις από ιούς με μεγάλο χρόνο επώασης και με εμφάνιση συμπτωμάτων, πιθανώς κάτω από επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων. Η άλλη θεωρία βασίζεται σε ανωμαλία στην ανοσολογική ρύθμιση με

υπερβολική ανοσολογική απάντηση σε μια λοίμωξη, σε ιό ή σε ανεπαρκή αναστολή της ανοσοαντίδρασης στη λοίμωξη. Η πρώτη θεωρία δεν αποκλείει τη δεύτερη. Πιθανώς γενετικά και ανοσολογικά προδιατεθειμένα άτομα αντιδρούν σε ιογενή λοίμωξη (σε αντιγόνα ιογενή ή προερχόμενα έμμεσα από το ΚΝΣ) με ανώμαλη κυτταρική ή και χυμική ανοσία. Αργότερα, ο ίδιος ιός ή και ένας μη ειδικός περιβαλλοντικός παράγοντας (πυρετός, στρες, διαιτητικός παράγοντας) μπορεί να κινητοποιεί μια αυτοανοσιακή προσβολή στη μυελίνη, που εκδηλώνεται με την εμφάνιση των συμπτωμάτων της νόσου ^[7]. Η ανοσοαντίδραση αυτή αφορά τα Τ-λεμφοκύτταρα που επιτίθενται στα νευρικά κύτταρα, απογυμνώνοντάς τα από την μυελίνη.

Η τελευταία όπως είναι γνωστό ανιχνεύεται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) των αρρώστων με πολλαπλή σκλήρυνση, ιδιαίτερα σε περιόδους εξάρσεων και ενεργού εξέλιξης της νόσου. Ακόμα στον ορό και στο ΕΝΥ των ασθενών βρέθηκαν αντισώματα έναντι της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης. Η έρευνα ωστόσο για την αιτιολογία και παθογένεια της νόσου βρίσκεται σε εξέλιξη.

1.1.4 Ιστοπαθολογικά ευρήματα

Ιστοπαθολογικά, η νόσος χαρακτηρίζεται από πολλές και διακριτές βλάβες ^[8].

Η παθολογική ανωμαλία στη ΣΚΠ εντοπίζεται σε μια περιοχή μέσα στην οποία, οι ίνες της μυελίνης του νευρικού κυττάρου έχουν καταστραφεί, με σχετική προφύλαξη των αξόνων. Στα μετέπειτα στάδια επέρχεται γλοίωση και ουλή και το τραύμα αναφέρεται σαν πλάκα. Θεωρείται ότι μπορεί να είναι μια διαταραχή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η περιοχή που συχνά περιλαμβάνεται είναι η περικοιλιακή λευκή ουσία στα ημισφαίρια ^[9].

1.1.5 Κλινική εικόνα (Συμπτώματα)

Οι κλινικές αποκαλύψεις θα εξαρτηθούν από την ανατομική πλευρά που επηρεάζεται από απομυελινωποίηση. Ωστόσο τα συμπτώματα είναι συχνότερα σε ορισμένες περιοχές όπως τα οπτικά νεύρα, το εγκεφαλικό στέλεχος, την παρεγκεφαλίδα και το νωτιαίο μυελό (στην τελευταία περίπτωση με ιδιαίτερη

προσβολή των πυραμιδικών και αισθητικών δερματίων). Συμπτώματα από κρανιακούς πυρήνες και από βασικά γάγγλια είναι σπάνια.

Τα συνηθέστερα συμπτώματα της ΣΚΠ είναι:

- Οπτική νευρίτιδα, μια παροδική διαταραχή του οπτικού νεύρου, η οποία προκαλεί θολή όραση ή τύφλωση βραχείας διάρκειας ^[8]. Χαρακτηρίζεται, από μειωμένη οπτική οξύτητα, υπεραιμία, οίδημα οπτικής θηλής, ελαττωματική αντίδραση στο φως και διαταραχές των οπτικών πεδίων (διπλωπία). Θεωρείται η πλέον συχνή εκδήλωση, εμφανίζεται σε ποσοστό μέχρι και 25% των ασθενών και είναι ο πιο κλασικός τρόπος έναρξης της νόσου ^[3].
- Αιμωδίες, μυρμηγκιάσματα στα δάχτυλα των χεριών και των ποδιών.
- Παραισθητικά άλγη συνοδευόμενα από αίσθημα θερμού ή ψυχρού.
- Ίλιγγος.
- Ελάττωση της αίσθησης της αφής ^[10]
- Διαταραχή στους μηχανισμούς συνέργειας, μειωμένη ικανότητα συνδυασμένης δράσης δυο ή περισσότερων οργάνων.
- Διαταραχές ισορροπίας.
- Αδυναμία των μυών.
- Τρόμος τελικού σκοπού.
- Σπαστικότητα, αύξηση των τενόντιων αντανεκλαστικών ή και των δυο ^[11]
- Αταξικό βάδισμα.

Άλλες διαταραχές μπορεί να περιλαμβάνουν:

- Αμφοτερόπλευρη διαπυρηνική οφθαλμοπληγία που συνοδεύεται από νυσταγμό
- Σημείο του Lhermitte (αίσθημα ηλεκτροπληξίας που ακτινοβολεί προς τα άκρα κατά την κάμψη του αυχένα)
- Αιφνίδια αδυναμία ή αναπηρία.
- Δυσκοιλιότητα
- Διαταραχή στην κύστη.
- Δυσφαγία/Δυσκαταποσία
- Δυσarthρία ή σκοντάπτουσα ομιλία.
- Εξάλειψη των κοιλιακών αντανεκλαστικών.
- Ελάττωση της αίσθησης των δονήσεων.
- Ελάττωση της αίσθησης της θέσης.

Τα διάφορα συμπτώματα που προαναφέρθηκαν μπορούν να εμφανίζονται συνδυαστικά, οπότε η κλινική εικόνα συμπληρώνεται αμέσως ή μεμονωμένα αποτελώντας ξεχωριστές προσβολές που μπορεί να ερμηνευθούν ως έναρξη οποιασδήποτε πάθησης.

Συνήθως η διάρκεια των συμπτωμάτων περιορίζεται σε μερικές ημέρες ή εβδομάδες και στη συνέχεια υποχωρούν εν μέρει ή πλήρως ^[10]

1.1.6 Πορεία της νόσου-Υποτροπές

Ποικιλομορφία χαρακτηρίζει όχι μόνο τα συμπτώματα της ΣΚΠ αλλά και την πορεία της νόσου ^[8]. Έτσι με βάση την πορεία της νόσου και την κλινική εμφάνισή της, ταξινομείται σε πέντε μορφές:

1. Η ΣΚΠ με εξάρσεις/υφέσεις (**RRMS: relapsing/remitting**) χαρακτηρίζεται από σαφώς καθορισμένες υποτροπές, με πλήρη ή ατελή αποκατάσταση. Η νόσος στο διάστημα των υποτροπών δεν εξελίσσεται. Σχεδόν στα 2/3 των ασθενών γίνεται διάγνωση αυτής της μορφής της ΣΚΠ, αλλά οι περισσότεροι θα αναπτύξουν στη συνέχεια δευτεροπαθή προϊούσα μορφή.
2. Η δευτεροπαθή προϊούσα (**SPMS: secondary progressive**) ΣΚΠ χαρακτηρίζεται από εξέλιξη με ή χωρίς υποτροπές, ελάσσονες υφέσεις ή περιόδους σταθερότητας.
3. Η πρωτοπαθή προϊούσα (**PPMS: primary progressive**) ΣΚΠ είναι συνηθέστερη στους άνδρες και σε όσους εμφάνισαν όψιμα τη νόσο. Χαρακτηρίζεται από εξέλιξη, με παροδικές περιόδους σταθερότητας ή ύφεσης.
4. Η προϊούσα με εξάρσεις (**PRMS: progressive relapsing**) ΣΚΠ που διακρίνεται από την πρωτοπαθή προϊούσα λόγω της εμφάνισης σαφών υποτροπών.
5. Η χρόνια προϊούσα (**CPMS: chronic progressive**) ΣΚΠ, που χαρακτηρίζεται από μια πορεία συνεχούς έκπτωσης με διακριτά στάδια επιδείνωσης.
6. Η φάση **CIS (clinically isolated syndrome)** είναι ένα πρώτο νευρολογικό επεισόδιο ενός ατόμου, που προκαλείται από φλεγμονή ή απομυελίνωση του νευρικού ιστού.

1.1.7 Εργαστηριακά ευρήματα: (εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ηλεκτροφυσικές εξετάσεις ελέγχου του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού)

Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει παθογνωμονικό εργαστηριακό εύρημα η διάγνωση της νόσου μπορεί να ενισχυθεί και με την ανεύρεση εργαστηριακών ενδείξεων, βλαβών του ΚΝΣ, με συνδυασμένες εργαστηριακές ενδείξεις ανοσολογικής δυσλειτουργίας.

Οι εξετάσεις που πραγματοποιούνται είναι οι εξής:

1.Οσφυονωτιαία παρακέντηση με την οποία λαμβάνεται ΕΝΥ για τον έμμεσο προσδιορισμό βιοχημικών διαταραχών του εξωκυττάριου υγρού του ΚΝΣ. Έτσι λοιπόν κυρίως σε περιόδου εξάρσεων στο ΕΝΥ παρατηρείται:

- Αύξηση της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (MBP: Myelin Basic Protein).
- Αυξημένος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, τα οποία φθάνουν μερικές φορές τα 30-50εκατομμύρια/mm³
- Αύξηση των ολικών πρωτεϊνών.
- Επίσης ιδιαίτερα αυξημένη είναι η IgG4 σφαιρίνη και αντιπροσωπεύει ποσοστό άνω του 25% των ολικών πρωτεϊνών του ΕΝΥ στο 50% και πλέον των περιπτώσεων.
- Παρουσία ξεχωριστών (ολιγοκλωνικών) ζωνών στην περιοχή της Γ-σφαιρίνης με ηλεκτροφόρηση αυτής σε αгарόζη ή πολυακρυλαμίδα, στο 90% των ασθενών.

2. Ηλεκτροφυσιολογικές εξετάσεις:

- Προκλητά δυναμικά τα οποία αποτελούν τις μέσες ηλεκτροεγκεφαλογραφικές αντιδράσεις σε μια σειρά από οπτικά, ακουστικά ή σωματοαισθητικά ερεθίσματα. Ανωμαλίες παρατηρούνται στο 70-80% των ασθενών.

Πιο αναλυτικά η μέθοδος των οπτικών προκλητών δυναμικών (VER:Visual Evoked Responses), ανιχνεύει με μεγάλη ευαισθησία τις μεταβολές της αγωγής από το οπτικό νεύρο ακόμα και ασθενών χωρίς συμπτώματα και χρησιμεύει κυρίως στη διάγνωση της ΣΚΠ στα αρχικά στάδια. Συγκεκριμένα ο χρόνος έκλυσης σχετίζεται με την ταχύτητα αγωγής του ερεθίσματος στο

οπτικό νεύρο και στις κεντρικές οπτικές οδούς. Με τη μέθοδο των ακουστικών προκλητών δυναμικών (BAER: Brain Stem Auditory Evoked Responses), διαπιστώνονται και συχνά εντοπίζονται διαταραχές του ακουστικού νεύρου και των ακουστικών οδών του εγκεφαλικού στελέχους.

Τέλος με τα σωματοαισθητικά προκλητά δυναμικά (SER: Somatosensory Evoked Responses), υπολογίζεται η ταχύτητα αγωγής, η οποία θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει τους χρόνους μεταβίβασης του ερεθίσματος στις αισθητικές οδούς, από μεγάλες αισθητικές ίνες των περιφερικών νεύρων ως τα νευρικά πλέγματα, το νωτιαίο μυελό και τον εγκέφαλο.

- Ηλεκτροεγκεφαλογράφημα με το οποίο καταγράφονται οι διαφορές δυναμικού, οι οποίες παρουσιάζονται στην εξωτερική δερματική επιφάνεια του ανθρώπινου κρανίου ως αποτέλεσμα της λειτουργίας του εγκεφάλου. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιείται μια ουσιαστική απεικόνιση-αντανάκλαση της εγκεφαλικής δραστηριότητας που θέλουμε να μελετήσουμε.

Ηλεκτροεγκεφαλογραφικές διαταραχές διαπιστώνονται στο 35% των ασθενών με ΣΚΠ.

- Ηλεκτρονυσταγμογραφία η οποία συμβάλλει στη μελέτη της διαπυρηνικής οφθαλμοπληγίας.

3. Απεικονιστικές εξετάσεις έλεγχου του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού:

- Αξονική τομογραφία εγκεφάλου (CT), η οποία μπορεί να παρουσιάζει αραιωτικές περιοχές ή κατά το οξύ στάδιο περιοχές που σκιαγραφούνται εντονότερα μετά από ενδοφλέβια έγχυση ιωδιούχου ακτινογραφικής ουσίας.

Αυτές οι περιοχές

απομυελίνωσης παρατηρούνται χαρακτηριστικά στις περικοιλιακές ζώνες του εγκεφάλου και ιδιαίτερα γύρω από τις πλάγιες κοιλίες.

- Μαγνητική τομογραφία (MRI), η οποία είναι σημαντικά πιο ευαίσθητη από την αξονική, διότι αποκαλύπτει την παρουσία πλακών ενισχυμένου συντονισμού στην περικοιλιακή περιοχή, οι οποίες

αποτελούν ισχυρές ενδείξεις για ΣΚΠ. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι περικοιλιακές περιοχές αυξημένου συντονισμού των οποίων η σημασία είναι άγνωστη παρατηρούνται και σε πολλά ηλικιωμένα άτομα.

1.1.8 Διάγνωση

Η διάγνωση βασίζεται στην έναρξη της νόσου στη νεαρή ηλικία, στο χαρακτηριστικό ιστορικό των εξάρσεων και υφέσεων, στην πολυεστιακή σημειολογία και στις εργαστηριακές εξετάσεις που προαναφέρθηκαν.

Τα συμπτώματα, τα σημεία και η πορεία όμως της ΣΚΠ ποικίλουν τόσο πολύ, ώστε να υπάρχει σημαντική πιθανότητα λανθασμένης διάγνωσης. Οι εργαστηριακές εξετάσεις είναι ικανές να υποστηρίξουν την κλινική διάγνωση της ασθένειας, αλλά καμία δεν είναι ειδική για τη ΣΚΠ ούτε κάποια από αυτές αποβαίνει θετική σε όλους τους ασθενείς. Αν και η ευαισθησία της MRI κυμαίνεται από 90-100%, η ειδικότητά της είναι σαφώς χαμηλότερη και ίση με 57-80%. Οι παραπάνω λόγοι υπαγορεύουν την αναγκαιότητα ενός συνόλου διαγνωστικών κριτηρίων.

Το 1954 από τους Allison & Millar περιγράφηκαν τρεις κατηγορίες:

1. πιθανή διάσπαρτη σκλήρυνση, όπου οι ασθενείς εμφάνιζαν συμπτώματα της νόσου, χωρίς όμως κάποια φυσική αναπηρία
2. πρώιμη, πιθανή και λανθάνουσα σκλήρυνση και
3. πιθανή (probable) διάσπαρτη σκλήρυνση, όπου οι ασθενείς στο σύνολό τους εμφάνιζαν κάποιου είδους φυσική αναπηρία.

Η κατάταξη ενός ασθενούς σε μια από τις παραπάνω κατηγορίες εξαρτόταν από την εμπειρία του κλινικού γιατρού να ερμηνεύσει ένα ιστορικό συμπτωμάτων, όπως παροδικές παραισθησίες, αιμωδίες, διπλωπία και συχνουρία, ως σχετιζόμενο με ΣΚΠ. Επιπλέον, δε δινόταν κατευθυντήρια οδηγία στο ερώτημα πόσες εξάρσεις και υφέσεις έπρεπε να είχαν συμβεί ^[8].

Το 1965 αναπτύχθηκαν τα διαγνωστικά κριτήρια των Schumacher et al. Τα έξι κριτήρια που πρότειναν στόχευαν μόνο στην ομαδοποίηση βέβαιων περιστατικών. Συμφώνησαν ότι οι ασθενείς με βέβαιη ΣΚΠ πρέπει όχι μόνο να αναφέρουν συμπτώματα, αλλά και να αποδεικνύουν αντικειμενικά την προσβολή του ΚΝΣ καθώς και να εμφανίζουν τα πρώτα συμπτώματα μεταξύ 10ου και του 50ου έτους της ηλικίας τους. Το 1983 οι Poser et al προτείνουν νέα κριτήρια ταξινόμησης της ΣΚΠ. Με τα κριτήρια αυτά ορίζεται σαφώς τι συνιστά μια προσβολή, όπως και ο ερυθρός των προσβολών που απαιτείται για την ταξινόμηση, αλλά η αντικειμενική επιβεβαίωσή τους δεν είναι απαραίτητη. Οι παρακλητικές δοκιμές που

πραγματοποιούνται όπως ουρολογική εξέταση, οπτικά προκλητά δυναμικά και απεικονιστικές εξετάσεις, καταδεικνύουν μια βλάβη, η οποία δεν έχει δώσει ακόμα σημειολογία και μπορεί να μην έχει προκαλέσει ούτε συμπτώματα ^[2].

Τέλος, το 2001 εισήχθησαν νέα διαγνωστικά κριτήρια, τα κριτήρια των Mc Donald et al, σύμφωνα με τα οποία ενσωματώνεται η αξιολόγηση της μαγνητικής τομογραφίας με τις κλινικές και παρακλινικές μελέτες ^[11]. Το πλεονέκτημα αυτών των κριτηρίων είναι το γεγονός, ότι μπορεί να οριστικοποιηθεί η διάγνωση της ΣΚΠ και μετά από μια μονοσυμπτωματική κλινική υποτροπή, είτε μετά από μια προοδευτική επιδείνωση. Το διαγνωστικό αυτό σχέδιο ταξινόμησης και τα κριτήρια της MRI είναι όμως αρκετά πολύπλοκα.

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η διάγνωση είναι ως επί το πλείστον κλινική. Βασίζεται στο «ζύγισμα» των παραγόντων που επιβεβαιώνουν τη διάγνωση ενάντια στους παράγοντες που δεν καταφέρνουν να την επιβεβαιώσουν ή σε αυτούς που στοχεύουν στην πιθανότητα μιας εναλλακτικής διάγνωσης.

Η ασφαλής διάγνωση περιλαμβάνει το συνδυασμό του ιστορικού, της αντικειμενικής νευρολογικής εξέτασης και των εργαστηριακών εξετάσεων. Ωστόσο, δε λείπουν οι διαγνωστικές δυσκολίες. Σύγχυση θα μπορούσε να προκληθεί και με άλλες παθήσεις, όπως αυχενική μυελοπάθεια, τη δυσπλασία και την εγκεφαλομυελίτιδα

1.1.9 Φαρμακευτική αγωγή

Είναι γεγονός ότι μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αιτιολογική αντιμετώπιση της ΣΚΠ, όπως και ασφαλής τρόπος αναστολής της πορείας της. Ουσιαστικά, η θεραπευτική παρέμβαση στοχεύει στην αναστολή της εξέλιξης της νόσου, την άμεση αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της, καθώς και τη μείωση του κινδύνου της σοβαρής αναπηρίας.

Η θεραπευτική αγωγή των ασθενών με ΣΚΠ αρχίζει συνήθως κατά τη διάρκεια της οξείας υποτροπής. Διάφορες μελέτες έχουν βρει ότι η αγωγή με κορτικοστεροειδή μπορεί να μειώσει τόσο την εξέλιξη της υποτροπής, όσο και να βελτιώσει τη μακροπρόθεσμη έκβαση της ασθένειας. Μια τυπική θεραπευτική αγωγή με κορτικοστεροειδή, περιλαμβάνει είτε ενδοφλέβια χορήγηση είτε χορήγηση από το στόμα για αρκετές εβδομάδες μεθυλπρεδνιζολόνης (συνθετικό

γλυκοκορτικοειδές)^[11]. Επιπρόσθετα, είναι διαθέσιμες την τελευταία δεκαετία τεσσάρων ειδών θεραπείες «πρώτης γραμμής», με τη μορφή ενέσιμου διαλύματος:

- η ιντερφερόνη (INF) b-1a, η οποία χορηγείται ενδομυϊκά μια φορά την εβδομάδα, με την εμπορική ονομασία AVONEX
- η ιντερφερόνη (INF) b-1a, η οποία χορηγείται υποδόρια τρεις φορές την εβδομάδα, με την εμπορική ονομασία REBIF
- η ιντερφερόνη (INF) b-1b, η οποία χορηγείται υποδόρια κάθε δεύτερη ημέρα, με την εμπορική ονομασία BETAFERON
- και τέλος το οξικό άλας glatiramer, το οποίο χορηγείται υποδόρια κάθε ημέρα, με την εμπορική ονομασία COPRAXONE ^[13].

Τα φάρμακα ιντερφερόνης είναι ανασυνδυασμένα προϊόντα με ακολουθία ίδια ή σχεδόν ίδια με την ανθρώπινη ιντερφερόνη b-1 ^[12], ενώ το οξικό άλας glatiramer είναι ένα σύνολο μιας σύνθεσης πολυπεπτιδίων, με αλληλουχία όμοια με αυτή των βασικών πρωτεϊνών της μυελίνης ^[14]. Προκαταρκτικές εκθέσεις από μελέτες δείχνουν ότι το BETAFERON και το REBIF μειώνουν το καθένα το βραχυπρόθεσμο ποσοστό των κλινικών υποτροπών καλύτερα από το AVONEX ^[15]. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι τρέχουσες φαρμακευτικές αγωγές είναι προληπτικές και όχι θεραπευτικές. Έχουν μια ωφέλιμη επίδραση στο ρυθμό των υποτροπών και στη δράση της ασθένειας, όπως αυτή απεικονίζεται στη MRI, ενώ ο ασθενής εξακολουθεί να έχει την κλινική ένδειξη της ασθένειας, μετρούμενη από τις κλινικές υποτροπές, την πρόοδο της ανικανότητας ή από νέες βλάβες στον εγκέφαλο.

Αξίζει να σημειωθεί, πως η χρήση της ιντερφερόνης επιφέρει μια σειρά ανεπιθύμητων παρενεργειών με κυριότερα τα συμπτώματα τύπου γρίπης, αντιδράσεις στα σημεία των ενέσεων, αυξημένα επίπεδα ηπατικών ενζύμων, παθολογικός αριθμός λευκοκυττάρων, κατάθλιψη κλπ.

Τέλος, η Mitoxantrone, είναι ένα φάρμακο χημειοθεραπείας με αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα στην προοδευτική ΣΚΠ. Είναι εντούτοις, ένα αρκετά τοξικό φάρμακο, με αποτέλεσμα αυτό το γεγονός να το καθιστά φάρμακο περιορισμένης χρήσης. Η περίπτωση τοξικότητας συμπεριλαμβάνει και την καρδιακή τοξικότητα και για το λόγο αυτό η χρήση της περιορίζεται σε δυο χρόνια ^[16]. Από τα όσα προαναφέρθηκαν γίνεται αντιληπτό ότι οι πρόσφατες πρόοδοι στην κατανόηση

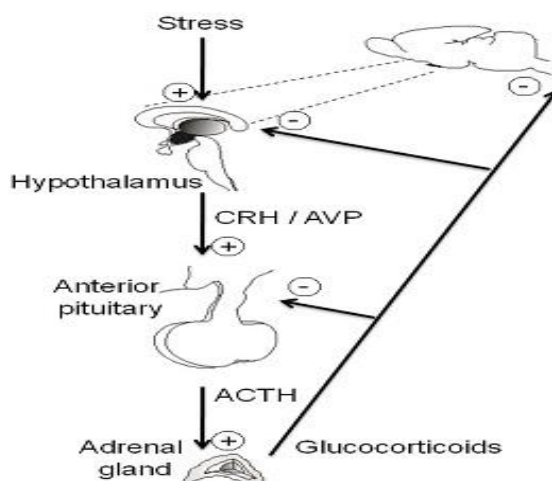
της διάγνωσης, της απεικόνισης, της παθολογίας και του κλινικού ελέγχου της ΣΚΠ έχουν αυξήσει σημαντικά την επιτυχημένη μεταχείριση αυτής της τόσο περίπλοκης νευρολογικής νόσου.

1.2 ΓΕΝΙΚΑ-ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ

1.2.1 Βιοσύνθεση των γλυκοκορτικοειδών στα επινεφρίδια

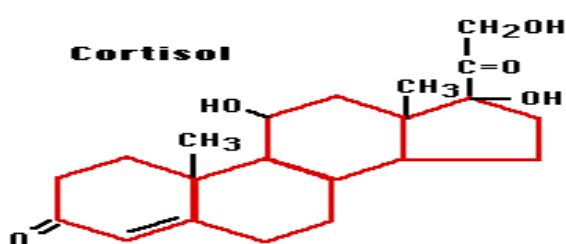
Οι γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες ανακαλύφθηκαν και ονομάστηκαν γλυκοκορτικοειδή στα 1930, κορτικοειδή γιατί παράγονται στο φλοιό των επινεφριδίων και γλυκο όταν βρέθηκε ότι αυτές οι ουσίες διεγείρουν την ηπατική και νεφρική γλυκονεογένεση ^[17]. Τα αλατοκορτικοειδή αντίθετα, που μαζί με τα γλυκοκορτικοειδή είναι γνωστά ως κορτικοστεροειδείς ορμόνες, προσδιορίστηκαν ως ορμόνες που ρυθμίζουν την μονοκατευθυνόμενη trans-επιθηλιακή μεταφορά νατρίου. Τα ενδογενή γλυκοκορτικοειδή συντίθενται και εκκρίνονται κάτω από τον έλεγχο του άξονα HPA ο οποίος διεγείρεται από τη δράση διαφόρων παραγόντων (π.χ στρες). Η διέγερση του υποθαλάμου οδηγεί στην απελευθέρωση της ορμόνης κορτικοτροπίνη (CRH) και προ-Η αργινίνη-βαζοπρεσίνη (AVP). Η φλοιοκορτικοτρόπος ορμόνη ACTH εκκρίνεται από την πρόσθια υπόφυση κάτω από τον έλεγχο της CRH/AVP για να επιδράσει στη στηλιδωτή και δικτυωτή ζώνη του επινεφριδιακού φλοιού και να διεγείρει την έκκριση της κορτιζόλης

(Εικόνα 1.2.1).



Εικόνα 1.2.1: Η διαδικασία έκκρισης της κορτιζόλης ^[18]

Η απελευθέρωση της ACTH επάγει την σύνθεση των γλυκοκορτικοειδών μέσα στη δικτυωτή ζώνη (zona fasciculata) του φλοιού των επινεφριδίων. Τα γλυκοκορτικοειδή αυτορυθμίζουν την εκκρίσή τους μέσω της αρνητικής ανάδρασης που εξασκούν στον CRH και στην ACTH στον υποθάλαμο και υπόφυση αντίστοιχα. Στους ανθρώπους το κατεξοχήν γλυκοκορτικοειδές είναι η κορτιζόλη η οποία παράγεται στη στηλιδωτή και τη δικτυωτή ζώνη του επινεφριδιακού φλοιού, τελικό προϊόν της βιοσυνθετικής οδού που λαμβάνει χώρα στα επινεφρίδια. (Εικόνα 1.2.2).



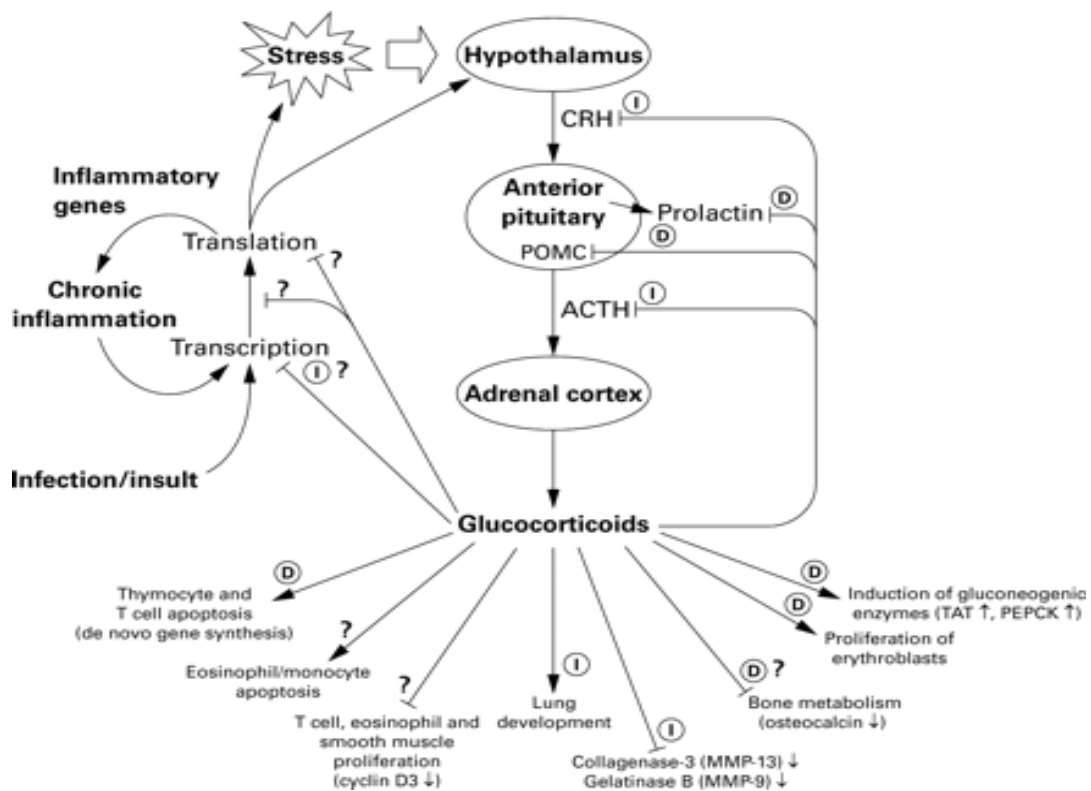
Εικόνα 1.2.2: Η χημική διάταξη της κορτιζόλης, το πιο βασικό γλυκοκορτικοειδές ^[19]

1.2.2 Βιολογικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών

Σήμερα, είναι γνωστό ότι, τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) μεσολαβούν πληθώρα αποκρίσεων συμπεριλαμβανομένων του ρόλου τους στην ανάπτυξη ^[20], στη διατήρηση της πίεσης του αίματος ^[21], στη ρύθμιση του στρες ^[22] και στις ανοσοαπαντήσεις ^[23]. Τα αλατοκορτικοειδή (αλδοστερόνη στον άνθρωπο), εκτός από την επιθηλιακή επιρροή τους στην μεταφορά νατρίου, έχουν και μη επιθηλιακές δράσεις ^[24].

Τα κορτικοστεροειδή είναι απαραίτητα στον οργανισμό των θηλαστικών για την ομοιόσταση καθώς ασκούν επιρροές σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια και συστήματα οργάνων. Επιπλέον, τα γλυκοκορτικοειδή εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων και την εναπόθεση του γλυκογόνου στο συκώτι, καθώς επίσης επηρεάζουν τον μεταβολισμό των πρωτεϊνών, το ισοζύγιο ύδατος και ηλεκτρολυτών, την επαναρρόφηση οστών, την καρδιαγγειακή λειτουργία και την λειτουργία των νεφρών (Εικόνα 1.2.3).

Εκτός από τις μεταβολικές δράσεις, έχουν περιγραφεί ακόμα επιρροές των γλυκοκορτικοειδών σε σχέση με τη συμπεριφορά και τη λειτουργία του εγκεφάλου καθώς και τη διατήρηση του υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακού άξονα. Επίσης, εμπλέκονται στις μακροπρόθεσμες προσαρμοστικές αλλαγές όπως η διαμόρφωση και η ρύθμιση διάφορων φυσιολογικών διαδικασιών συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Η υπερπαραγωγή των γλυκοκορτικοειδών συνδέεται γενικά με σημαντική διαταραχή της κυτταρικής λειτουργίας [25].



Εικόνα 1.2.3 : Δράσεις γλυκοκορτικοειδών [26]

Επιπλέον, τα GCs επηρεάζουν την ανάπτυξη των οργάνων, την ωρίμανση των ιστών, την επούλωση των πληγών, και την επαναρρόφηση του ασβεστίου. Ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος των GCs στη δυναμική διαμόρφωση των φλεγμονωδών και άνοσων απαντήσεων. Αυτό περιλαμβάνει τη διασταυρούμενη συνομιλία με τους μεταγραφικούς παράγοντες και τα μονοπάτια σηματοδότησης, τις επιδράσεις στην έκφραση του υποδοχέα των κυτοκινών, τη ρύθμιση της επιβίωσης

θυμοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, της επιλογής, και των λειτουργιών, καθώς επίσης και τη συμβολή στην ηωσινοποίηση ή ερυθροποίηση ^[27]. Εάν εξισορροπούνται βέλτιστα, οι GC-εξαρτώμενες λειτουργίες συμβάλλουν στην αντιμετώπιση μιας μόλυνσης, την επούλωση ενός τραύματος, ή άλλων σχετικών ανοσολογικών στρεσογόνων παραγόντων. Ωστόσο, η διάσπαση ή η δυσλειτουργία των δυναμικών αυτών αλληλεπιδράσεων μπορεί να οδηγήσει σε μια μοιραία έκβαση της οξείας φλεγμονής ή μπορεί να προδιαθέσει για αυτοάνοσες ή έκτοπες αντιδράσεις ^[27].

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η ευεργετική, αντιφλεγμονώδης δυνατότητα του GR ανήκει πρώτιστα στη δυνατότητά του να ρυθμίζει αρνητικά τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες ^[27, 28].

Οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των γλυκοκορτικοειδών χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της αρθρίτιδας, ρευματικής ενδοκαρδίτιδας, αλλεργιών καθώς και για τη θεραπεία της ανεπάρκειας των επινεφριδίων. Ωστόσο, υπάρχουν πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες από την θεραπεία με τα γλυκοκορτικοειδή (π.χ οστά) ^[29,30].

1.3. ΑΞΟΝΑΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΣ-ΥΠΟΦΥΣΗ-ΕΠΙΝΕΦΡΙΔΙΑ ΚΑΙ Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ

Ο άξονας ΥΥΕ αντιπροσωπεύει την αδιάρρηκτη λειτουργική σχέση μεταξύ του υποθαλάμου, του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης και του φλοιού των επινεφριδίων, η οποία χαρακτηρίζεται τόσο από διαδοχική ενεργοποίηση, κάθετα, κατά μήκος του άξονα, όσο και από οδούς παλίνδρομης ρύθμισης, που διασφαλίζουν τη φυσιολογική απάντηση ανάλογα με το ερέθισμα. Ενδεχόμενη δυσλειτουργία σε οποιοδήποτε από τα επίπεδα του άξονα μπορεί να οδηγήσει είτε σε υπερβολική είτε σε ανεπαρκή ενεργοποίηση, με αποτέλεσμα παθολογικές καταστάσεις που σχετίζονται άμεσα με την υποκείμενη διαταραχή της έκκρισης των αντίστοιχων ορμονών.

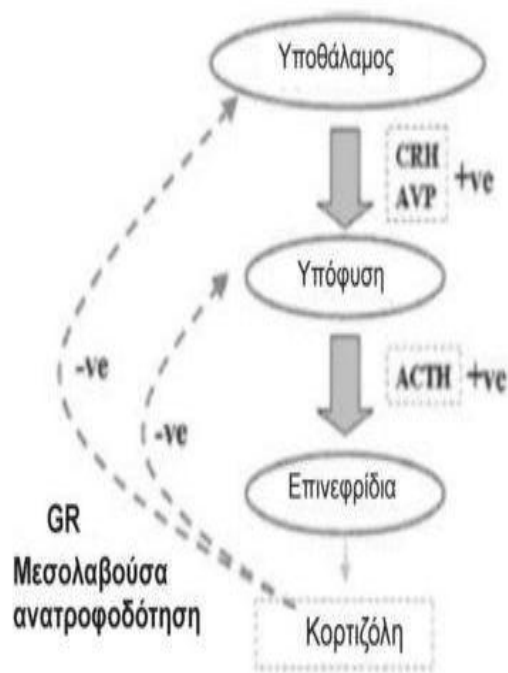
Ο υποθάλαμος είναι το πρώτο επίπεδο του ΥΥΕ άξονα, καθώς εκκρίνει την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH), η οποία στη συνέχεια ρυθμίζει την έκκριση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH) από την αδenoϋπόφυση. Η CRH συντίθεται κυρίως από τους μικροκυτταρικούς (parvocellular) νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα (paraventricular nucleus, PVN) του υποθαλάμου και στη

συνέχεια εκκρίνεται στον υποθάλαμο - υποφυσιακό πυλαίο σύστημα, μέσω του οποίου καταλήγει στα κορτικοτρόφα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Η έκκριση της CRH υπόκειται σε έναν εξαιρετικά σύνθετο και ακριβή ρυθμιστικό έλεγχο, που περιλαμβάνει αφενός παλίνδρομη καταστολή από τα γλυκοκορτικοειδή και την ίδια τη CRH (καταλυτική για τον τερματισμό της ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα) και αφετέρου παράλληλα κυκλώματα στενής αλληλορύθμισης με άλλες ορμόνες, νευροπεπτίδια και νευροδιαβιβαστές, που δρουν είτε διεγερτικά είτε κατασταλτικά στον παρακοιλιακό πυρήνα ^[31]. Το αρχικό σήμα της ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα μεταβιβάζεται από το κεντρικό νευρικό σύστημα στη συστηματική κυκλοφορία διά της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH). Η ACTH συντίθεται σαν τμήμα του πρόδρομου πρωτεϊνικού μορίου της προοπιμελανοτροπίνης ή POMC στα κορτικοτρόφα βασεόφιλα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης και η έκκρισή της καθορίζεται κυρίως από την επίδραση της CRH. Στην υπόφυση του ανθρώπου η POMC διασπάται ενζυμικά σε προ-Η αργινίνη-βαζοπρεσίνη (AVP) η οποία είναι ο δεύτερος ισχυρότερος διεγέρτης της έκκρισης της ACTH. Η επίδρασή της δεν θεωρείται αυτόνομη, αλλά κυρίως συνεργιστική στη δράση της ^[32]. Τέλος, στην καταστολή της έκκρισης της ACTH καθοριστική είναι η παλίνδρομη κατασταλτική επίδραση που ασκούν τα γλυκοκορτικοειδή των επινεφριδίων και η ίδια η ACTH στα κορτικοτρόφα κύτταρα, επιδράσεις που σηματοδοτούν τον τερματισμό της ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα και προστατεύουν τον οργανισμό από ενδεχόμενη υπερλειτουργία του **(Εικόνα 1.3.1)**.

Η ACTH που εισέρχεται στη συστηματική κυκλοφορία έχει ως κύριο ιστό-στόχο τον φλοιό των επινεφριδίων, όπου διεγείρει την παραγωγή της κορτιζόλης και των επινεφριδιακών ανδρογόνων από τη στηλιδωτή (zona reticularis) και τη δικτυωτή ζώνη (zona fasciculata) αντίστοιχα.

Οι δράσεις της κορτιζόλης, του τελικού προϊόντος του άξονα HPA, μεσολαβούνται από δύο εξειδικευμένες ενδοκυττάρειες υποκατηγορίες υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών: τον τύπο I υποδοχέα υψηλής-συγγένειας (ή MR) και τον τύπο II υποδοχέα χαμηλής-συγγένειας (ή GR) ^[33]. Ο υποθάλαμος ασκεί τον έλεγχο μέσω του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, ο οποίος κατευθύνει την απελευθέρωση των στεροειδών ορμονών από τον φλοιό των επινεφριδίων, ενώ

18



Εικόνα 1.3.2: Σχηματικό διάγραμμα του υποθαλαμικού-υποφυσιακού-επινεφριδίου (HPA) άξονα που περιγράφει τη ρύθμιση και την αρνητική ανατροφοδότηση της κορτιζόλης μέσω των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών. ACTH, φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη (κορτικοτροπίνη), AVP, αργινίνη βαζοπρεσίνη, CRH, ορμόνη απελευθερώσεως κορτικοτροπίνης, GR, υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών, -ve, αρνητική ανατροφοδότηση, +ve, θετική ανατροφοδότηση ^[38]

Οι δράσεις των γλυκοκορτικοειδών στην έκκριση ACTH μπορούν να είναι άμεσες ή έμμεσες, μέσω ταχέων (εντός λεπτών) ή επιβραδυνόμενων (>2h) μηχανισμών ^[39]. Εκτός όμως από τα εξωγενή ρυθμιστικά δεδομένα στον HPA άξονα, υπάρχει επίσης ένας κρίσιμος εσωτερικός αυτορυθμιστικός μηχανισμός. Έτσι, η ενδογενής κορτιζόλη, κατά την διάρκεια της δέσμευσης στους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών στους ιστούς του άξονα HPA και τον ιππόκαμπο, ενεργεί ως ένας ισχυρός αρνητικός ρυθμιστής της δραστηριότητας του HPA. Τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν την αρνητική παλίνδρομη ρύθμισή τους σε όλα τα επίπεδα σχεδόν του άξονα HPA ^[40] και μέσω του τύπου I (MR) και μέσω του τύπου II (GR) υποδοχέων. Κάθε υποδοχέας μπορεί να μεσολαβήσει τις διαφορετικές πλευρές της ρύθμισης ανατροφοδότησης. Ωστόσο, οι υψηλής-συγγένειας MRs ελέγχουν χαμηλά, βασικά επίπεδα κορτιζόλης που βρίσκεται στην κυκλοφορία, ενώ οι χαμηλότερης-συγγένειας GRs δρουν κατά τη διάρκεια των

κίρκαδικών και στρες-σχετιζόμενων αιχμών στην κορτιζόλη ^[41]. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια κάποιων αλλαγών στη λειτουργία του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών μπορεί να μετατοπιστεί το ομοιοπολικό «σημείο κατεύθυνσης» συμβάλλοντας έτσι στην αλλαγή του ημερήσιου αριθμού στα επίπεδα της κορτιζόλης που βρίσκονται στην κυκλοφορία στα υγιή άτομα ^[33]. Επομένως, ο άξονας HPA χρησιμεύει ως ένας αγγελιοφόρος από τον εγκέφαλο στο υπόλοιπο του σώματος και είναι ένα πολύπλευρο ρυθμιστικό σύστημα που ενσωματώνει νευρωνική και ενδοκρινή λειτουργία, και μπορεί να οριστεί ως ένα σύστημα που περιλαμβάνει τους ιστούς του υποθαλάμου, την υπόφυση και το φλοιό των επινεφριδίων, καθώς και τους απελευθερωτικούς παράγοντες (CRH) και τις ορμόνες (ACTH) που βρίσκονται εκεί (**Εικόνα 1.3.2**).

1.4. ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ ΚΑΤΑ ΠΛΑΚΑΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ

Η ΣΚΠ περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1868 από τον Γάλλο νευρολόγο Jean Martin Charcot ο οποίος παρατήρησε συσσώρευση των φλεγμονωδών κυττάρων στο ΚΝΣ σε ασθενείς που πάσχουν από περιοδικά επεισόδια νευρολογικής δυσλειτουργίας ^[42,43]. Το 1933, ο Thomas Rivers έδειξε ότι συμπτώματα παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με ΣΚΠ θα μπορούσαν να προκληθούν από την επανειλημμένη έγχυση του εγκεφάλου κουνελιού που είναι ομοιογενής σε πρωτεύοντα χωρίς την ανάγκη μολυσματικών παραγόντων ^[42, 44]. Αυτό σηματοδοτεί την έναρξη της μακράς ιστορίας της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλο-μυελίτιδας (EAE-experimental autoimmune encephalomyelitis), το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ζωικό μοντέλο της ΣΚΠ το οποίο αντανακλά πολλά χαρακτηριστικά της ανθρώπινης ασθένειας.

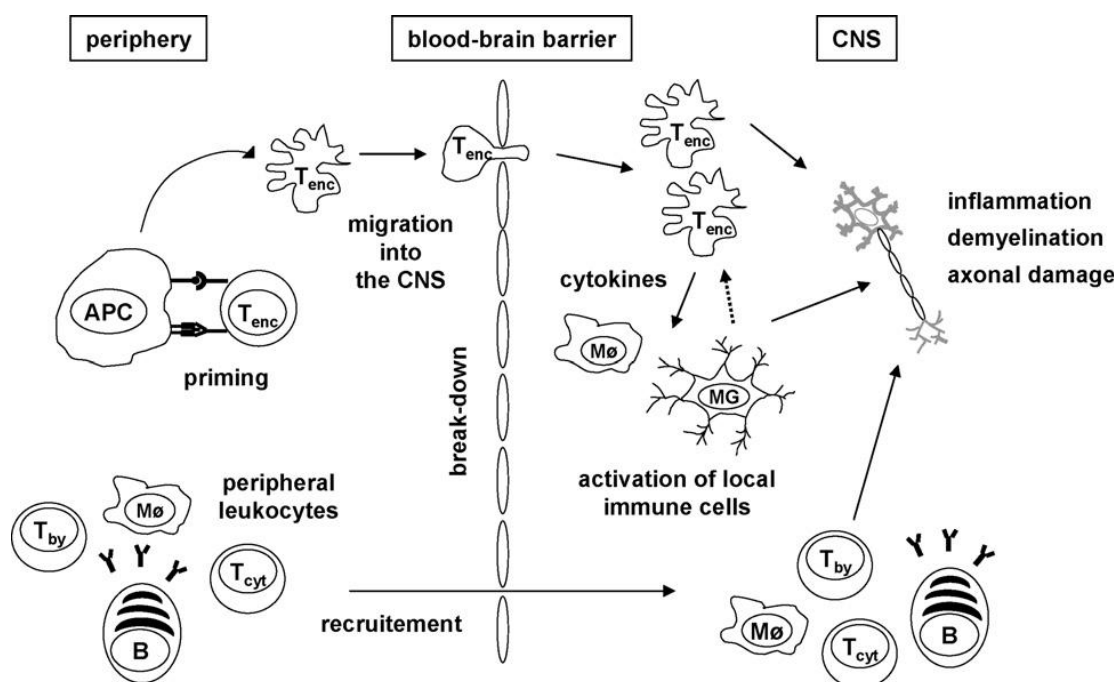
Τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης και στη φλεγμονή στην ΣΚΠ.

1.4.1 Ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στη φλεγμονή στην ΣΚΠ

Η ΣΚΠ είναι μια νευροφλεγμονώδης διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την διήθηση των παθογόνων Τ κυττάρων εντός του ΚΝΣ που αντιδρούν με αντιγόνα

μυελίνης. Αν και η τοποθεσία όπου τα εγκεφαλιτογόνα κύτταρα αρχικά ακμάζουν παραμένει ασαφής, είναι γνωστό ότι διασχίζουν το φράγμα αίματος-εγκεφάλου (BBB) ύστερα από επανενεργοποίηση ^[42, 45] (**Εικόνα 1.4.1**). Με τη σειρά τους, τα κύτταρα τελεστές απελευθερώνουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες οδηγώντας στην ενεργοποίηση της μικρογλοίας και άλλων τοπικών ανοσολογικών κυττάρων. Στη συνέχεια, πρόσθετα αυτοδραστικά T κύτταρα, μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα και B κύτταρα προσκολούνται στο ΚΝΣ συνοδευόμενα από την παραγωγή αντισωμάτων και κατάθεσης συμπληρώματος (complement deposition) ^[42, 46]. Αυτό οδηγεί στην καταστροφή του φύλλου μυελίνης, ολιγοδενδρογλοιακή βλάβη και απώλεια νευραξόνων ^[42, 47]. Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα η ΣΚΠ και η ΕΑΕ πιστευόταν ότι ήταν καθαρά διαμεσολα-βούμενες TH1 αυτοάνοσες διαταραχές. Ωστόσο, τα Th17 κύτταρα^[48] και τα CD8 +T κύτταρα ^[42, 49] έχουν κερδίσει πρόσφατα την προσοχή και επίσης φαίνεται να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των νευροφλεγμονωδών νόσων.

Η πλειοψηφία των ασθενών που πάσχουν από ΣΚΠ υποφέρουν από μια υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα μορφή της νόσου, η οποία χαρακτηρίζεται από επιθέσεις της νευρολογικής δυσλειτουργίας που ακολουθείται από μία βαθμιαία βελτίωση. Μετά από 10 ή περισσότερα έτη περισσότεροι από αυτούς τους ασθενείς αναπτύσσουν δευτερογενή προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας όπου δεν παρατηρούνται πλέον φάσεις ηρεμίας. Αντίθετα, ποσοστό έως 15% του συνόλου των ασθενών εμφανίζουν πρωτογενή προοδευτική σκλήρυνση κατά πλάκας που εκδηλώνεται με μια συνεχή επιδείνωση της νόσου χωρίς ύφεση. Αν και δεν υπάρχει διαθέσιμη θεραπεία για τη δεύτερη μορφή, η υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα σκλήρυνση κατά πλάκας αντιμετωπίζεται συχνά με Ιντερφερόνη-β και Οξικό Γλατιραμέρη (Glatiramer Acetate) ^[42, 50]. Επιπλέον, νέα φάρμακα, όπως το Tysabri ή FTY720 έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικά για τη βελτίωση της νόσου σε κλινικές δοκιμές ^[42, 51]. Ενώ η χρήση των GCs έχει μικρή επίδραση στην μακροπρόθεσμη πρόγνωση της ΣΚΠ, η θεραπεία με μεγάλη δόση παραμένει η τυπική αγωγή για τις οξείες υποτροπές και την οπτική νευρίτιδα. Ωστόσο, παρά την αξιέπραστη αποτελεσματικότητα τους τα γλυκοκορτικοειδή έχουν παρενέργειες που ακόμα δεν μπορούν να παρακαμφθούν.



Εικόνα 1.4.1: Τα εγκεφαλιτογονικά T κύτταρα (T_{enc}) αρχίζουν από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) που ακολουθούνται από τη μετανάστευση εντός του ΚΝΣ. Η απελευθέρωση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών οδηγεί στην ενεργοποίηση των μακροφάγων (Mφ) και μικρογλοιακών κυττάρων (MG). Περιφερειακά λευκοκύτταρα όπως τα μακροφάγα, B κύτταρα, CD8 + T κυττάρων (T_{cyt}) και CD4 + T κύτταρα (T_{bystander}) προσλαμβάνονται στο ΚΝΣ. Σε συνδυασμό, αυτό οδηγεί σε φλεγμονή, απομυελίνωση και αξονική βλάβη ^[42]

1.4.2 Η επαγωγή της απόπτωσης από γλυκοκορτικοειδή στην ΣΚΠ

Το φαινόμενο ότι τα GC επάγουν την απόπτωση των T κυττάρων έχει αναγνωριστεί σχεδόν πριν από 30 χρόνια, αλλά ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμη πλήρως κατανοηθεί ^[42, 52].

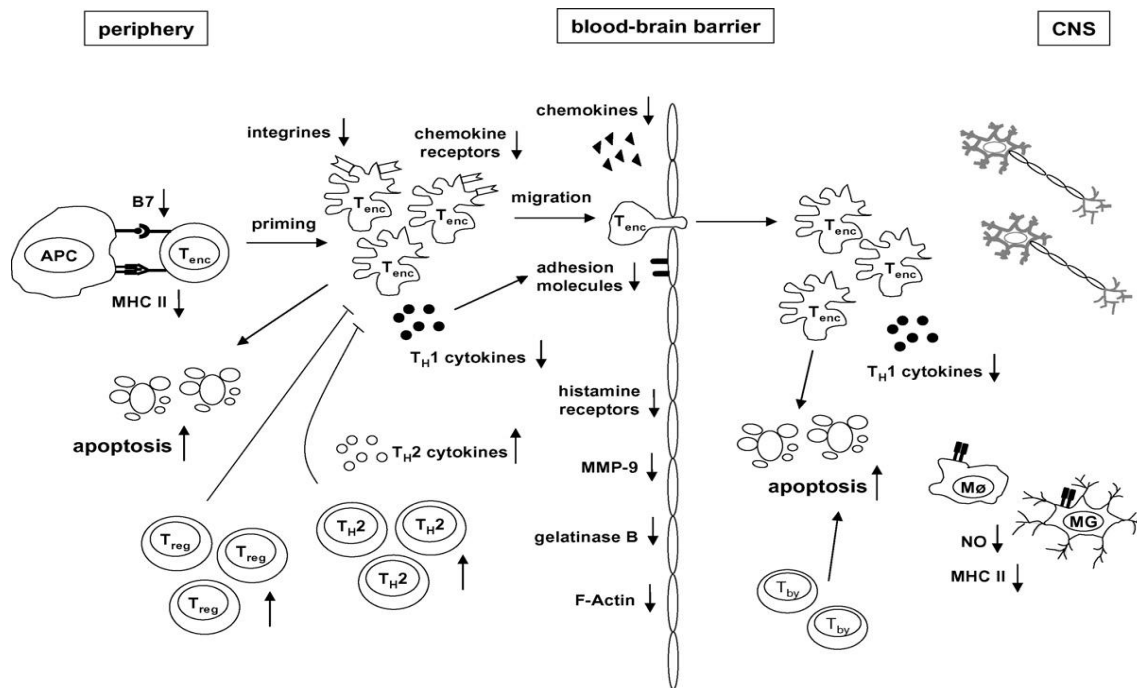
Γεγονότα μεταγωγής σήματος που ξεκινούν στα T κύτταρα μετά από έκθεση στα GCs περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση των διαφόρων κασπασών, την απελευθέρωση της καθεψίνης B από τα λυσοσώματα, αυξημένα επίπεδα H₂O₂, την παραγωγή των κεραμιδίων, μεταβαλλόμενα επίπεδα Na⁺ / K⁺, την αλληλεπίδραση με κινάσες και πολλά άλλα ^[42, 53].

Η επαγωγή του T κυτταρικού θανάτου στο ΚΝΣ παρατηρείται ευρέως σε EAE μοντέλα και σε ασθενείς με ΣΚΠ (**Εικόνα 1.4.2**). Στη φάση διαγραφής της MBP (myelin basic protein)-EAE σε αρουραίους Lewis, αυτοδραστικά T λεμφοκύτταρα στον νωτιαίο μυελό υφίστανται μαζική απόπτωση ^[42, 54]. Προφανώς, οι ενδογενείς

GCs απελευθερώνονται ως συνέπεια της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών κατά τη διάρκεια της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (EAE) και οδηγούν στην επαγωγή του θανάτου των T κυττάρων (Pender et al., 1992). Επιπλέον, η θεραπεία με υψηλές δόσεις μεθυλπρεδνιζολόνης κατά την υιοθετούμενη μεταφορά εγκεφαλιτογόνων T-λεμφοκυττάρων (AT-EAE :adoptive transfer of encephalitogenic T cells) σε Lewis αρουραίους αυξάνει την απόπτωση των T κυττάρων με έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο ^[42, 55]. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν σε κλινικές μελέτες, αποδεικνύοντας την επαγωγή της απόπτωσης σε περιφερικά λευκοκύτταρα του αίματος μετά από θεραπεία με υψηλή δόση GC σε ασθενείς με ΣΚΠ ^[42, 56].

Σε γενικές γραμμές, φαίνεται ότι ο κατακερματισμός του DNA και η ευαισθησία στην απόπτωση μετά την θεραπεία με GC είναι πιο έντονη σε CD4 + T κύτταρα σε σύγκριση με τα CD8 +T κύτταρα λόγω των διαφορών στην έκφραση Bcl-2 ^[42, 57]. Έτσι, τόσο τα ενδογενή GCs όσο και αυτά που χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς λόγους, προκαλούν θάνατο στα T κύτταρα κατά τη διάρκεια της EAE και ΣΚΠ νόσου και συμβάλλουν στην βελτίωση της νόσου αλλά η θεραπευτική αποτελεσματικότητα για την θεραπεία της EAE και της ΣΚΠ παραμένει ακόμα συζητήσιμη. Επιπλέον, δεν είναι ακόμα γνωστό αν τα αυτοδραστικά και συμβατικά T κύτταρα επηρεάζονται διαφορετικά από τον GC-επαγόμενο κυτταρικό θάνατο ^[42, 58]. Έτσι, η χορήγηση των GCs οδηγεί στην επαγωγή της απόπτωσης των T κυττάρων και βελτιώνει EAE και ΣΚΠ.

Επιπλέον τα GCs αναστέλλουν την διακοπή του φράγματος αίματος-εγκεφάλου(BBB) με επακόλουθη μείωση των λευκοκυττάρων διείσδυσης στο ΚΝΣ ^[42, 59]. Άμεσες επιδράσεις των GCs στην BBB έχουν καταδειχθεί in vitro (**Εικόνα 1.4.2**).



Εικόνα 1.4.2: Οι επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών στην νευροφλεγμονή. Τα GCs επάγουν ή καταστέλλουν την έκφραση των εκκρινόμενων μορίων τελεστών και φέρνουν στην επιφάνεια υποδοχείς στα λευκοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα του BBB. Επιπλέον, τα GCs προκαλούν απόπτωση των T κυττάρων στα περιφερικά λεμφοειδή όργανα και στο ΚΝΣ. Treg = ρυθμιστικά T κύτταρα, TH2 = T βοηθητικά κύτταρα 2 [42, 60]

Μια άλλη δυνατότητα είναι η μείωση των επιπέδων ιντεγκρίνης στα T κύτταρα καθώς και των μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα (**Εικόνα. 1.4.2**). Ακολουθώντας τη θεραπεία της μεθυλπρεδνιζολόνης μία μελέτη περιέγραψε μειωμένες ποσότητες διαλυτού VCAM-1 και E-σελεκτίνη στον ορό ασθενών με ΣΚΠ. [42, 61]. Ομοίως, η ποσότητα των VLA-4 και LFA-1 στα λευκοκύτταρα αίματος βρέθηκε να μειώνεται [42, 62]. Η υψηλή δόση μεθυλπρεδνιζολόνης μείωσε επίσης την επαγόμενη έκφραση του ICAM-1 και VCAM-1 από τον TNF-α [42, 63]. Πρόσφατα, δείχθηκε ότι το ινωδογόνο καταβάλεται στις ΣΚΠ πλάκες (MS plaques) μετά από τη διακοπή φράγματος αίματος-εγκεφάλου (BBB). Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση μικρογλοίας μέσω MAC-1 και ως εκ τούτου συμβάλλει στην απομυελίνωση και στην υπερβολική EAE [42, 64]. Από τότε που τα GCs αποτρέπουν τη διατάραξη του BBB, το γεγονός αυτό θα πρέπει να μειώσει τη διαρροή ινωδογόνου εντός του ΚΝΣ και επομένως να συμβάλλει στην καλυτέρευση της ασθένειας.

Εν περιλήψει, οι μελέτες αυτές αποκάλυψαν την αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου, καθώς και εξωκυττάριας αναδιαμόρφωσης ως πιθανοί στόχοι των GCs στο πλαίσιο του BBB (**Εικόνα 1.4.2**).

Οι χημειοκίνες και οι υποδοχείς τους παίζουν σημαντικό ρόλο για την μετανάστευση των λευκοκυττάρων στη θέση της φλεγμονής. Ειδικότερα το OXOK-3 φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για την νευροφλεγμονή. Η πλειοψηφία των T κυττάρων σε ασθενείς με ΣΚΠ εκφράζουν το OXOK-3 εντός του διαμέρισματος CSF ^[42, 65] και σχεδόν όλα τα εγκεφαλιτογονικά T κύτταρα που απομονώνονται από αρουραίους Lewis χρωματίζονται θετικά για τον υποδοχέα των χημειοκινών ^[42, 66]. Η θεραπεία ασθενών με ΣΚΠ με υψηλή δόση μεθυλοπρεδνιζολόνης οδηγεί στη μείωση έκφρασης του OXOK-3 και CCR5 στα T κύτταρα περιφερικού αίματος ^[42, 67, 68]. Επιπλέον, ένα μειωμένο επίπεδο του CXCL10/IP-10, ο υποκαταστάτης της CXCR3, και ένα ανυψωμένο επίπεδο της CCL2 παρατηρήθηκε στο CSF ασθενών με ΣΚΠ μετά από θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή ^[42, 49]. Είναι αξιοσημείωτο ότι ο ρόλος των CCL2 στην ΣΚΠ είναι αμφιλεγόμενος, αν και φαίνεται ότι συνδέεται με την πόλωση των T κυττάρων προς έναν φαινότυπο TH2 ^[42, 49]. Τέλος, η παραγωγή της IL-8 από μονοκύτταρα, η οποία συμβάλλει στην διατάραξη του BBB με το να στρατολογεί λευκοκύτταρα στο ΚΝΣ, αυξάνεται στους ασθενείς με ΣΚΠ μετά τη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή ^[42, 70]. Εκτός από τις επιρροές στην απόπτωση και το BBB, τα GCs είναι γνωστά για μια ποικιλία γενικών ανοσοκατασταλτικών αποτελεσμάτων (**Εικόνα 1.4.2**).

Η GC θεραπεία μειώνει την παραγωγή και την απελευθέρωση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-1β και IL-12 ^[42, 71], το οποίο ομοίως παρατηρείται και σε ασθενείς με ΣΚΠ κατά τη διάρκεια θεραπείας με στεροειδή. Η μεθυλοπρεδνιζολόνη μειώνει την έκφραση του TNF-α και IFN-γ στο επίπεδο mRNA σε PBMCs που απομονώθηκαν από ασθενείς με ΣΚΠ ^[42, 72]. Αυτό παρατηρήθηκε επίσης σε καλλιιεργημένα PLP-ειδικά CD4 + T κύτταρα παρουσία της δεξαμεθαζόνης ^[42, 73].

Οι περισσότερες από τις προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες που ρυθμίζονται αρνητικά από τα GCs είναι οι TH1 κυτοκίνες οι οποίες είναι γνωστό ότι παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Σε αντίθεση, τα επίπεδα των TH2 κυτοκινών όπως η IL-10 και το TGF-β αυξάνονται πιθανότατα από τα GCs ^[42, 72, 73]. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα GCs

ευνοούν την διαφοροποίηση των T κυττάρων προς την Th2 σειρά και έτσι οδηγούν σε ευαισθησία στην ΕΑΕ και στην ΣΚΠ (**Εικόνα 1.4.2**).

Εκτός από τον έλεγχο της συνθέσεως κυτοκίνης, τα GCs αναστέλλουν την παραγωγή NO από τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα τα κοκκιοκύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα [42, 74]. Οι NO εμπλέκονται στην καταστροφή των ολιγοδενδροκυττάρων από μικρογλοιακά κύτταρα, και αμφότερα η IFN-γ και το TNF-α είναι σε θέση να επάγουν την iNOS [42, 75, 76].

Ένας άλλος σημαντικός στόχος για την ανοσοκατασταλτική δραστηριότητα των GCs είναι η ενεργοποίηση των επιδρώντων T κυττάρων, μια διαδικασία που απαιτεί την έκφραση του MHC και των συνδιεγερτικών μορίων στα μυελοειδή κύτταρα.

Η επίδραση των GCs στα ρυθμιστικά T κύτταρα (Treg) αναγνωρίστηκε πρόσφατα. Η επίδραση δεξαμεθαζόνης σε ποντικούς αυξάνει τον σχετικό αριθμό των CD4 + CD25 + Treg κυττάρων, τα οποία είναι πιο ανθεκτικά στη GC-επαγόμενη απόπτωση λόγω της υψηλότερης έκφρασης του Bcl-2. Μετά τη θεραπεία με δεξαμεθαζόνη τα Treg κύτταρα εκφράζουν αυξημένα επίπεδα του CTLA-4, το οποίο μπορεί να ενισχύσει την κατασταλτική τους ικανότητα [78]. Παρόμοιες παρατηρήσεις έγιναν σε ανθρώπους, όπου το ποσοστό των Treg κυττάρων σε ασθενείς με ΣΚΠ αυξήθηκε μετά από βραχυπρόθεσμη θεραπεία με GC [42, 77]. Επιπλέον, η ταυτόχρονη χορήγηση της δεξαμεθαζόνης και της IL-2 ήταν πιο επιτυχής στην θεραπευτική αγωγή της ΕΑΕ σε σύγκριση με την δεξαμεθαζόνη μόνη της και συσχετίστηκε με την επέκταση των Treg κυττάρων in vivo [42, 78]. Έτσι, οι επιδράσεις στα Treg κύτταρα πιθανώς συμβάλλουν στην θεραπευτική αποτελεσματικότητα των GCs.

Συμπερασματικά, τα GCs ασκούν ανοσοκατασταλτικές δραστηριότητες ενεργώντας και στα T και στα μυελοειδή κύτταρα, π.χ. μακροφάγα και μικρογλοία. Αυτό οδηγεί σε μία καταστολή των TH1 και μια επαγωγή των TH2 κυτοκινών, καταστολή της παραγωγής NO, εξασθενημένη T κυτταρική ενεργοποίηση και σε έναν μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων Treg. Σε συνδυασμό, αυτές οι επιδράσεις μπορεί να συμβάλλουν σημαντικά για καλύτερα κλινικά αποτελέσματα των GCs στην θεραπεία νευροφλεγμονωδών ασθενειών όπως η ΣΚΠ.

1.5 Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

1.5.1 Γενικά-Πυρηνικοί Υποδοχείς

Τα γλυκοκορτικοειδή επιτυγχάνουν τις πολλαπλές επιρροές τους με την ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Ο GR ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (NR), οι οποίοι είναι μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούν την μεταγραφή των γονιδίων στόχων τους σε απάντηση σε ειδικούς υποκαταστάσεις ^[79]. Σήμερα περιγράφονται περισσότεροι από 60 διαφορετικοί πυρηνικοί υποδοχείς, μεταξύ των οποίων υποδοχείς για τις γνωστές πυρηνικές ορμόνες και ένας απέραντος αριθμός των αποκαλούμενων ορφανών υποδοχέων. Οι NRs μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες ^[80]. Σύμφωνα με την επιτροπή ονοματολογίας πυρηνικών υποδοχέων (1999), οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών (SHR) και οι παρόμοιοι υποδοχείς των SHR διαμορφώνουν την υπεροικογένεια 3 πυρηνικού υποδοχέα (NR3). Η NR3 περιλαμβάνει δύο υποδοχείς για τα οιστρογόνα (ERα και ERβ ή NR3A1 και NR3A2 αντίστοιχα), δύο οιστρογόνο-σχετικούς ορφανούς υποδοχείς (ERRα/ERR1 και ERRβ/ ERR2, ή NR3B1 και NR3B2 αντίστοιχα) και από έναν υποδοχέα για τις άλλες σημαντικές κατηγορίες στοροειδών ορμονών: τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR ή NR3C1), τον υποδοχέα των μεταλλοκορτικοειδών (MR ή NR3C2), τον υποδοχέα της προγεστίνης (PR ή NR3C3), και τον υποδοχέα των ανδρογόνων (AR ή NR3C4).

Στα θηλαστικά οι γονάδες και τα επινεφρίδια παράγουν πέντε σημαντικές ομάδες στεροειδών ορμονών (SHs): οιστρογόνα, προγεστίνες, ανδρογόνα, γλυκοκορτικοειδή και μεταλλοκορτικοειδή. Όλες αυτές οι SHs ρυθμίζουν έναν μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διεργασιών στα κύτταρα-στόχους εξοπλισμένα με τους αντίστοιχους υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Στα τέλη της δεκαετίας του '50, ήταν δυνατό με τη χρησιμοποίηση ραδιενεργά σημειωμένων SHs να ακολουθηθεί η μοίρα των στεροειδών ορμονών από την περιοχή της σύνθεσής τους στους ενδοκρινείς αδένες, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, μέχρι τους ιστούς-στόχων τους ^[81]. Αν και οι SHs μεταβολίζονται εκτενώς, ιδιαίτερα στο συκώτι, θα μπορούσε ναδειχθεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η ίδια ορμόνη, όχι ένας

μεταβολίτης, παρήγαγε την απάντηση μέσω της ρύθμισης του μηχανισμού γονιδιακής έκφρασης. Η έννοια ότι οι στεροειδείς ορμόνες εμπλέκονται στον μεταγραφικό έλεγχο προκλήθηκε από την παρατήρηση ότι η στεροειδής ορμόνη των εντόμων, εκδυσόνη, προκαλεί διογκώσεις στα γιγαντιαία χρωμοσώματα ^[82]. Μερικά έτη αργότερα, καθιερώθηκε ένα μοντέλο δύο-σταδίων που περιέλαβε τη σύνδεση της ορμόνης στους ειδικούς υψηλής-συγγένειας SHs μέσα στα κύτταρα-στόχους, ακολουθούμενη από την ενεργοποίηση του συμπλόκου ορμόνης-υποδοχέα προκειμένου να προκληθεί η έκφραση των ορμονοανταποκρινόμενων γονιδίων ^[83]. Σχεδόν 20 έτη αργότερα οι υποδοχείς για τα γλυκοκορτικοειδή και τα οιστρογόνα κλωνοποιήθηκαν και έτσι έγιναν οι πρώτοι μοριακά-καθορισμένοι μεταγραφικοί παράγοντες για την RNA πολυμεράση II ^[84-86]. Περίπου τον ίδιο χρόνο κλωνοποιημένοι SHR στόχοι, π.χ. ανθρώπινο γονίδιο μεταλλο-θειονίνης και ογκογόνος ιός μαστικού αδένου ποντικού (MMTV) χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα DNA σύνδεσης και γονιδιακής μεταφοράς για να προσδιοριστούν τα πρώτα ορμονοανταποκρινόμενα στοιχεία (HREs) ^[87-90].

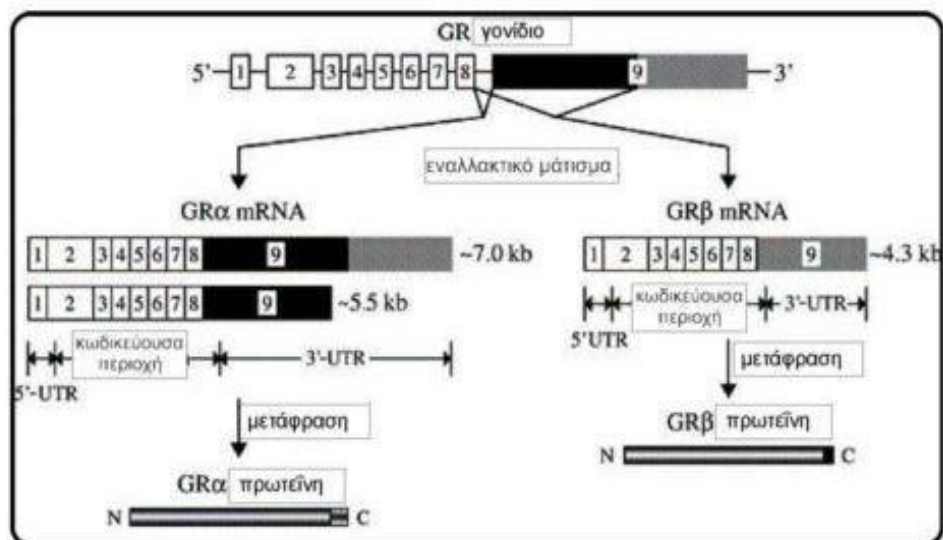
Όλοι οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες αποτελούμενες από ευδιάκριτες περιοχές, που αντιστοιχούν σε λειτουργικές περιοχές δομικών μονάδων. Η ονοματολογία των περιοχών A-F χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα για όλα τα μέλη του συνόλου της υπεροικογένειας πυρηνικών υποδοχέων ^[91-93]. Η περιοχή C, η DNA-δεσμευτική περιοχή (DBD), και η περιοχή E, η δεσμευτική περιοχή του προσδέματος (LBD), επιδεικνύουν έναν υψηλό βαθμό συντηρημένης ακολουθίας ενώ δεν ανιχνεύθηκε καμία σημαντική συντήρηση μεταξύ των SHRs για τις περιοχές A/B, D και F. Η DBD στοχεύει τον υποδοχέα στα HREs και η LBD απαιτείται για την αλλαγή των λειτουργιών των υποδοχέων ^[94]. Η περιοχή D θεωρείται ως μια εύκαμπτη περιοχή αρθρώσεων μεταξύ του DNA και των πρόσδεμα-δεσμευτικών περιοχών. Το ακριβές αμινοτελικό άκρο του είναι ένα αναπόσπαστο τμήμα της DNA-δεσμευτικής περιοχής και εμπλέκεται στο διμερισμό της. Η περιοχή F είναι απαραίτητη για τη δέσμευση ορμονών στον PR, GR και AR αλλά όχι στον ERα, και είναι επίσης σημαντική για τη διάκριση μεταξύ ορμονικών προσδεμάτων των αγωνιστών και ανταγωνιστών ^[95]. Επομένως, οι περιοχές A και B συνδυάζονται σε μια περιοχή A/B στις περισσότερες περιπτώσεις

και οι περιοχές C και E δεν είναι μόνο αρμόδιες για τη σύνδεση DNA και προσδέματος αντίστοιχα, αλλά κωδικοποιούν επίσης και άλλες λειτουργίες. Η ενδοκυτταρική κατανομή των στεροειδών υποδοχέων είναι αποτέλεσμα της πυρηνικής-κυτταροπλασματικής διάχυσης και της ATP-εξαρτώμενης κυτταροπλασματικής-πυρηνικής παλινδρομικής κίνησης ^[96]. Η πλειοψηφία του ER, του AR και του PR είναι στον πυρήνα που οφείλεται στην παρουσία των αποκαλούμενων σημάτων πυρηνικού εντοπισμού (NLSs), τα οποία θεωρείται ότι απαιτούνται για την αναγνώριση πυρηνικών πόρων. Ο αριθμός και η θέση των NLSs ποικίλλουν μεταξύ των SHRs αλλά συχνά ένα συστατικό NLSs βρίσκεται στα σύνορα των περιοχών C-D, ενώ ένα δεύτερο NLS στην LBD είναι πρόσδεμα εξαρτώμενο. Ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός είναι λιγότερο σαφής για τον GR και τον MR επειδή έχει αναφερθεί σε αυτές τις περιπτώσεις η ορμονο-προκληθείσα πυρηνική μετατόπιση. Όλοι οι SHRs χωρίς πρόσδεμα συνδέονται με ένα μεγάλο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο συνοδών, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 90 (Hsp90), το οποίο διατηρεί τον υποδοχέα σε μια ανενεργή κατάσταση αλλά τον κρατά καλά προετοιμασμένο για τη σύνδεση ορμονών ^[97]. Η περιοχή στα σύνορα της περιοχής C και D μαζί με την LBD απαιτούνται πάλι για να πραγματοποιηθεί μια αλληλεπίδραση SHR-Hsp90 ^[98].

1.5.2 Γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Το cDNA του hGR κλωνοποιήθηκε αρχικά το 1985 και αργότερα χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 5q31-32. Μέχρι σήμερα υπάρχει μόνο ένα γονίδιο για τον GR. Η εξέταση της γενωμικής δομής του υποδοχέα αποκάλυψε την παρουσία 9 εξωνίων καλύπτοντας μια περιοχή 110kb. Τα 184 νουκλεοτίδια του εξωνίου 1 αντιπροσωπεύουν αποκλειστικά την 5'-μη μεταφρασμένη περιοχή. Το εξώνιο 2 (1197bp) κωδικεύει το μεγαλύτερο μέρος του N-τελικού άκρου του υποδοχέα, συμπεριλαμβανομένης της συστατικής AF1 περιοχής trans-ενεργοποίησης (transactivation). Τα δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου που εμπλέκονται στην DNA-πρόσδεση κωδικεύονται χωριστά από το εξώνιο 3 (167 bp) και το εξώνιο 4 (117 bp).

Πέντε εξώνια (εξώνια 5, 6, 7, 8, 9α ή 9β) μαζί αποτελούν τη περιοχή δέσμευσης του προσδέματος και την πρόσδεμα-εξαρτώμενη περιοχή AF-2 καθώς επίσης και τις 3'-μη μεταφρασμένες περιοχές. Επιπλέον, η ανάλυση των υποκινητών του γονιδίου του GR αποκάλυψε μια προφανή έλλειψη ενός πλαισίου TATA και ένα μοτίβο CCAAT στην 5'-πλευρική περιοχή, ενώ έχουν προσδιοριστεί πολλαπλά GC πλαίσια, AP-1, AP-2, Sp1, cAMP-απαντητικά στοιχεία (CRE), Yin Yang1 (YY1), NF-κB και διάφορες ιστο-ειδικές περιοχές σύνδεσης μεταγραφικών παραγόντων, επιβεβαιώνοντας την αντίληψη ότι ο GR εκφράζεται σταθερά σε κάθε κυτταρικό τύπο αλλά με ένα ιστό-ειδικό πρότυπο ^[99] (**Εικόνα 1.5.1**).



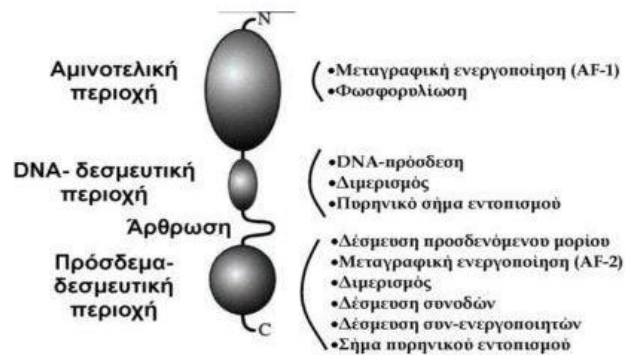
Εικόνα 1.5.1: Η έκφραση των ανθρώπινων GRα και GRβ. Στην κορυφή του σχήματος παρουσιάζεται η δομή του DNA από το ανθρώπινο γονίδιο του GR. Τα εξόνια παρουσιάζονται ως πλαίσια και είναι αριθμημένα από το 1 έως 9, ενώ τα ιντρόνια παρουσιάζονται ως γραμμές. Ένα προ-mRNA μεταγράφεται από αυτό το DNA και ματίζεται με δύο διαφορετικούς τρόπους. Στο αριστερό μέρος του σχήματος, το προεπιλεγμένο μονοπάτι ματίσματος περιλαμβάνει τα εξόνια 1 έως 8 και συνδέει το τέλος του εξονίου 8 με την αρχή του εξονίου 9, παράγοντας τα διαφορετικά μεγέθη των mRNAs του GRα που οφείλεται στην εναλλακτική πολυαδενυλίωση. Το προεπιλεγμένο μονοπάτι ματίσματος παράγει την πρωτεΐνη GRα. Στο δεξί μέρος του σχήματος παρουσιάζεται το εναλλακτικό μονοπάτι ματίσματος, το οποίο περιλαμβάνει τα εξόνια 1 έως 8 και συνδέει τα τέλη του εξονίου 8 με το κατάρρους εξόνιο 9: αυτή η μορφή του mRNA μεταφράζεται στην πρωτεΐνη GRβ ^[100]

1.5.3 Πρωτεΐνη του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Οι περισσότερες από τις λειτουργίες των γλυκοκορτικοειδών ορμονών διαμεσολαβούνται μέσω της αλληλεπίδρασης με τον κλασσικό μεταγραφικό παράγοντα, γνωστό ως υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Το γονίδιο γι' αυτόν τον υποδοχέα, που κλωνοποιήθηκε το 1985 ^[101], κωδικεύει μια πρωτεΐνη 777 αμινοξέων σε μήκος. Το πρότυπο έκφρασης του GR δείχνει ότι ο υποδοχέας είναι παντού διανεμημένος, αλλά είναι πιο επικρατής στο ηπατικό, στο νευρικό σύστημα, και τους μυϊκούς ιστούς. Ακόμα, και αν ο GR διανέμεται ευρέως, η κυτταρική ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή είναι πολυσύνθετη και εξαρτώμενη από πολλούς παράγοντες ^[102]. Στα μέσα τις δεκαετίας του '80, βιοχημικές μελέτες που χρησιμοποίησαν τα ακατέργαστα φυσικά πρωτεϊνικά παρασκευάσματα έδειξαν ότι ο υποδοχέας, όπως οι περισσότεροι NRs, ήταν οργανωμένος σε μονάδες και αποτελούνταν από τρεις περιοχές κατά προσέγγιση ^[103-105].

Η N-τελική περιοχή του GR (κατά προσέγγιση αμινοξέα 1-417) περιέχει την λειτουργία 1 ενεργοποίησης (AF-1), δραστηριότητα που διέπει έναν συστατικό μεταγραφικό ρόλο και είναι ο στόχος αλληλεπίδρασης με διάφορες πρωτεΐνες και κινάσες. Τα αμινοξέα 418-487 περιέχουν τη DNA προσδένουσα περιοχή (DBD) του GR (**Εικόνα 1.5.2**).

Η κρυσταλλογραφική ανάλυση αυτής της περιοχής έδειξε ότι αυτή η περιοχή αναδιπλώνεται σε μια διαμόρφωση τύπου δακτύλων ψευδαργύρου και δημιουργεί άμεση και συγκεκριμένη ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το DNA ^[106]. Επιπλέον, διαμορφώνεται ένα καλά καθορισμένο διμερές, δεδομένου ότι δύο DBD υπομονάδες δεσμεύουν την DNA έλικα σε παρακείμενες μείζοντες αύλακες. Μετά από μια σύντομη έκταση της ακολουθίας (κατά προσέγγιση αμινοξέα 488-520) γνωστή ως περιοχή "αρθρώσεων", το C-τελικό άκρο του GR (αμινοξέα 521-777) περιέχει μια αναδιπλωμένη μονάδα που διατηρεί την ικανότητα να δεσμεύει τα προσδενόμενα μόρια. Αυτή η περιοχή αναφέρεται ως περιοχή δεσμεύσεως του προσδενόμενου μορίου (LBD).

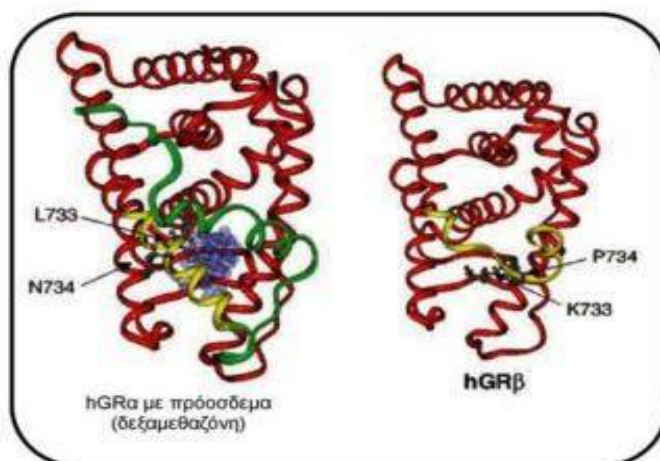


Εικόνα 1.5.2: Διαμορφωτική δομή του GRα. Ο GRα αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές. Η αμινο-τελική περιοχή περιέχει μια ουσιαστική λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης (AF-1) και όλες τις γνωστές θέσεις φωσφορύλιωσης αμινοξέων. Η κεντρική DNA-δεσμευτική περιοχή εμπλέκεται στην πρόσδεση σ'ένα ειδικό DNA-απαντητικό στοιχείο, το GRE, και περιέχει επίσης μια επιφάνεια διμερισμού και ένα πυρηνικό σήμα εντοπισμού. Η καρβοξυ-τελική πρόσδεμα-δεσμευτική περιοχή έχει πολλαπλές δραστηριότητες που περιλαμβάνουν μια πρόσδεμα-δεσμευτική δραστηριότητα, μια πρόσδεμα-εξαρτώμενη λειτουργία μεταγραφικής ενεργοποίησης (AF-2), και ένα πυρηνικό σήμα εντοπισμού. Επιπλέον, περιέχει τις επιφάνειες για το διμερισμό και τη σύνδεση των συν-ενεργοποιητών και των μοριακών συνοδών. Μια περιοχή άρθρωσης παρουσιάζεται μεταξύ της DNA-δεσμευτικής περιοχής και της πρόσδεμα-δεσμευτικής περιοχής^[100]

Εκτός από αυτά τα τρία σημαντικά μοτίβα, προσδιορίζονται τα πυρηνικά σήματα εντοπισμού εγκλειόμενα και στις δύο περιοχές DBD και LBD. Κάθε μια από αυτές τις περιοχές εκτελεί μια ξεχωριστή λειτουργία για να ρυθμίσει τη μεταγωγή σημάτων και τις μεταγραφικές δραστηριότητες του GR.

1.5.4 Ισομορφία α και β του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Η κλωνοποίηση του cDNA του hGR απέδειξε την ύπαρξη των δύο εναλλακτικών μεταγράφων ματίσματος, hGRα και hGRβ και οι λειτουργικές αναλύσεις έδειξαν τις διακρίσεις μεταξύ αυτών των δύο ισομορφών του υποδοχέα^[99]. Αναλυτικότερα, ένα εναλλακτικό μάτισμα έχει παρατηρηθεί στο εξόνιο 9, δίνοντας αρχή σε δύο mRNAs που κωδικεύουν τον hGRα (ανθρώπινο υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών α) και τον hGRβ (ισομορφή β του ανθρώπινου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών), αντίστοιχα (**Εικόνα 1.5.3**).



Εικόνα 1.5.3: Μοριακή διαμόρφωση. Τρισδιάστατα πρότυπα των hGRα και hGRβ. Οι κοινές έλικες κάθε προτύπου (υπολείμματα 525 έως 727) παρουσιάζονται με κόκκινο, η μη ομόλογη περιοχή από το αμινοξύ 728 μέχρι 742 είναι χρωματισμένη κίτρινη, και η H12 περιοχή (υπολείμματα 743 έως 777), παρόντα στον hGRα είναι χρωματισμένη με πράσινο. Το πρότυπο του hGRα παρουσιάζεται με το πρόσδεμα να καταλαμβάνει το δεσμευτικό θύλακα. Οι εικόνες παρουσιάζουν επίσης τους προσανατολισμούς της πλευρικής αλυσίδας των υπολειμμάτων 733 και 734 σε κάθε μόριο ^[107]

Το hGRα και hGRβ είναι ταυτόσημα μέχρι το εξόνιο 8 (κωδικεύοντας τα αμινοξέα 1-727) από τα οποία και μετά αποκλίνουν. Ο hGRα περιέχει το εξόνιο 9α με μέγεθος 2475 νουκλεοτιδίων, από τα οποία τα πρώτα 150 bp κωδικεύουν για 50 κατάλοιπα αμινοξέος. Χωρισμένος από μια σύντομη ακολουθία ιντρονίου 158 bp κατάρρους από το εξόνιο 9α, το εξόνιο 9β συνεχίζεται για άλλα 1478 νουκλεοτίδια, με τα πρώτα 45 να κωδικεύουν για 15 ευδιάκριτα κατάλοιπα του C-τελικού άκρου του hGRβ.

Ο hGRα δεσμεύει τα κορτικοστεροειδή, τους κλασσικούς αγωνιστές του υποδοχέα, ή τον ανταγωνιστή RU486, μετατοπίζεται στον πυρήνα κατά την ενεργοποίηση του προσδενόμενου μορίου, και ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων με έναν ορμονο-εξαρτώμενο τρόπο. Αντίθετα, ο hGRβ δεν αλληλεπιδρά με τα γλυκοκορτικοειδή και επιδεικνύει μεταγραφική αδράνεια στα γλυκοκορτικοειδή-απαντητικά γονίδια. Επιπλέον, όταν ο hGRβ επιμολύνθηκε παροδικά μαζί με τον hGRα, παρατηρήθηκε μια κυρίαρχη αρνητική επίδραση από τον hGRβ στις λειτουργικές δυνατότητες του hGRα και τον υποδοχέα των μεταλλοκορτικοειδών, οδηγώντας στην υπόθεση ότι η κυτταρική αναλογία του hGRα προς τον hGRβ

μπορεί να έχει μια βαθιά επιρροή στην ευαισθησία ενός κυττάρου στα γλυκοκορτικοειδή. Σήμερα αναγνωρίζεται, ότι η συμβολή του hGRβ στη γλυκοκορτικοειδή-αδράνεια πιθανότατα να περιορίζεται σε ορισμένες κυτταρικές σειρές ή ασθένειες. Τα ανυψωμένα επίπεδα του hGRβ έχουν συσχετιστεί θετικά με την αντίσταση των γλυκοκορτικοειδών σε διάφορες καταστάσεις ασθενειών όπως άσθμα, ρευματοειδή αρθρίτιδα και ελκωτική κολίτιδα. Ωστόσο, δεδομένου των χαμηλών επιπέδων του ενδογενούς hGRβ που ανιχνεύεται στις πολυάριθμες κυτταρικές σειρές και τους ιστούς των κυττάρων ^[108-110], διάφοροι ερευνητές έχουν υποστηρίξει ότι η ποσότητα του hGRβ μπορεί να μην είναι επαρκής για να αποτελέσει τη βάση της κυρίαρχης αρνητικής δραστηριότητάς του ^[111, 112]. Σ' αυτά τα στοιχεία συνηγορεί το γεγονός, ότι κανένας συσχετισμός δεν έχει βρεθεί μεταξύ των επιπέδων του hGRβ και της έλλειψης ευαισθησίας στα γλυκοκορτικοειδή που προκλήθηκε από τις κυτοκίνες ή της ανθεκτικής στα γλυκοκορτικοειδή λευχαιμίας παιδικής ηλικίας. Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι η σχετική έκφραση του hGRβ προς τον hGRα που ανιχνεύεται σε ένα μοναδικό στάδιο ή χρονικό σημείο στα κύτταρα ή τους ιστούς μπορεί να μην ανακλά την πραγματική εξέλιξη της γλυκοκορτικοειδούς-αντίστασης ή της αντίστοιχης μεταβολής στα πρωτεϊνικά επίπεδα αυτών των δύο ισομορφών ^[99]. Επιπλέον, έκθεση των κυττάρων σε παράγοντες όπως οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο TNF-α και IL-1, μικροβιακά υπεραντιγόνα και κορτιζόλη μπορεί να οδηγήσει στην επαγωγή του hGRβ, αλλά την καταστολή του hGRα, και έτσι σ' ένα προνομαϊκό ποσοστό του hGRβ ^[166]. Συνεπώς, η ενισχυμένη αναλογία του hGRβ προς τον hGRα μπορεί να οδηγήσει στη μειωμένη ανταπόκριση στα γλυκοκορτικοειδή ^[99].

Το RNA μάτισμα μπορεί επίσης να επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, όπως είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τα σχετικά στοιχεία τους στους υποκινητές των γονιδίων στόχων ή οι ορμόνες. Κατά συνέπεια, η προνομαϊκή παραγωγή από ένα μοναδικό μετάγραφο, hGRα ή hGRβ, εξαρτάται πιθανά από τα ιδιαίτερα κυτταρικά πλαίσια και τους παράγοντες στους οποίους εκτίθενται τα κύτταρα. Περαιτέρω μελέτες έχουν δείξει ότι ο hGRβ μπορεί να προσδεθεί στο GRE, ετεροδιμερίζεται με τον hGRα, και αλληλεπιδρά με την HSP90 ^[102, 113]. Η μοριακή βάση για την κυρίαρχη αρνητική επίδραση του hGRβ έχει εντοπιστεί σε δύο κρίσιμα κατάλοιπα, L733 και N734, μέσα στα μοναδικά 15 αμινοξέα του hGRβ ^[107], ενώ για τον μηχανισμό σύμφωνα με τον οποίο ο hGRβ

διαδραματίζει τους ανασταλτικούς ρόλους του, εικάζεται ο σχηματισμός ενός μεταγραφικά ανενεργού hGRβ και ετεροδιμερών hGRα^[99].

1.5.5 Άλλες ισομορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Εκτός από τον hGRα και τον hGRβ, οι Rivers και συνεργάτες έχουν ανιχνεύσει άλλη μια παραλλαγή ματίσματος τον hGRγ, ο οποίος εκφράζεται σε επίπεδα μεταξύ 4 και 8% των συνολικών μεταγράφων του GR^[114]. Ο hGRγ διαφέρει από τους άλλους κατά ένα αμινοξύ (αργινίνη), όπου η ένθεση μεταξύ των εξονίων 3 και 4 κωδικεύει τη DNA-προσδένουσα περιοχή. Σε μελέτες αναφέρεται, ότι αυτή η μοναδική εισαγωγή του υπολείμματος μειώνει το δυναμικό της trans-ενεργοποίησης του υποδοχέα σχεδόν στο μισό. Επιπλέον, δύο άλλες παραλλαγές ματίσματος έχουν προσδιοριστεί στα ανθρώπινα κύτταρα πολλαπλών μυελωμάτων από τους Moalli και συνεργάτες. Το hGRα δεν έχει τα εξόνια 8 και 9 και το hGRα-A στερείται τα εξόνια 5, 6 και 7. Και οι δύο παραλλαγές έχουν συνδεθεί με τους γλυκοκορτικοειδο-ανθεκτικούς φαινοτύπους. Κατά ενδιαφέροντα τρόπο, αν και ο μεταλλαγμένος hGR-P μόνος του επιδεικνύει χαμηλότερη δραστηριότητα trans-ενεργοποίησης από τον hGRα, η συνεπιμόλυνση και από τις δύο "δομές" προτείνει μια ενισχυμένη επίδραση του hGR-P επάνω στην πρόσδεμα-προκληθείσα hGRα δραστηριότητα. Συνολικά, διάφορα μετάγραφα έχουν περιγραφεί από το κοινό πρόδρομο RNA του hGR, συμπεριλαμβανομένων των hGRα, hGRβ, hGRγ, hGR-P και hGR-A. Σε σύγκριση με τον hGRα, τα περισσότερα από αυτά έχουν μειωμένες δυνατότητες trans-ενεργοποίησης και μέχρι σήμερα κανένα τους δεν αξιολογήθηκε για τη δυνατότητά τους να προκαλέσουν γρήγορες γλυκοκορτικοειδείς ή μη-γενωμικές δράσεις. Κατά συνέπεια, είναι λογικό να προβλεφθεί ότι τα σχετικά επίπεδα αυτών των παραλλαγών διαδραματίζουν έναν ρόλο, τουλάχιστον εν μέρει, στη διαφορική γλυκοκορτικοειδή-προκληθείσα ανταπόκριση, ιδιαίτερος καθώς αυτό σχετίζεται με την ανθρώπινη ασθένεια^[99].

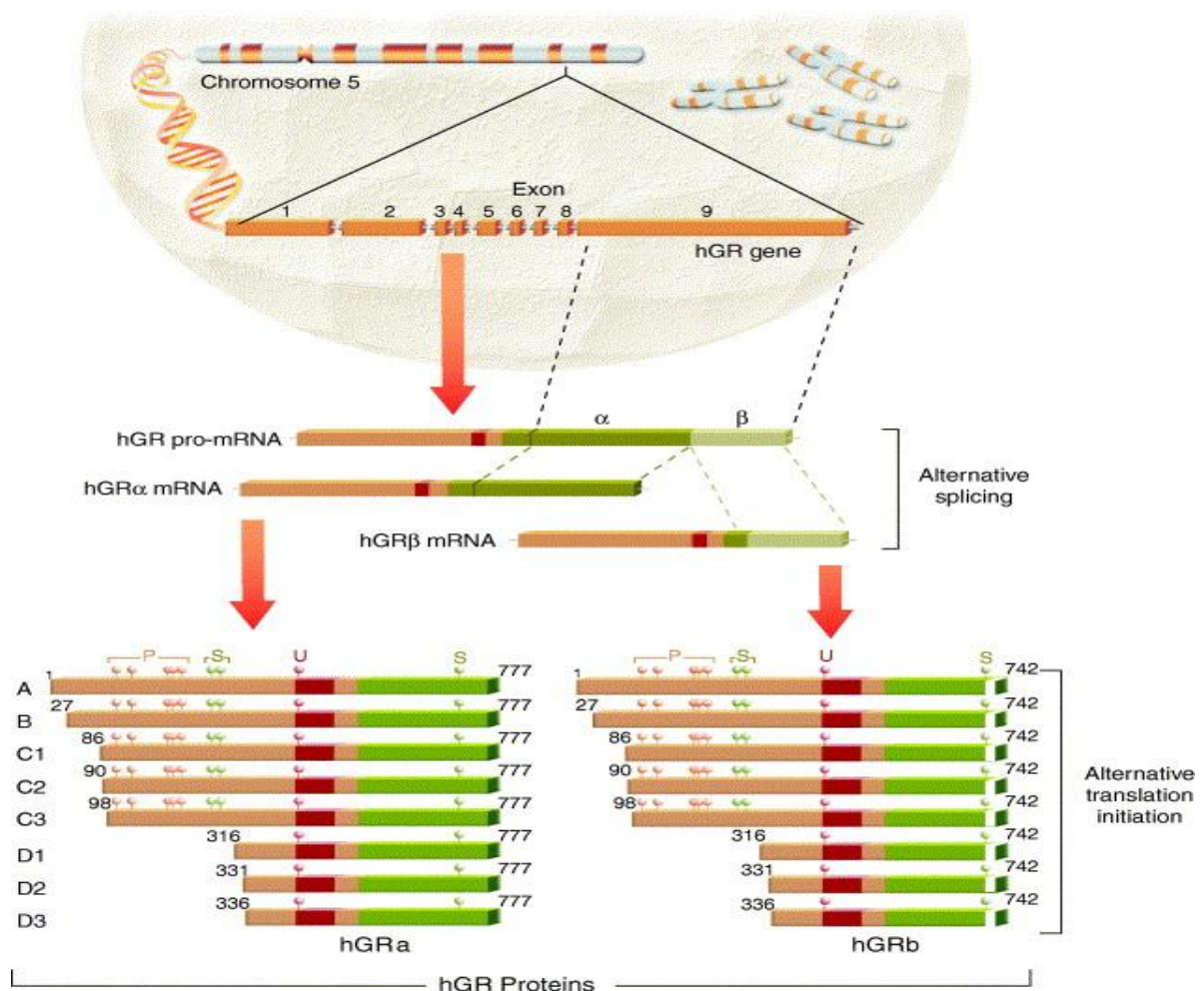
Επιπλέον, από την αρχική κλωνοποίηση του hGR το 1985 από τους Hollenberg και συνεργάτες, είχε θεωρηθεί ότι κάθε ένα από τα δύο εναλλακτικά μετάγραφα, hGRα και hGRβ, δημιουργούσε μόνο μια μοναδική πρωτεΐνη. Μελέτες απέδειξαν ότι δεν είναι αυτή η περίπτωση και ονόμασαν τους υποδοχείς που ανιχνεύτηκαν

hGR-A (94 kDa) και hGR-B (91 kDa) με βάση το μοριακό βάρος τους. Οι περαιτέρω μελέτες κατέδειξαν ότι ο πιο ελλειπής GR-B προέκυψε από την εναλλακτική έναρξη μετάφρασης στο εσωτερικό κωδικόνιο ATG που αντιστοιχεί στη μεθειονίνη 27 (M27) και οι λειτουργικές αναλύσεις έδειξαν ότι και οι δύο GR-A και GR-B ισομορφές εκθέτουν παρόμοια υποκυτταρική κατανομή και πρόσδεμα-προκληθείσα πυρηνική μετατόπιση. Ωστόσο, η δραστηριότητα trans-ενεργοποίησης αλλά όχι trans-καταστολής, των δύο ισομόρφων διαφέρει με τον GR-B να είναι σχεδόν δύο φορές πιο δραστικός από την μεγαλύτερη μορφή GR-A. Επιπλέον, η πιο σύντομη ισομορφή GR-B παρατηρήθηκε επίσης ενδογενώς σε διάφορες κυτταρικές σειρές όπως HeLa, HEK293, CEM-C7, προτείνοντας ότι η εναλλακτική έναρξη μεταφράσεων του hGR είναι ένα φυσικά εμφανιζόμενο φαινόμενο [99].

Αναλυτικότερα, οι Lu και Cidlowski (2006), ανακάλυψαν πρόσθετες GRα ισομορφές που παράγονται από μεταφραστικούς εναλλακτικούς μηχανισμούς. Αυτές οι ισομορφές υποδοχέα περιγράφονται ως GRα-A, -B, -C1, -C2, -C3, -D1, -D2 και -D3. Η GRα-A ισομορφή αποτελεί ολόκληρο τον υποδοχέα που περιέχει τα αμινοξέα 1-777, ενώ τα αμινοτελικά άκρα των άλλων GRα ισομορφών έχουν κοντείνει. Η ριβοσωματική ανίχνευση διαφυγής και η ριβοσωματική παράκαμψη (διακλάδωση) είναι οι δύο μοριακοί μηχανισμοί που έχουν προσδιοριστεί και αποτελούν τη βάση της παραγωγής αυτών των GR ισομόρφων.

Όλες οι GRα ισομορφές είναι λειτουργικοί υποδοχείς επειδή περιέχουν την ίδια άθικτη πρόσδεμα-δεσμευτική περιοχή που μπορεί να δεσμεύσει τα γλυκοκορτικοειδή. Μετά από την ενεργοποίηση του προσδέματος, οι GRα ισομορφές βρίσκονται στον πυρήνα. Ωστόσο, ελλείψει του προσδέματος όλες οι GRα ισομορφές εκτός από τις GRα-D ισομορφές, εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι, οι GRα-D ισομορφές είναι εντοπισμένες πρώτιστα στον πυρήνα είτε παρουσία είτε ελλείψει των γλυκοκορτικοειδών. Ακόμα και όταν οι GRα-D ισομορφές προσδένονται στο αμινοτελικό άκρο με μια κίτρινη πρωτεΐνη φθορισμού (34 kD), εκφράζονται ακόμα σταθερά στον πυρήνα, προτείνοντας ότι το αμινοτελικό άκρο του GR έχει έναν μη αναγνωρισμένο ρόλο στην πυρηνική εξαγωγή ή στην κυτταροπλασματική διαμερισματοποίηση του GR (**Εικόνα 1.5.4**).

Μια άλλη ενδιαφέρουσα διαφορά μεταξύ των GRα ισομορφών βρίσκεται στις μεταγραφικές δραστηριότητές τους. Όλες οι GRα ισομορφές, συμπεριλαμβανομένων των GRα-D ισομορφών, επάγουν την έκφραση γονιδίων αναφοράς κατά δόση-εξαρτώμενο τρόπο. Απροσδόκητα, η GRα-C3 ισομορφή, σε σύγκριση με τον άγριο-τύπο GRα, εκθέτει μια διπλάσια υψηλότερη μεταγραφική δραστηριότητα στα GRE-"οδηγούμενα" γονίδια αναφοράς, ενώ οι GRα-D ισομορφές επιδεικνύουν τη μισή από αυτήν την δραστηριότητα. Οι GRα-A, -B, -C1 και -C2 ισομορφές παρουσιάζουν τα ενδιάμεσα επίπεδα δραστηριότητας.



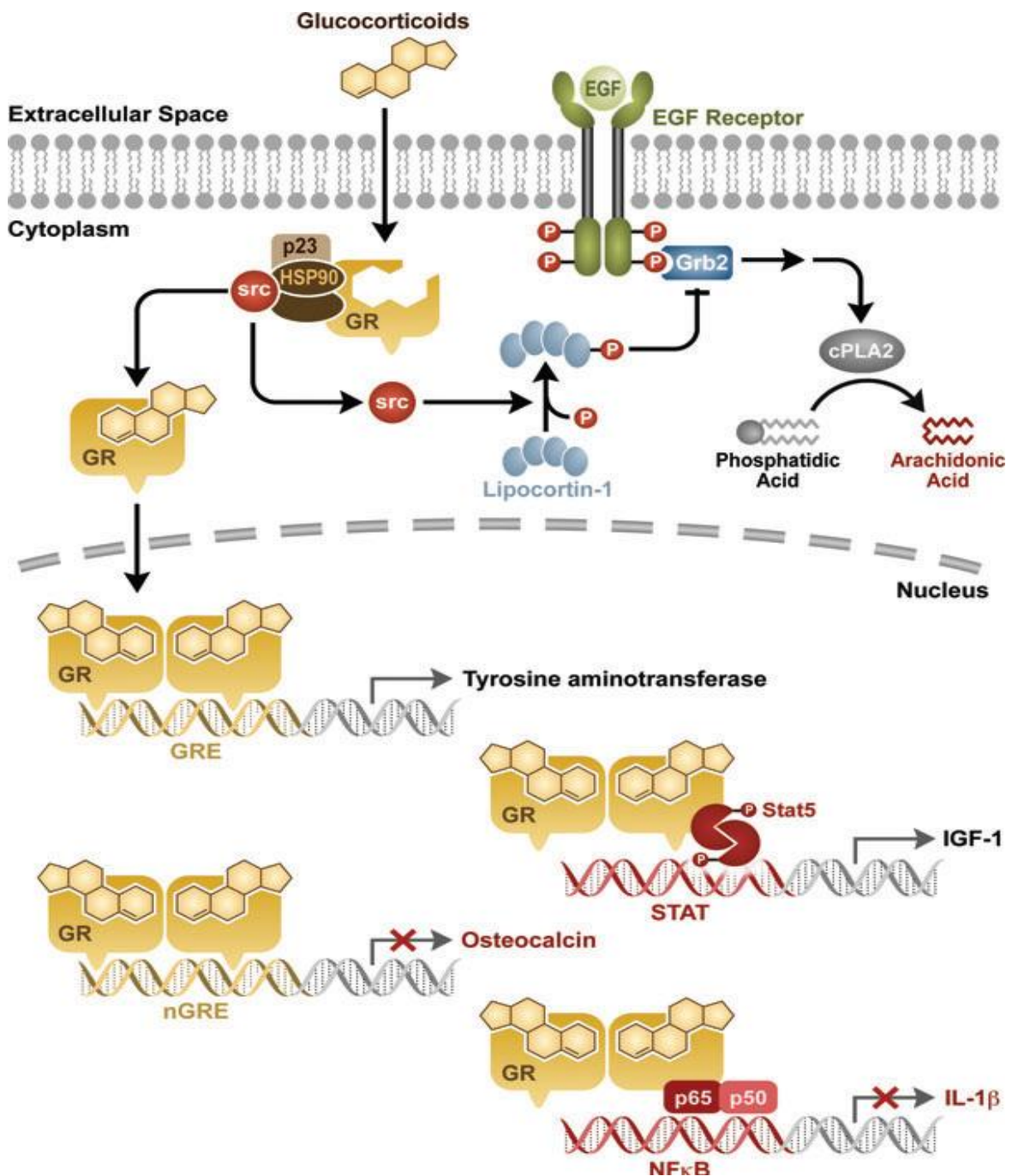
Εικόνα 1.5.4: Ένα γονίδιο του GR παράγει πολλαπλές ισομορφές του GR. Εναλλακτικό μάτισμα του εξονίου 9 παράγει GRα (σκούρο πράσινο) και GRβ (ανοικτό πράσινο). Κάθε GRα ή GRβ mRNA παράγει πρόσθετες ισομορφές από την εναλλακτική έναρξη μεταφράσεων. Οι αριθμοί δείχνουν τα πρώτα και τελευταία υπολείμματα για κάθε ανθρώπινη ισομορφή του GR. Κάθε πρωτεΐνη του GR τροποποιείται ομοιοπολικά μέσω της φωσφορυλίωσης (P) στα υπολείμματα S113, S141, S203, S211, και S226, της ουβικιτινίωσης (U) στη K417 και της sumo-υλίωσης (S) στα υπολείμματα K277, K293 και K703 ^[115]

1.5.6 Μηχανισμός δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών, ο οποίος είναι γνωστός σαν χαμηλής συγγένειας αλλά υψηλής ενεργότητας υποδοχέας, είναι ευρέως κατανεμημένος στους νευρώνες του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένων τον ιππόκαμπο, τον υποθάλαμο, τα νευρογλοιακά κύτταρα, τα κύτταρα της υπόφυσης, λεμφοκύτταρα, ήπαρ και μυϊκό ιστό. Οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών συνδέονται με την κορτικοστερόνη και εμφανίζουν την υψηλότερη συγγένεια για τα γλυκοκορτικοειδή και ιδιαίτερα για το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη.

Τα γλυκοκορτικοειδή θεωρείται ότι διαχέονται ελεύθερα δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης εξαιτίας του λιπόφιλου χαρακτήρα τους. Στο κυτταρόπλασμα, αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) που μεσολαβεί τις περισσότερες από τις ορμονο-προκληθείσες δράσεις. Η δέσμευση του προσδέματος από την LBD του GR οδηγεί τις πολύπλευρες λειτουργίες του υποδοχέα και ρυθμίζει τελικά τη μεταγωγή των σημάτων, τη γονιδιακή μεταγραφή, και τη trans-καταστολή (transrepression) (**Εικόνα 1.5.5**). Η πλειοψηφία αυτών των δραστηριοτήτων επηρεάζεται από τη πρόσδεμα-προκληθείσα πλαστικότητα της LBD, η οποία καθορίζει τελικά τις ποικίλες πρωτεϊνικές-πρωτεϊνικές και τις πρωτεϊνικές-DNA αλληλεπιδράσεις ^[116].

Ελλείψει ενός προσδέματος, η πλειοψηφία του πληθυσμού των GR διανέμεται στο κυτταρόπλασμα και ο υποδοχέας είναι κυρίως σε σύμπλεγμα με πρωτεΐνες του θερμικού σοκ (HSPs), όπως η HSP70, η HSP90 και η p23 και διάφορες ανοσοσφαιρίνες όπως η FKBP51 ^[117, 118]. Μετά από την ενεργοποίηση από ένα προσδεδεμένο μόριο, ακολουθεί η διαμόρφωση του υποδοχέα που οδηγεί στο διαχωρισμό του από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες συνοδούς και στην έκθεση των πυρηνικών σημάτων εντοπισμού του μέσα στην LBD του GR. Ωστόσο, ο ρόλος των συνεργατών HSP είναι πιθανώς πιο σύνθετος, επειδή έχουν εμπλακεί επίσης στη βοήθεια της μεταφοράς και της κυτταροπλασματικής-πυρηνικής παλινδρόμησης του GR ^[119, 120] και συμμετέχουν επίσης με έναν ενεργό ρόλο μέσα στο μεταγραφικό σύμπλοκο ^[121].



Εικόνα 1.5.5: Η σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών καταλήγει σε αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης και γρήγορα μη γενωμικά γεγονότα στο κυτταρόπλασμα. Ο GR μπορεί να ρυθμίσει τα γονίδια στόχων του με έναν θετικό ή αρνητικό τρόπο. Η θετική ρύθμιση μεσολαβείται κυρίως από την άμεση σύνδεση του πρόσδεμα-ενεργοποιημένου ομοδιμερισμένου GR επάνω στα επαγωγίσιμα στοιχεία ενισχυτών, στο γονίδιο υποκινητή, αποκαλούμενα ως γλυκοκορτικοειδή-ανταποκρινόμενα στοιχεία (GREs). Από την άλλη πλευρά, ο GR παρεμποδίζει αρνητικά τη δραστηριότητα των μεταγραφικών παραγόντων, όπως του NF-κB, οι οποίοι κινούν τα προ-φλεγμονώδη γονίδια ^[122].

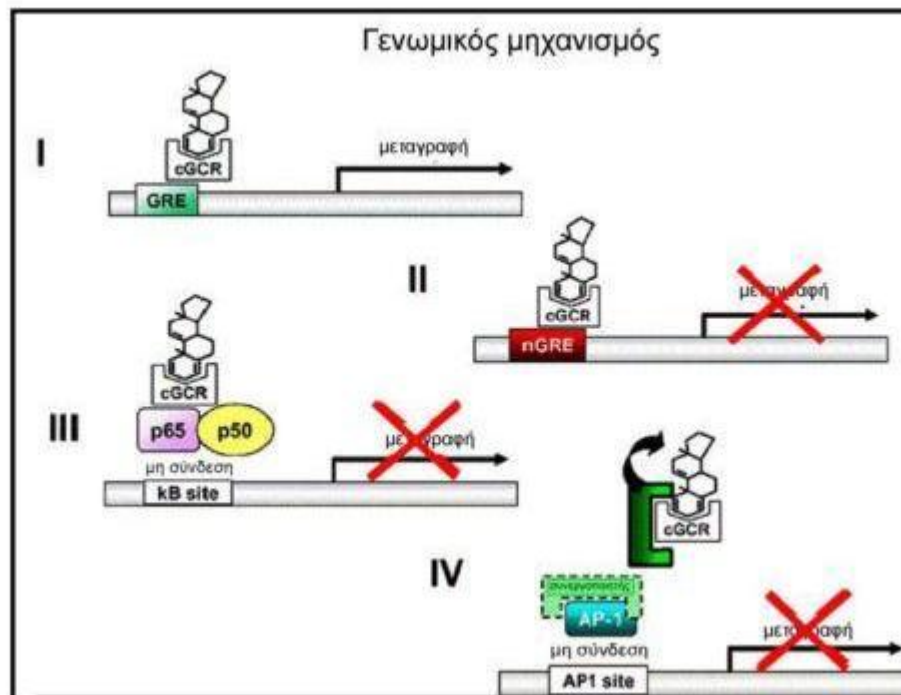
Ο GR με την ενεργοποιημένη πλέον μορφή του διμερίζεται και εισέρχεται στον πυρήνα ^[123, 124]. Τα πυρηνικά σήματα εντοπισμού αναγνωρίζονται έπειτα από μια ομάδα πυρηνικών πρωτεϊνών μετατόπισης, οι οποίες ενεργητικά κινούν παλινδρομικά τον υποδοχέα στον πυρήνα, οδηγώντας μ'αυτό τον τρόπο στην ταχεία μεταφορά του ενεργοποιημένου συμπλέγματος GR-κορτικοστεροειδούς στον πυρήνα, όπου δεσμεύεται σε συγκεκριμένες ακολουθίες στην περιοχή υποκινητών στο DNA, των κορτικοστεροειδών ανταποκρινόμενων γονιδίων, γνωστών ως γλυκοκορτικοειδο-ανταποκρινόμενα στοιχεία (GREs).

Η ειδική σύνδεση του GR στα GREs οδηγεί σε επιτάχυνση (θετικά GREs) ή επιδράδυνση (αρνητικά GREs) του ρυθμού μεταγραφής των συνδεόμενων γονιδίων. Ειδικότερα, τα γρήγορα σχηματισμένα ομοδιμερή του υποδοχέα, όπου δύο μόρια του GR ενώνονται ως ένα ομοδιμερές, αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με τις συγκεκριμένες cis-δρούσεις ακολουθίες GRE στους υποκινητές των γονιδίων στόχων. Η αλληλεπίδραση των GRs με τα GREs σταθεροποιείται περαιτέρω από την αποκατάσταση των συν-ενεργοποιητών που με τη σειρά τους αρχίζουν τη συγκρότηση του γενικού μηχανισμού μεταγραφής, που οδηγεί κλασικά στη ενίσχυση της γονιδιακής μεταγραφής (transactivation, trans-ενεργοποίηση), ενώ έχουν περιγραφεί επίσης και αρνητικές GRE θέσεις, στις οποίες η σύνδεση του GR οδηγεί στη γονιδιακή καταστολή (cis-καταστολή, cis-repression) **(Εικόνα 1.5.6-II)** ^[125, 126]. Οι βοηθητικές πρωτεΐνες ή οι συν-ενεργοποιητές, όπως ο στεροειδής υποδοχέας 1 συν-ενεργοποιητής (SRC-1) και ο μεταγραφικός ενδιάμεσος παράγοντας 2 (TIF2), είναι απαραίτητες για τη λειτουργία μεταγραφής των γονιδίων του GR, ενώ πολλές από αυτές τις βοηθητικές πρωτεΐνες περιέχουν δραστηριότητες τροποποίησης της χρωματίνης όπως είναι η ακετυλίωση των ιστονών ^[127]. Οι μεγάλες, πολυλειτουργικές πρωτεΐνες συνδέονται επάνω στο GR συνδεόμενο-πρόσδεμα μέσω ενός κοντού, πλούσιου σε λευκίνη, αμφιπαθικού άλφα-έλικα, γνωστού ως ένα μοτίβο LXXLL ή ένα πλαίσιο NR ^[128]. Ο συνδεόμενος-αγωνιστής LBD του GR διαμορφώνει μια ρηχή υδροφοβική αύλακα που μπορεί να προσαρμόσει τις λευκίνες του πλαισίου NR, γεφυρώνοντας κατά συνέπεια αποτελεσματικά τις δύο πρωτεΐνες από κοινού. Εκτός από την πυρηνική μετατόπιση και το διμερισμό, η δέσμευση του προσδενόμενου μορίου εκκινεί επίσης την κυτταροπλασματική φωσφορυλίωση των σερινών και των θρεονινών στην AF-1 περιοχή ^[129]. Διάφορες κινάσες, όπως

η μιτογόνο-ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση (MAPK), η κυκλίνη-εξαρτώμενη κινάση (Cdk) και η c-Jun N-τελική κινάση (JNK), έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν τη δραστηριότητα του συνδεδεμένου στο πρόσδεμα GR ^[130-132].

Μια άλλη πρόσδεμα-ρυθμιζόμενη λειτουργία της LBD του GR είναι η καταστολή των συγκεκριμένων γονιδίων, για την οποία έχουν περιγραφεί δύο μηχανισμοί. Ο ένας περιλαμβάνει ένα στοιχείο υποκινητή, καλούμενο ως ένα αρνητικό GRE (nGRE)^[133]. Ο τρόπος αλληλεπίδρασης στα nGRES παραμένει σχετικά ακαθόριστος, αλλά θεωρείται ότι η δέσμευση των ορμονών από τον GR προκαλεί τη συνένωση των υποκινητών και τον ανταγωνισμό για τους πρόσθετους μεταγραφικούς παράγοντες για να παραγάγει μια μειωμένη απάντηση (**Εικόνα 1.5.6-II**) ^[125, 134]. Εναλλακτικά, ο συνδεδεμένος με το πρόσδεμα GR μπορεί να προσδεθεί σε έναν αριθμό διαφόρων κακώς-καθορισμένων αρνητικών GRES (nGRES) στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων στόχων για να καταστείλει τη μεταγραφή. Υπάρχουν λίγα παραδείγματα αρνητικών GRES, αλλά μερικά σχετίζονται με τις παρενέργειες των κορτικοστεροειδών, συπεριλαμβανομένων των γονιδίων που ρυθμίζουν τον υποθάλαμο-υποφυσιακό άξονα, το μεταβολισμό των οστών (οστεοκαλσίνη) και τη δομή της επιδερμίδας (κερατίνες) ^[135].

Ο ενεργοποιημένος GR μπορεί επίσης να μειώσει τη γονιδιακή μεταγραφή με την παρεμπόδιση των παράλληλων οδών μεταγωγής σημάτων, όπως εκείνων που περιλαμβάνουν τον πυρηνικό παράγοντα κB (NF- κB) και τον πρωτεϊνικό ενεργοποιητή 1 (AP-1) (**Εικόνα 1.5.6-III, IV**) ^[125, 136]. Σύμφωνα με το επικρατέστερο μοντέλο αυτού του μηχανισμού καταστολής, φαίνεται ότι ο πρόσδεμα –ενεργοποιημένος GR αλληλεπιδρά άμεσα με τον μεταγραφικό παράγοντα στόχο, όπως είναι η p65 υπομονάδα του NFκB παρεμποδίζοντας έτσι τη γονιδιακή δραστηριότητα trans-ενεργοποίησης εκείνου του παράγοντα ^[125, 136-137]. Η αλληλεπίδραση του GR με τον NF- κB ή/ και τον AP-1 και η επακόλουθη καταστολή των γονιδίων στόχων τους θεωρείται γενικά να είναι ο σημαντικότερος μηχανισμός μέσω του οποίου τα γλυκοκορτικοειδή προστατεύουν ενάντια στη φλεγμονή. Και οι δύο NF- κB και AP-1 ενεργοποιούνται γρήγορα από τις προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, τους βακτηριακούς και ιογενείς παράγοντες μόλυνσης και τα προαποπτωτικά ερεθίσματα (UV ακτινοβολία) και επαναρυθμίζουν γρήγορα τη μεταγραφή των ανοσορυθμιστικών γονιδίων.



Εικόνα 1.5.6: Γενωμικός μηχανισμός της δράσης των GR: ο πρόσδεμα-ενεργοποιημένος υποδοχέας των GC μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου προκαλεί ή εμποδίζει τη γονιδιακή μεταγραφή. (I) Προκληθείσα σύνθεση των αντιφλεγμονωδών πρωτεϊνών μέσω της σύνδεσης του πρόσδεμα-ενεργοποιημένου υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα θετικά GRES, (II) κατασταλμένη μεταγραφή των φλεγμονωδών γονιδίων μέσω των αρνητικών GRES, (III) «trans-καταστολή» μέσω της άμεσης ή της έμμεσης αλληλεπίδρασης με τους μεταγραφικούς παράγοντες, (IV) ανταγωνισμός για τους πυρηνικούς συν-ενεργοποιητές μεταξύ του συμπλόκου GR/cGCR και των μεταγραφικών παραγόντων ^[125]

Η επαγωγή αυτών των προφλεγμονωδών γονιδίων είναι κρίσιμη για το σύστημα άμυνας ενός οργανισμού που προσδιορίζει και αντιμετωπίζει τους απειλητικούς παράγοντες. Ωστόσο, η υπερβολική διέγερση από αυτές τις απαντήσεις οδηγεί στη βλάβη του κυττάρου ή του ιστού και ακόμα και στο θάνατο. Οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών, απαραίτητοι για να διατηρούν την κατάλληλη ισορροπία, εξασθενίζουν την NF-κB και AP-1 διαμεσολαβούμενη παραγωγή από προφλεγμονώδεις κυτοκίνες με το σχηματισμό ενός ανενεργού συγκροτήματος με τον NF-κB ή AP-1 μέσω των άμεσων αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και ενισχύουν επίσης τη μεταγραφή ορισμένων αντιφλεγμονωδών κυτοκινών.

Θεραπευτικά, αυτή η trans-κατασταλτική δραστηριότητα του GR είναι ο στόχος πολλών ερευνών δεδομένου ότι θεωρείται να οδηγεί τις περισσότερες από τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις που συνδέονται με τα γλυκοκορτικοειδή. Σε αντίθεση με τον NF- κ B και AP-1, η TGF- β -ενεργοποιημένη οικογένεια Smad (Sma και Mad-σχετικές πρωτεΐνες) των μεταγραφικών παραγόντων εμπλέκεται πρώτιστα στη θεραπεία των πληγών. Έχει αναφερθεί, ότι ο GR ανταγωνίζεται τη TGF- β -προκληθείσα μεταγραφή των γονιδίων, όπως η φιμπρονεκτίνη, το κολλαγόνο και τον τύπο-1 αναστολέα ενεργοποιητή πλασμινογόνου μέσω της αλληλεπίδρασής του με Smad. Μια άλλη κατηγορία μεταγραφικού παράγοντα που επηρεάζεται από τον GR είναι η οικογένεια STAT (μεταγωγής σήματος και ενεργοποιητών της μεταγραφής), παράγοντες που εμπλέκονται κυρίως στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του μαστικού αδένα. Αντίθετα από τους άλλους, η φυσική συνένωση του GR με τον STAT μπορεί να οδηγήσει στην ενισχυμένη μεταγραφή των STAT-διαμεσολαβούμενων γονιδίων στόχων.

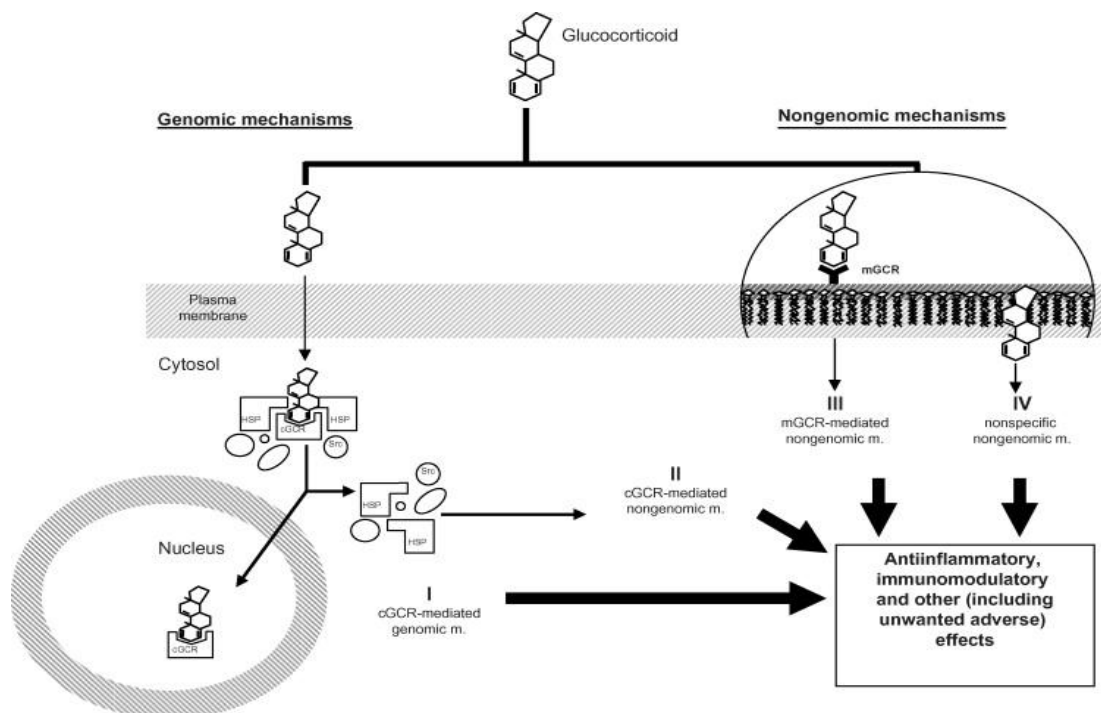
Ενώ, αυτός ο πολύ απλουστευμένος καταρράκτης σήματος που παρουσιάστηκε στην εικόνα 1.5.6, έχει εμπλουτίσει σημαντικά την κατανόησή μας για το μηχανισμό της δράσης των GRs, ωστόσο δεν μεταβιβάζει την ακραία πολυπλοκότητα του γονιδίου-, κυττάρου-και την ιστοειδική δραστηριότητα των γλυκοκορτικοειδών. Γενικά, η φύση και το μέγεθος της απάντησης ενός κυττάρου στα γλυκοκορτικοειδή εξαρτώνται από τα επίπεδα των ορμονών στα οποία εκτίθεται και από τη συγκέντρωση του υποδοχέα σε ένα κύτταρο, καθώς επίσης και από την αποδοτικότητα της GR-μεσολαβούμενης μεταγωγής σημάτων και της γενωμικής δυνατότητας πρόσβασης των γλυκοκορτικοειδο-απαντητικών γονιδίων. Ειδικότερα, πολλαπλές GR ισομορφές παράγονται ως αποτέλεσμα του εναλλακτικού ματίσματος και της εναλλακτικής έναρξης μεταφράσεων όπως και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, και κάθε ισομορφή παρουσιάζει διαφορετικές δυνατότητες μεταγωγής σημάτων ^[99].

1.5.7 Μη-γενωμική δράση των γλυκοκορτικοειδών

Εκτός από τον κλασικό αργό τρόπο δράσης των γλυκοκορτικοειδών, υπάρχουν αυξανόμενα στοιχεία για τις ταχείες, μη γενωμικές επιδράσεις των GC στις

κυτταρικές απαντήσεις που εμφανίζονται μέσα σε λεπτά (**Εικόνα 1.5.7**). Η έξω-επιπεφρίδια σύνθεση των γλυκοκορτικοειδών ορμονών δεν συμβάλλει ουσιαστικά στα κυκλοφορούντα επίπεδα αυτών των ορμονών και πιθανότατα μεσολαβεί αυτοκρινείς και παρακρινείς επιδράσεις. Αυτές οι επιδράσεις των GC είναι πάρα πολύ γρήγορες για να ρυθμίζονται στο μεταγραφικό επίπεδο και επομένως καλούνται μη γενωμικές για να διακριθούν από τον κλασικό γενωμικό τρόπο δράσης των γλυκοκορτικοειδών.

Οι μη γενωμικές δραστηριότητες των GC δεν είναι προφανώς ομοιόμορφες και πολλαπλοί βαθύτεροι μοριακοί μηχανισμοί έχουν περιγραφεί [138, 139]. Η ιδέα σύμφωνα με την οποία ο GR θεωρήθηκε ότι ήταν κυρίως ένας πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας και ότι η μη συνδεδεμένη πρόσδεμα-κυτοσολική μορφή του GR (cGCR) ήταν απλά ανενεργή, έχει αναθεωρηθεί και έχει προταθεί ότι ο GR διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στο κυτοσόλιο λόγω αυτών των γρήγορων επιρροών.



Εικόνα 1.5.7: Επισκόπηση των γενωμικών και των μη-γενωμικών μηχανισμών της δράσης των γλυκοκορτικοειδών: τα λιπόφιλα γλυκοκορτικοειδή περνούν εύκολα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και δεσμεύονται στον cGCR (κυτοσολικός υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών), ο οποίος διαμεσολαβεί γενωμικές (I) και μη-γενωμικές επιδράσεις (II). Οι μη-γενωμικές επιδράσεις προτείνεται ότι μεσολαβούνται επίσης μέσω του μεμβρανικά συνδεδεμένου GCR (III) και μέσω αλληλεπιδράσεων με τις κυτταρικές μεμβράνες (IV) [125]

Επίσης, οι ταχείες GC επιδράσεις μπορεί να εμφανίζονται από την αλληλεπίδραση των GCs με ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς. Για παράδειγμα, έχει περιγραφεί ότι οι G-πρωτεϊνικά-συνδεδεμένοι υποδοχείς μπορούν να μεσολαβήσουν τις μη γενωμικές επιρροές των GCs ^[139, 140]. Επιπλέον, έχει παρουσιαστεί μια κυτταρομεμβρανική-συνδεδεμένη μορφή του GR (mGCR-μεμβρανικός υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών) σε B κύτταρα και σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs), και έχει προταθεί ότι αυτός ο GR μπορεί να προκαλέσει μια αλυσίδα ενδοκυτταρικών γεγονότων ^[141].

Στο ζωντανό οργανισμό (in vivo), οι γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες συντίθενται από την χοληστερόλη στον φλοιό των επινεφριδίων, μέσα από μια σειρά αντιδράσεων που καταλύονται από το P-450 ένζυμο του κυτοχρώματος το οποίο κωδικεύεται από το γονίδιο CYP11B1(11β-υδροξυλάση) και παραδίδονται στους ιστούς στόχους από τις μεταφορικές πρωτεΐνες. Η σύνθεση και η έκκριση της κορτιζόλης, της κύριας GC ορμόνης στον άνθρωπο, ρυθμίζεται στενά από την ισορροπία της κορτικοτροπίνης ACTH (που εκκρίνεται από τον αδένα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης) και της ορμόνης απελευθέρωσης κορτικοτροπίνης CRH (που εκκρίνεται από τον υποθάλαμο κατά τη διάρκεια στρες) με έναν παλμικό και κίρκαδικό τρόπο ^[142, 143].

1.5.8 Μιτοχονδριακές επιδράσεις των GCs

Μεγάλος αριθμός ερευνών δηλώνουν ότι τα GCs ρυθμίζουν τις μιτοχονδριακές λειτουργίες και τον μεταβολισμό ενέργειας καθώς και οι δύο ισομορφές των γλυκοκορτικοειδών GRα και GRβ έχουν εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια των ζώων και στα ανθρώπινα κύτταρα καθώς και στους ιστούς. Τα "θεωρούμενα" (putative) GREs με έντονες ομοιότητες με τα GREs έχουν ανιχνευτεί στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα είτε στην περιοχή της θηλειάς D είτε στα δομικά γονίδια. Η εισαγωγή/εξαγωγή του GR από τα μιτοχόνδρια και η σύνδεση του GR με τα υποτιθέμενα μιτοχονδριακά GREs έχει συνδεθεί με ταυτόχρονες αλλαγές στα κωδικοποιημένα γονίδια και έχει συσχετιστεί με κυτταρικές λειτουργίες όπως η απόπτωση. Επίσης, η μετατόπιση του συμπλόκου GR/Bcl-2 στα μιτοχόνδρια σε απόκριση στην κορτικοστερόνη για την ρύθμιση μιτοχονδριακών λειτουργιών όπως μιτοχονδριακή οξειδωση, δυναμικό μεμβράνης και χωρητικότητα σε

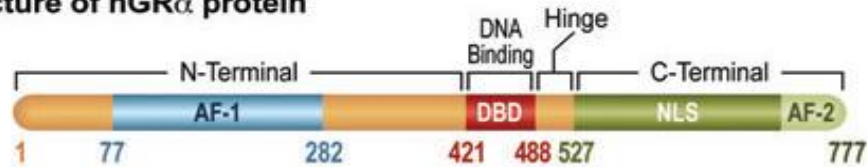
ασβέστιο, δηλώνουν ότι οι σχέσεις αυτές του GR με τα μιτοχόνδρια παίζουν βασικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση.

1.6 ΜΕΤΑ-ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Εδώ και πολλά έτη είναι γνωστές οι πολλαπλές φυσιολογικές λειτουργίες των στεροειδών ορμονών. Μελέτες από διάφορες ομάδες παρουσιάζουν ότι οι στεροειδείς υποδοχείς μπορούν να τροποποιηθούν οι ίδιοι σε διάφορες θέσεις και υποστηρίζουν ότι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις διαδραματίζουν έναν σημαντικό πρόσθετο ρόλο, όπως για παράδειγμα στον προσδιορισμό της ενεργοποίησης μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Η μεταγραφική δραστηριότητα των στεροειδών υποδοχέων επηρεάζεται κυρίως από τη δέσμευση του προσδέματος, αλλά οι τροποποιήσεις πολυπεπτιδικής αλυσίδας επηρεάζουν τη σταθερότητα και τη δραστηριότητα του υποδοχέα, και παρέχουν τους πιθανούς μηχανισμούς για τη κύτταρο-ή γονίδιο-ειδική ρύθμιση.

Έχουν περιγραφεί αρκετές τροποποιήσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν την φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, γλυκοσυλίωση, μεθυλίωση, ουβικιτιλίωση και sumo-υλίωση και έχουν προσδιοριστεί σε πολλές περιπτώσεις οι ακριβείς θέσεις τροποποίησης και τα ένζυμα τροποποίησης που εμπλέκονται ^[144, 145] (**Εικόνα 1.6.1**). Η φωσφορυλίωση, η ακετυλίωση, η γλυκοζυλίωση και η μεθυλίωση είναι αντιστρεπτές και σχετικά γρήγορες διεργασίες και αποτελούν θεμελιώδεις μηχανισμούς κατά τους οποίους τα κύτταρα συντονίζουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες. Η ουβικιτιλίωση και sumo-υλίωση παρουσιάζουν κάπως διαφορετικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν κατά την προσθήκη μικρών πρωτεϊνών στα μόρια-στόχους σημαίνοντάς τα για αποικοδόμηση ή άλλες διεργασίες ^[146]. Αυτές οι ομοιοπολικές αλλαγές μπορούν να έχουν επιπτώσεις στη σταθερότητα του υποδοχέα, στον υποκυτταρικό εντοπισμό καθώς επίσης και στις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στην πολυπλοκότητα του συστήματος μπορεί να προστεθεί και μια ρυθμιστική διασταυρούμενη συνομιλία μεταξύ μερικών από αυτές τις τροποποιήσεις ^[145].

Domain structure of hGR α protein



Post-translational modification of hGR α protein



Εικόνα 1.6.1: Η δομή της πρωτεΐνης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του ^[144]

1.6.1 Ουβικιτιλίωση

Η ουβικιτιλίωση των πρωτεϊνών χρησιμεύει ως ένας σημαντικός μηχανισμός για τη ρυθμισμένη αποικοδόμηση.

Ειδικότερα, οι διαδικασίες και τα βιοχημικά βήματα της ουβικιτιλίωσης και της πολυουβικιτιλίωσης περιλαμβάνουν: 1) ενεργοποίηση της ουβικιτίνης από το ένζυμο E-1, 2) μεταφορά της ουβικιτίνης που ενεργοποιείται από τα ένζυμα σύζευξης E-2 σε μια συγκεκριμένη λιγάση ουβικιτίνης E-3 και αναγνώριση μιας ευρείας κλίμακας των υποστρωμάτων στόχων από τα συντηρημένα μοτίβα ουβικιτινίωσής τους και σύνδεση της ουβικιτίνης στα υπολείμματα λυσίνης (K) στις πρωτεΐνες στόχους ^[147]. Μόνο μια E1 πρωτεΐνη έχει προσδιοριστεί αλλά υπάρχουν 18 E2 και πάνω από 200 E3 μέλη οικογενειών στον άνθρωπο ^[145].

1.6.1.1 Ουβικιτιλίωση του GR

Μια σημαντική γλυκοκορτικοειδή-προκληθείσα τροποποίηση του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών είναι η ομοιοπολική σύνδεση της ουβικιτίνης στον υποδοχέα σημαίνοντάς τον έτσι για την αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα.

Στην *silico* ανάλυση (που βασίζεται σε μια διαδικασία χρωματογραφίας) των ακολουθιών από άνθρωπο, ποντίκι και αρουραίο προσδιορίστηκε ένα μοτίβο αποκαλούμενο ως PEST (Pro, Glu, Ser και Thr), να είναι μια αναγνωριστική θέση υποστρώματος για τις E-2/E-3 λιγάσες ^[148]. Στον ανθρώπινο GR, η K419 (όπου K συμβολίζει τη λυσίνη) εντοπίζεται σε ένα μοτίβο αποδόμησης που προσδιορίστηκε προηγουμένως σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (**Εικόνα 1.6.1**). Η

τροποποίηση του αντίστοιχου υπολείμματος στον GR ποντικού σε αλανίνη οδηγεί στη σταθεροποίηση και την ενισχυμένη δραστηριότητα ^[145], ενώ δεν έχει παρατηρηθεί η άμεση ουβικιτιλίωση αυτού του υπολείμματος. Οι RSP5 και hRPF1 είναι συν-ενεργοποιητές του GR και η CHIP, μια E3 λιγάση, έχει αναφερθεί να στοχοθετεί τον προσδεδεμένο GR στο πρωτεάσωμα ^[145].

Η αποικοδόμηση της πρωτεΐνης του GR που μεσολαβείται μέσω της ουβικιτίνης-πρωτεασώματος προτάθηκε αρχικά όταν κύτταρα COS-1 που επεξεργάστηκαν εκ των προτέρων με τον αναστολέα πρωτεασώματος MG-132 παρεμπόδισαν τη μειορρύθμιση του GR από τη δεξαμεθαζόνη και παρουσίασαν ουβικιτινιωμένα είδη GR. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η Ser 412 που εντοπίζεται μέσα στην ακολουθία PEST, είναι επίσης ένας στόχος για την φωσφορυλίωση. Γι' αυτό το λόγο, η κατάσταση φωσφορυλίωσης της GR πρωτεΐνης θα μπορούσε να έχει επιπτώσεις στην πρωτεϊνική ανακύκλωση του υποδοχέα. Πράγματι, η μετάλλαξη όλων των θέσεων φωσφορυλίωσης στον GR αύξησε τον χρόνο ημίσειας ζωής του υποδοχέα και ανέστειλε τη μειορρύθμιση. Εντούτοις, ο μερικός ανταγωνιστής του GR, RU486, δεν έχει καμία επίδραση στην κατάσταση φωσφορυλίωσης του GR, ακόμα κι αν η πρωτεϊνική μειορρύθμιση διατηρείται. Επομένως, αυτά τα στοιχεία προτείνουν ότι σήματα και εκτός της φωσφορυλίωσης μπορούν να υπάρξουν για να στοχοθετήσουν τον GR για την αποδόμηση ^[147].

1.6.2 SUMO-υλίωση

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της sumo-υλίωσης, το SUMO-1, ένα ώριμο πολυπεπτίδιο 98 αμινοξέων (11kDa) συνδέεται ομοιοπολικά με τα υπολείμματα λυσίνης των πρωτεϊνικών στόχων. Παρόμοια με την ουβικιτινίωση, η SUMO-υλίωση είναι μια δυναμική διαδικασία που περιλαμβάνει αντιδράσεις πολλαπλών βημάτων που καταλύονται από ένα συγκεκριμένο ένζυμο που ονομάζεται Ubc9, αλλά διαφέρει κατά τη λειτουργική συνέπεια. Το ένζυμο Ubc9 είναι απαραίτητο για την πρωτεϊνική αναγνώριση και την σύνδεση του SUMO ^[147]. Ειδικότερα, η sumo-υλίωση είναι μια διαδικασία τριών βημάτων που περιλαμβάνει ένα E1 ενεργοποιημένο-ένζυμο (Aos/Uba2), ένα E2 ένζυμο σύζευξης (Ubc9) και μια E3 λιγάση που ανήκει σε μια από τις τρεις κατηγορίες ^[145]. Οδηγεί στην ομοιοπολική σύνδεση μιας αλυσίδας SUMO επάνω στα υπολείμματα λυσίνης. Τέσσερις

ισομορφές SUMO έχουν προσδιοριστεί, προσθέτοντας στη λειτουργική ποικιλομορφία του συστήματος SUMO-υλίωσης ^[147]. Αυτή η μετα-μεταφραστική τροποποίηση μπορεί να αναστραφεί από SUMO συγκεκριμένες πρωτεάσες ^[145]. Ακόμα και αν η sumo-υλίωση έχει συνήθως επιπτώσεις μόνο σε μια περιορισμένη αναλογία μιας δεδομένης πρωτεΐνης στόχων, η επίδρασή της μπορεί να είναι αρκετά δραματική. Η SUMO-υλίωση μπορεί να επηρεάσει πολύ διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες όπως η πρωτεϊνική σταθερότητα, ο υποκυτταρικός εντοπισμός, η DNA-σύνδεση ή το μεταγραφικό δυναμικό. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί η διασταυρούμενη συνομιλία μεταξύ της sumo-υλίωσης και των μονοπατιών MAP κινασών ^[145, 147].

1.6.2.1 Sumo-υλίωση του GR

Η λειτουργία του GR ρυθμίζεται επίσης από τη προσθήκη ενός μικρού ουβικιτίνη-σχετικού τροποποιητή-1 (SUMO-1) ^[147, 148]. Η SUMO-υλίωση του δεν είναι απαραίτητως πρόσδεμα-εξαρτώμενη και μπορεί να έχει επιπτώσεις στην πρωτεϊνική σταθερότητα καθώς επίσης και τη μεταγραφική λειτουργία. Το SUMO σύζευγα Ubc9 αλληλεπιδρά με τον GR ^[145]. Μια μελέτη έδειξε ότι η υπερέκφραση του SUMO-1 μαζί με τον GR σε COS-7 κύτταρα αύξησε συγκεκριμένα τη πρόσδεμα-προκληθείσα trans-ενεργοποίηση ενός γονιδίου αναφοράς GREx4-TK-Luc πενταπλάσια και αυτό μπορεί να αποτραπεί από έναν αναστολέα πρωτεασώματος ^[147]. Επίσης υποκινεί τη δραστηριότητα του GR στους υποκινητές με πολλαπλές θέσεις σύνδεσης προτείνοντας ότι πραγματοποιούνται συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διμερών του υποδοχέα. Στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών προσδιορίστηκαν τρεις συναινετικές θέσεις σύνδεσης SUMO, στη K277, K293 και K703 (όπου συμβολίζει τη λυσίνη) από τις οποίες οι πρώτες δύο ανήκουν στην N-τελική περιοχή trans-ενεργοποίησης, ενώ η τρίτη βρίσκεται μέσα στη πρόσδεμα-δεσμευτική περιοχή του GR, η SUMO-υλίωση του GR μπορεί να ασκήσει μια μεγάλη επίδραση στη λειτουργία του GR ^[148]. Η μετάλλαξη των θέσεων sumo-υλίωσης που βρίσκονται στο μοτίβο ελέγχου συνεργίας αυξάνει τη λειτουργία του GR στους ελάχιστους υποκινητές αλλά όχι στον υποκινητή MMTV ^[145, 147]. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι επιδράσεις

της SUMO-υλίωσης του GR εξαρτώνται ιδιαίτερα από τον υποκινητή και ενδεχομένως το κυτταρικό πλαίσιο ^[145]. Έχει αναφερθεί ότι η διαδικασία της SUMO- υλίωσης μπορεί να επηρεαστεί από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το κυτταρικό στρές. Ως εκ τούτου, η SUMO- υλίωση του GR μπορεί να παρέχει έναν τρόπο για να ρυθμιστεί η μεταγραφική δραστηριότητα του GR σε απάντηση στις αλλαγές στο περιβάλλον στα υποσύνολα των γονιδίων στόχων ανάλογα με το πλαίσιο των γονιδίων-υποκινητών ^[147].

Η ουβικιτινίωση και η SUMO- υλίωση μπορούν να στοχεύσουν την ίδια πρωτεΐνη όπως περιγράφεται στην περίπτωση του p53 και των πρωτεϊνών IκB. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, η προσθήκη του SUMO-1 σε IκB εμποδίζει την ουβικιτινίωση και οδηγεί σε μια πιο σταθερή πρωτεΐνη ^[146].

1.6.3 Ακετυλίωση

Εκτός από την ουβικιτιλίωση και τη sumo-υλίωση, η πρωτεϊνική λειτουργία μπορεί επίσης να ρυθμιστεί από την ακετυλίωση και τη μεθυλίωση ^[147].

Πολυάριθμες μελέτες τεκμηριώνουν ότι η ακετυλίωση της N-τελικής αλυσίδας των ιστονών σε συγκεκριμένα υπολείμματα λυσίνης είναι ένα απαραίτητο βήμα για τη δομή της χρωματίνης που κάνει περιοχές του υποκινητή προσιτές στις ρυθμιστικές πρωτεΐνες ^[145], προσδίδοντας στην ακετυλίωση των πρωτεϊνών έναν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο. Αντίθετα από την N-τελική ακετυλίωση, η μετα-μεταφραστική ακετυλίωση ε-αμινο-λυσίνης των πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα αντιστρεπτή και χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση των δυναμικών διαδικασιών. Η αφαίρεση των ακετυλικών ομάδων πραγματοποιείται από τις απακετυλάσες πρωτεΐνες, όπως στη HDAC1 σε HDAC17 και SIRT1 σε SIRT7 ^[147].

1.6.3.1 Ακετυλίωση του GR

Ο σημαντικός ρόλος της ακετυλίωσης στη λειτουργία των στεροειδών υποδοχέων έχει εκτιμηθεί μόλις πρόσφατα, όπως και η πρόσδεμα εξαρτώμενη ακετυλίωση του GR στη K494 και K495 (όπου K συμβολίζει τη λυσίνη). Η ίδια μελέτη αναφέρει ότι η απακετυλίωση του GR από την HDAC2 είναι απαραίτητη για τη δέσμευση του υποδοχέα στον NF-Κβ και την καταστολή του κατάρρους γονιδίων στόχων.

Επιπλέον, η δραστηριότητα του GR που ρυθμίζεται από την ακετυλίωση έχει αναφερθεί κυρίως ως έμμεση επίδραση της ακετυλίωσης της HSP90 ^[147, 148].

1.6.4 Γλυκοζυλίωση

Πολλές κυτταρικές πρωτεΐνες είναι γλυκοζυλιωμένες κατά την προσθήκη την N-ακετυλογλυκοζαμίνης μέσω του συνδέσμου O-γλυκοζίτη με τις πλευρικές αλυσίδες υδροξυλίου των σερινών και θρεονινών (O-GlcNAc). Η O-GlcNAc τρανσφεράση (OGT) που βρίσκεται και στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα μεταφέρει την GlcNAc από την UDP- GlcNAc στη Ser/Thr. Ο κατάλογος των υποστρωμάτων που τροποποιούνται από την O-συνδεμένη γλυκοζυλίωση είναι μεγάλος και περιλαμβάνει πολλές ομάδες πρωτεϊνών όπως οι κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες και τα ένζυμα όπως κινάσες, φωσφατάσες και η RNA πολυμεράση II.

1.6.4.1 Γλυκοζυλίωση του GR

Η γλυκοζυλίωση είναι μια ιδιαίτερα άφθονη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που βρίσκεται σε μια ευρεία ποικιλία ειδών και σε διάφορες ομάδες πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των μεταγραφικών παραγόντων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις ρυθμιστικές διαδικασίες. Η γλυκοζυλίωση εμφανίζεται συχνά σε φωσφοπρωτεΐνες και σε διάφορες περιπτώσεις αυτές οι δύο τροποποιήσεις εμφανίζονται ως αλληλοεξαρτώμενες ή αμοιβαία αποκλεισμένες. Επιπλέον, έχει υποτεθεί ότι η γλυκοζυλίωση μπορεί να διαμορφώσει τη συγκρότηση των μεταγραφικών συμπλεγμάτων που οδηγούν στην ενεργοποίηση των συγκεκριμένων γονιδίων.

1.6.5 Μεθυλίωση

Η πρωτεϊνική ακετυλίωση και μεθυλίωση είναι συνήθεις ρυθμιστικοί μηχανισμοί μεταξύ των ευκαρυωτικών. Οι πρώτες μελέτες σε αυτόν τον τομέα της έρευνας πρότειναν ότι οι ιστόνες μπορούν να ακετυλιωθούν και/ ή να μεθυλιωθούν, και αποδείχθηκε ότι αυτές οι τροποποιήσεις ιστονών ρυθμίζουν τη γονιδιακή μεταγραφή μέσω των αναδιοργανώσεων της χρωματίνης ^[147].

Η δραστηριότητα μεθυλο-τρανσφεράσης ιστόνης (HMT) έχει συνδεθεί πρόσφατα με την εξελικτικά συντηρημένη SET περιοχή που βρίσκεται σε πάνω από 140 ακολουθίες γονιδίων ^[146]. Η μεθυλίωση μπορεί να ρυθμίσει τη δραστηριότητα της ιστόνης H3 και ο μηχανισμός αυτής της ενεργοποίησης αποκάλυψε την αξιοπρόσεκτη αλληλοεξάρτηση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που μπορούν να υπάρξουν σε μια πρωτεΐνη. Η μεθυλίωση της λυσίνης 9 αναστέλει την φωσφορυλίωση της σερίνης 10 και αυτή η φωσφορυλίωση απαιτείται για την ακετυλίωση της λυσίνης 14. Σε αντίθεση με αυτό που είναι γνωστό για την ακετυλίωση, ελάχιστα είναι γνωστά για την αντιστρεψιμότητα της μεθυλίωσης λυσίνης και αργινίνης των πρωτεϊνών ^[147].

1.6.5.1 Μεθυλίωση του GR

Όπως περιγράφεται παραπάνω, η λειτουργία του GR επηρεάζεται επίσης μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλες πρωτεΐνες όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες, οι συνοδές πρωτεΐνες, τα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και οι συν-ρυθμιστές.

Κατά συνέπεια, οι χημικές αντιδράσεις που διαμορφώνουν τις λειτουργίες αυτών των βοηθητικών πρωτεϊνών μπορούν να διαμορφώσουν τη δραστηριότητα του GR με έναν έμμεσο τρόπο.

Υπάρχουν κάποια στοιχεία ότι η μεταγραφική δραστηριότητα των στεροειδών υποδοχέων μπορεί να διαμορφωθεί από τη μεθυλίωση ιστονών. Η μεθυλίωση μπορεί επίσης να εμφανιστεί στις μη-ιστόνες πρωτεΐνες. Έχει αποδειχθεί ότι ορισμένοι συν-ενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων, όπως η p300, μεθυλιώνονται στην C-τελική περιοχή από την μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης (CARM1) οδηγώντας στην αναστολή των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της p300 και της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GRIP1) της p160 οικογένειας των συν-ενεργοποιητών ^[147]. Επομένως, η μεθυλίωση των συν-ενεργοποιητών του GR μπορεί επίσης να διαμορφώσει την GR σηματοδότηση.

1.6.6 Φωσφορυλίωση

Σε ένα τυπικό κύτταρο θηλαστικών υπάρχουν χιλιάδες πρωτεΐνες που εκφράζονται και αρκετές απ'αυτές περιέχουν φωσφορυλιωμένα αμινοξέα.

Κατά την αντίδραση της φωσφορυλίωσης, συντελείται η μεταφορά των φωσφορικών ομάδων ($-PO_4$) από το ATP (το οποίο μετατρέπεται σε ADP) σε αμινοξέα πρωτεϊνών που περιέχουν $-OH$ όπως για παράδειγμα στα αμινοξέα σερίνη, θρεονίνη και τυροσίνη. Η φωσφορυλίωση στα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης και λιγότερο συχνά σε τυροσίνη αποτελεί μια από τις πιο συχνές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών. Την αντίδραση της φωσφορυλίωσης καταλύουν οι κινάσες ενώ οι φωσφατάσες απομακρύνουν τις φωσφορικές ομάδες από τις πρωτεΐνες στόχους ^[149]. Οι πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες στοχεύουν πολλαπλές πρωτεΐνες και είναι ένζυμα ειδικά και για τα δυο κατάλοιπα, σερίνης και θρεονίνης ή για τα κατάλοιπα τυροσίνης. Οι φωσφατάσες παρουσιάζουν πιο ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος από τις κινάσες.

Πολλοί μεταγραφικά ρυθμιστικοί παράγοντες είναι φωσφοπρωτεΐνες. Μελέτες από μεταγραφικούς παράγοντες έχουν δείξει ότι η φωσφορυλίωση μπορεί να διαδραματίσει ρόλους στην πυρηνική μετατόπιση, στη DNA σύνδεση (είτε θετικά είτε αρνητικά), στις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και στην trans-ενεργοποίηση ^[150].

Ενεργοποιώντας, για παράδειγμα, τους μεταγραφικούς παράγοντες (που βρίσκονται στο DNA στον πυρήνα) με PO_4 , η σύνθεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί. Κατά συνέπεια, η μειορρύθμιση των υποδοχέων μπορεί να απορρέει από τη φωσφορυλίωση ορισμένων μεταγραφικών παραγόντων. Επιπλέον, οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι συχνά πολλαπλά φωσφορυλιωμένοι και όπως στην περίπτωση του c-Jun, μπορεί να περιέχουν φωσφορυλιώσεις που ενισχύουν τη δραστηριότητα καθώς επίσης και άλλες που μειώνουν τη δραστηριότητα ^[151].

Τελευταία, η φωσφορυλίωση μπορεί να επηρεάζει λειτουργίες ενίσχυσης των μεταγραφικών ρυθμιστών. Για παράδειγμα η CREB (CRE-δεσμευτική πρωτεΐνη), είναι μέρος ενός μονοπατιού σήματος στο οποίο η αύξηση στο cAMP οδηγεί στην ενεργοποίηση των CRE-περιλαμβανομένων γονιδίων. Αυξανόμενο cAMP ενεργοποιεί την PKA η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την CREB στη Ser

133. Αυτή η περίπτωση φωσφορυλίωσης υποκινεί την αλληλεπίδραση της CREB με την CBP, οδηγώντας σε αυξανόμενη μεταγραφική δραστηριότητα της CREB. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση φαίνεται να διαδραματίζει και έναν ρυθμιστικό ρόλο στη σταθεροποίηση των διαφόρων πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων. Για παράδειγμα, οι STAT μεταγραφικοί παράγοντες είναι φωσφορυλιωμένοι από την JAK κινάση σε απάντηση στη γ-ιντερφερόνη και σαν ένα αποτέλεσμα αυτοί μετατοπίζονται στον πυρήνα, ενεργοποιούν τη μεταγραφή, και έπειτα απενεργοποιούνται σύντομα μέσω της ουβικιτινίωσης και της αποικοδόμησης του πρωτεασώματος^[146].

Αν και οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών είναι μια οικογένεια των πρόσδεμα-ενεργοποιημένων υποδοχέων, είναι επίσης φωσφοπρωτεΐνες και οι λειτουργίες τους ρυθμίζονται από την φωσφορυλίωση. Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών είναι όλοι φωσφορυλιωμένοι σε υπολείμματα σερίνης, ενώ ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) και ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER) είναι φωσφορυλιωμένος επιπρόσθετα σε υπολείμματα θρεονίνης και τυροσίνης αντίστοιχα.

Η φωσφορυλίωση των πυρηνικών υποδοχέων αφορά και στις τρεις σημαντικές περιοχές, τη λειτουργία της N-τελικής ενεργοποίησης (AF-1), τη πρόσδεμα-δεσμευτική και τις DNA δεσμευτικές περιοχές και η πλειοψηφία των φωσφορυλιωμένων υπολειμμάτων τους βρίσκεται μέσα στην N-τελική περιοχή A/B. Η N-τελική περιοχή A/B των πυρηνικών υποδοχέων είναι ιδιαίτερα μεταβλητή στην ακολουθία και στο μήκος. Περιέχει άλλη μια περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης αποκαλούμενη AF-1 που μπορεί να ενεργήσει αυτόνομα και πρόσδεμα-ανεξάρτητα. Το ενδιαφέρον χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτής της AF-1 περιοχής είναι ότι περιέχει πολλές συναινετικές περιοχές φωσφορυλίωσης και είναι επομένως, ο στόχος των πολλαπλών κινάσων. Οι πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει, ότι μπορεί να αλληλεπιδράσει με συνρρυθμιστές, μερικοί από τους οποίους οδηγούν στο γεφύρωμα των AF-1 και -2 περιοχών, οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν τη σύμπραξη μεταξύ των δύο AFs. Οι περισσότερες από τις θέσεις που εντοπίζονται στην N-τελική περιοχή A/B των πυρηνικών υποδοχέων είναι υπολείμματα σερίνης που περιβάλλονται από προλίνες και επομένως αντιστοιχούν στις συναινετικές θέσεις για προλίνη εξαρτώμενες κινάσες, οι οποίες περιλαμβάνουν τις κυκλίνη-εξαρτώμενες κινάσες (CDKs) και τις μιτογόνο-ενεργοποιημένες πρωτεϊνικές κινάσες (MAPKs). Μεταξύ αυτών των θέσεων,

πολλές είναι φωσφορυλιωμένες από CDKs, είτε "ιδιοσυστατικά" (δηλ.ελλείψει του προσδέματος) είτε σε απάντηση στην ορμόνη, ενώ άλλες μπορούν να είναι φωσφορυλιωμένες ανεξάρτητα από την ορμόνη, από τις MARKs σε απάντηση σε μια ποικιλία σημάτων ^[152]. Οι CDKs και MAPKs φωσφορυλιώνουν τους περισσότερους στεροειδείς υποδοχείς in vitro και προτείνεται ότι αυτές επηρεάζουν τη λειτουργία του υποδοχέα in vivo ^[146]. Επιπλέον, η N-τελική περιοχή A/B περιέχει επίσης συναινετικές θέσεις φωσφορυλίωσης για την αποκαλούμενη κινάση Akt ή PKB. Η ενεργοποίηση αυτής της κινάσης, που διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, περιλαμβάνει 3V-φωσφορυλιωμένα φωσφοινοσιτίδια που παράγονται κατά την ενεργοποίηση του μονοπατιού της φωσφοινοσιτόλης 3-κινάσης (PI3K). Η ενεργοποιημένη Akt ρυθμίζει αρνητικά μια ποικιλία από κατάρρους κινάσες και κατά τη μετατόπιση στον πυρήνα φωσφορυλιώνει ορισμένους πυρηνικούς υποδοχείς όπως τον ERα και τον AR στην N-τελική τους περιοχή A/B.

Εκτός από την N-τελική περιοχή, η LBD των πυρηνικών υποδοχέων είναι επίσης ένας στόχος για τις πρόσδεμα-ανεξάρτητες διαδικασίες φωσφορυλίωσης. Η φωσφορυλίωση αυτής της περιοχής μπορεί να περιλάβει τις ίδιες προλίνη-εξαρτώμενες κινάσες όπως τις παραπάνω, αλλά μπορεί να περιλάβει και άλλες κινάσες όπως οι κινάσες τυροσίνης για τον ERα και τον RXRa ή PKA για τους RARs. Τέλος, οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορεί να είναι φωσφορυλιωμένοι στην DBD τους. Η φωσφορυλίωση αυτής της περιοχής περιλαμβάνει είτε την PKA στην περίπτωση του Era είτε την PKC για τον RARαα και τον VDR ^[152].

1.6.6.1 Φωσφορυλίωση του GR- Εντοπισμός Φωσφορυλιωμένων θέσεων του GR

Τα πρώτα στοιχεία ότι ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών είναι μια φωσφοπρωτεΐνη προήλθαν από τα πειράματα των Housley και Pratt (1983) σε ινοβλάστες L ποντικών που δείχνουν ότι ο πρωτεϊνικός υποδοχέας μπορούσε να σημανθεί in vivo με ³²P, και όπου προσδιορίζονται δύο φωσφοπρωτεΐνες (μία κύρια και μία δευτερεύουσα, 92 kDa και 100 kDa αντίστοιχα), οι οποίες δεσμεύουν με υψηλή συγγένεια γλυκοκορτικοειδή κατά έναν στερεοειδικό τρόπο. Το 1984, οι Kurl και Jakob παρήχαν τις άμεσες αποδείξεις για την φωσφορυλίωση του GR και έδειξαν ότι η επώαση ενός καθαρισμένου παρασκευάσματος του GR από το κυτοσόλιο

συκωτιού αρουραίου με $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ και Mg^{2+} οδήγησε στη μεταφορά του ραδιενεργού φωσφορικού άλατος στον πρωτεϊνικό υποδοχέα. Περαιτέρω μελέτες, σε άθικτους επίμυες επιβεβαίωσαν την *in vivo* φωσφορυλίωση των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών, δεδομένου ότι ο ^{32}P συν-μεταναστεύει με το ^3H -σημασμένο πρόσδεμα του υποδοχέα μετά από την έγχυση του ^{32}P και τον καθαρισμό των υποδοχέων [153, 154]. Ο προσδιορισμός και η κλωνοποίηση των cDNAs GR ποντικού και αρουραίου [155, 156] σε συνδυασμό με την χαρτογράφηση φωσφοπεπτιδίων της πρωτεΐνης του υποδοχέα, επέτρεψαν μια πιο λεπτομερή ανάλυση της φωσφορυλίωσης του GR. Η ανάλυση φωσφοαμινοξέων σε ινοβλάστες L ποντικών και σε άλλα κύτταρα [157] αποκάλυψε ότι η στεροειδής-δεσμευτική πρωτεΐνη είναι φωσφορυλιωμένη σε υπολείμματα σερίνης. Τα αποτελέσματα των Hoeck και Groner (1990) με κύτταρα ηπατώματος επίμυα και οι παρατηρήσεις των Bodwell και συνεργατών (1991) με τα κύτταρα θυμώματος ποντικών και τα κινεζικά κύτταρα ωοθηκών χάμστερ (CHO) με υπερεκφρασμένους υποδοχείς έδειξαν ότι εμφανίζεται και μια δευτερεύουσα φωσφορυλίωση στη θρεονίνη, ενώ έχει αναφερθεί να είναι παρόντα μικρά ποσά φωσφοτυροσίνης στον υποδοχέα από τα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα μαστού και έχει υποστηριχτεί ότι ο υποδοχέας μπορεί να ανοσοκατακρημνιστεί με αντισώματα αντιφωσφοτυροσίνης.

Κατά την περιορισμένη πρωτεόλυση του υποδοχέα, έχουν χαρτογραφηθεί οι φωσφορυλιωμένες θέσεις στις λειτουργικές περιοχές. Οι περισσότερες εμφανίστηκαν να είναι στην N-τελική περιοχή. Ένα δευτερεύων κλάσμα από την ^{32}P σήμανση συνδέθηκε με τα χυμοθρυπτικά θραύσματα που περιέχουν τη DNA-δεσμευτική περιοχή στους υποδοχείς από τους ινοβλάστες L και τα κύτταρα ηπατώματος και τη στεροειδή-δεσμευτική περιοχή στους υποδοχείς από τα WEHI-κύτταρα. Αργότερα, σε μια ξεχωριστή μελέτη, η ραδιενέργεια που συνδέθηκε με το DNA-δεσμευτικό θραύσμα αποδόθηκε σε μια πρόσμιξη παρόμοιας μοριακής μάζας, ενώ διαπιστώθηκε ότι ένα ιδιαίτερα καθαρισμένο θραύσμα θρυψίνης που περιέχει τη στεροειδή-δεσμευτική περιοχή δεν ήταν φωσφορυλιωμένο [157].

Το 1991, οι Bodwell και συνεργάτες κατά την χαρτογράφηση φωσφοπεπτιδίων και τον προσδιορισμό αλληλουχίας των πεπτιδίων θρυψίνης από τον ^{32}P -σημασμένο υποδοχέα, έδειξαν ότι ο GR στο ποντίκι είναι φωσφορυλιωμένος σε επτά θέσεις. Αυτές οι θέσεις εμφανίζονται να είναι σχεδόν ίδιες, σε σχέση και με τον εντοπισμό

και με τα σχετικά επίπεδα φωσφορυλίωσης, στα κύτταρα ωοθηκών κινέζικου χάμστερ (Wcl2) στα οποία ο υποδοχέας ήταν υπερεκφρασμένος και σε κύτταρα θυμώματος ποντικών-WEHl όπου ο ενδογενής υποδοχέας εκφράζεται κανονικά ^[158]. Κατά συνέπεια η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων υποδοχέων, φαίνεται να είναι σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητη από το κύτταρο στο οποίο εκφράζεται, υποδηλώνοντας ότι η φωσφορυλίωση είναι μια ουσιαστική-εσωτερική-ιδιότητα του πρωτεϊνικού υποδοχέα ^[159].

Όπως παρουσιάζονται οι θέσεις και οι αμινοξικές ομάδες των φωσφορυλιωμένων θέσεων του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στον άνθρωπο GR (hGR), στον επίμυα (rGR), σε ηπατοκύτταρα και σε ζυμομύκητα, και στο ποντίκι (mGR), όλες αυτές οι θέσεις είναι στην N-τελική περιοχή και όλες είναι σε σερίνες εκτός από αυτήν στη θρεονίνη 159. Ειδικότερα, οι σερίνες 122, 150, 212, 220 και 234 (στον επίμυα) και οι ακολουθίες που τις περιβάλλουν είναι συντηρημένες στις "ομόλογες" (αντίστοιχες) περιοχές του αρουραίου και του ανθρώπινου υποδοχέα, αλλά η θρεονίνη 159 και η σερίνη 315 δεν έχουν καμία ομόλογη στον ανθρώπινο υποδοχέα. Όλες εκτός από τη σερίνη 315 είναι μέσα στις περιοχές trans-ενεργοποίησης που προσδιορίζονται στους υποδοχείς ανθρώπων ή επίμυων ^[160, 161]. Οι περισσότερες από τις επτά θέσεις φωσφορυλίωσης που έχουν προσδιοριστεί στον GR ποντικίου εντοπίζονται στην τ-1 περιοχή.

Πέντε από αυτές τις θέσεις φωσφορυλίωσης συντηρούνται στον hGR ^[162], και όλες είναι σερίνες στις θέσεις 113, 141, 203, 211 και 226. Αυτά τα υπολείμματα σερίνης στην αμινο-τελική περιοχή του ανθρώπινου GR είναι οι κυρίαρχες θέσεις φωσφορυλίωσης όταν ο υποδοχέας εκφράζεται εκτοπικά στο ζυμομύκητα, αφού ο μεταλλαγμένος ανθρώπινος GR που στερείται και τις πέντε θέσεις (S131, S141, S203, S211, S226) παρουσιάζει σοβαρή μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης.

1.6.7. Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης του GR στη λειτουργία του Υποδοχέα.

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών είναι συστατικά φωσφορυλιωμένος κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αλλά υφίσταται και μια αγωνιστή-προκληθείσα (αλλά όχι ενός ανταγωνιστή) του κυτταρικού κύκλου εξαρτώμενη υπερφωσφορυλίωση ^[99]. Η

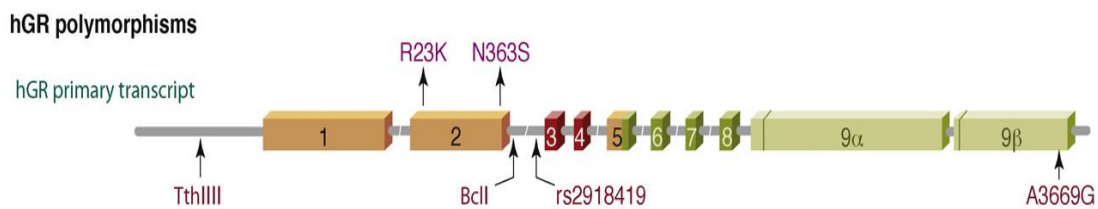
δραστηριότητα του υποδοχέα, υποκινείται από τους παράγοντες που ενεργοποιούν τα μονοπάτια της πρωτεϊνικής κινάσης A και πρωτεϊνικής κινάσης C, ωστόσο αυτή η ενεργοποίηση δεν συνοδεύεται από αλλαγές στη φωσφορυλίωση του GR ^[163]. Επιπλέον, αν και συγκεκριμένα υπολείμματα φωσφορυλιώνονται παρουσία των αγωνιστών, το συνολικό φορτίο του φωσφορυλιωμένου GR δεν αλλάζει όπως παρουσιάζεται από την ανάλυση ισοηλεκτρικής εστίασης μη ισορροπίας, υποδηλώνοντας ότι οι ετερογενείς φωσφορυλιωμένες μορφές του GR συνυπάρχουν στο κύτταρο ^[164, 165]. Ο φωσφορυλιωμένος hGR μετατοπίζεται στη συνέχεια στον πυρήνα, αν και η φωσφορυλίωση των υποδοχέων φαίνεται ότι δεν είναι απαραίτητη για την πυρηνική μετατόπιση δεδομένου ότι, ένας mGR (GR ποντικού) που στερείται όλες τις θέσεις φωσφορυλίωσης υποβάλλεται ακόμα στην πυρηνική μετατόπιση μετά την ενεργοποίηση από το προσδεδεμένο μόριο ^[162].

Η φωσφορυλίωση των στεροειδών υποδοχέων συμπεριλαμβανομένου του GR, όπως αναφέρθηκε, επηρεάζεται από την προσθήκη του προσδέματος και αυτή έχει επιπτώσεις σε διάφορες λειτουργίες του υποδοχέα όπως στην πυρηνο-κυτταροπλασματική παλίνδρομη κίνηση, στη μεταγραφική ενίσχυση και στη σταθερότητα του υποδοχέα.

Η φωσφορυλίωση του GR μπορεί επίσης να έχει επιπτώσεις στη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Οι μελέτες από τους Jewell και συνεργάτες (1995) έχουν προτείνει ότι η φωσφορυλίωση μπορεί να έχει επιπτώσεις στη σταθερότητα του GR και να μεταβάλλει έτσι τη δραστηριότητα του υποδοχέα. Πιο πρόσφατες μελέτες, έδειξαν ότι στα κύτταρα COS-1, ο υπερεκφρασμένος φωσφορυλιωμένος mGR ποντικού είχε παρουσία του αγωνιστή μια ημιζωή 8-9 ώρες ^[147], ωστόσο η μεταλλαγή των πολλαπλών θέσεων φωσφορυλίωσης αύξησε την ημιζωή του σε 32 ώρες. Κατά συνέπεια, η φωσφορυλίωση του GR μειώνει την ημιζωή της πρωτεΐνης με την προώθηση μιας γρήγορης ανακύκλωσης ^[166, 167]. Συνοψίζοντας, από τα παραπάνω στοιχεία, ότι η ρύθμιση της λειτουργίας του GR μέσω των συγκεκριμένων γεγονότων φωσφορυλίωσης εμφανίζεται να είναι αρκετά σύνθετη.

Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι επικρατούν οι παρακάτω πολυμορφισμοί του GR γονιδίου οι οποίοι εναλλάσσουν την ευαισθησία του GR in vivo καθώς επίσης

υπάρχει το ενδεχόμενο να έχουν επιπτώσεις στη πορεία της ΣΚΠ νόσου (**Εικόνα 1.7.1**).



Εικόνα 1.7.1: Πολυμορφισμοί του hGR γονιδίου [168]

O N363S (rs6195), είναι μια σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 363 στο εξώνιο 2. Είναι εξαιρετικά σπάνια στον φυσιολογικό πληθυσμό, περίπου 4% και βρίσκεται στο κομμάτι του γονιδίου το οποίο κωδικοποιείται για την περιοχή trans-ενεργοποίησης

Έχει συσχετιστεί με αλλαγές στα GC καθώς παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία in vivo στους υγιείς μάρτυρες όπως μετρήθηκε στη δοκιμή καταστολής της δεξαμεθαζόνης (dexamethasone suppression test –DST) [169, 170] καταλήγοντας σε σημαντική αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας των γλυκοκορτικοειδών-αποκριτικών γονιδίων αλλά και στην in vitro ευαισθησία [169, 171]. Ωστόσο, δεν επηρεάζει την μεταγραφική καταστολή. Σχετίζεται με υψηλότερη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή in vivo, την αυξανόμενη ινσουλινοαπόκριση στην εξωγενή χορήγηση δεξαμεθαζόνης, την μεγαλύτερη BMI, την μεγαλύτερη περιφέρεια μέσης και ισχύου και μια τάση προς χαμηλότερη οστική πυκνότητα στα δοκιδωδη οστά. Η N363S παραλλαγή σχετίζεται επίσης με αύξηση της κορτιζόλης και της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων και υψηλότερη επίπτωση της νόσου στεφανιαίας αρτηρίας ανεξάρτητα από το βάρος. Ο μοριακός μηχανισμός μέσα από τον οποίον ο N363S πολυμορφισμός ασκεί τις επιδράσεις του δεν είναι ακόμα

γνωστός. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι αυτός ο πολυμορφισμός συμβάλλει σε ένα νέο κατάλοιπο σερίνης για την φωσφορυλίωση, καθώς οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με τους μεταγραφικούς συμπαράγοντες μπορεί να τροποποιηθούν. [168, 169, 172].

Οι ER22/23EK πολυμορφισμοί οι οποίοι συμβαίνουν στο περίπου 3% του πληθυσμού είναι δύο συνδεδεμένες σημειακές μεταλλάξεις οι οποίες διαχωρίζονται από ένα ζεύγος βάσεων στα κωδικόνια 22 και 23 στο εξώνιο 2 του GR γονιδίου (Koper και συν 1997). Αυτοί οι πολυμορφισμοί βρίσκονται στις θέσεις 198 και 200 του cDNA. Η πρώτη μετάλλαξη είναι σιωπηλή αλλάζοντας το κωδικόνιο 22 από GAG σε GAA, και τα δύο κωδικοποιούν για το γλουταμινικό οξύ (E). Η δεύτερη μετάλλαξη αλλάζει το AGG σε AAG μέσα στην N-τελική περιοχή (αλλαγή αργινίνης σε λυσίνη-R23K) (Koper et al., 1997). Σχετίζονται με αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα στις διάφορες αναλύσεις που έχουν γίνει και αυξημένη έκφραση των ενδογενών γονιδίων όταν συγκρίνονται με τον άγριο τύπου GR (WT GR).

Ο ER22/23EK πολυμορφισμός καταλήγει σε μια σημαντική μείωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης των γλυκοκορτικο-ανταποκρινόμενων γονιδίων που συγκρίνονται με τον άγριο τύπο υποδοχέα αλλά δεν επηρεάζει την μεταγραφική καταστολή. Αυτός ο πολυμορφισμός μειώνει την ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή όπως αποδεικνύεται από το υψηλότερο επίπεδο της κορτιζόλης στον ορό και την μικρότερη μείωση της συγκέντρωσης της κορτιζόλης μετά τη δοκιμή καταστολής της δεξαμεθαζόνης σε φορείς και μη φορείς του πολυμορφισμού, καταλήγοντας σε έναν φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από ένα πιο ευνοϊκό μεταβολικό προφίλ οδηγώντας σε μακροζωία.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει μια σύνδεση μεταξύ των ER22/23EK και της σχετικής αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή καθώς και πιο πρόσφατα οι Russcher και συνεργάτες αποκάλυψαν ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον ER22/23EK πολυμορφισμό και στην αύξηση της αναλογίας από GRa-A σε GRa-B. Όταν συγκρίνεται με τον άγριο τύπου GR, ο ER22/23EK πολυμορφισμός διευκολύνει την έκφραση του GRa-A αλλά δεν έχει καμία επίδραση στην έκφραση του GRa-B. Επειδή μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο GRa-A είναι λιγότερο μεταγραφικά ενεργός από τον GRa-B έχει υποτεθεί ότι η μη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή σε άτομα που φέρουν τον ER22/23EK πολυμορφισμό οφείλεται στα μειωμένα επίπεδα του GRa-B. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι οι ενήλικοι φορείς του ER22/23EK έχουν χαμηλότερη τάση να εμφανίσουν εξασθενημένη ανοχή στη γλυκόζη, στον διαβήτη τύπου 2 και στις καρδιαγγειακές ασθένειες.

Οι φορείς του ER22/23EK πολυμορφισμού εμφανίζουν σχετική αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή, χαμηλότερες συγκεντρώσεις ινσουλίνης μετά από νηστεία, βελτιωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη καθώς και χαμηλότερες συνολικές

συγκεντρώσεις χοληστερόλης και LDL. Αυτές οι επιδράσεις του ER22/23EK πολυμορφισμού δείχνουν ένα υγιές προφίλ μεταβολικού και καρδιαγγειακού νόσου, όπως προαναφέρθηκε, το οποίο επιβεβαιώθηκε από μελέτες που ακολούθησαν ^[169, 173] οι οποίες έδειξαν ότι οι φορείς παρουσιάζουν καλύτερα ποσοστά επιβίωσης μέσα σε μια τετραετία σε σύγκριση με τους μη φορείς. Σε νεαρές ηλικίες έχει τεκμηριωθεί ένα σεξουαλικό διμορφικό μοτίβο της σύνθεσης του σώματος. Οι άντρες φορείς είναι ψιλότεροι, έχουν μεγαλύτερη μάζα σώματος και είναι πιο δυνατοί από τους μη φορείς. Οι γυναίκες φορείς έχουν μικρότερη μέση, περίμετρο ισχίου και μικρότερη μάζα σώματος. Τέλος, φορείς μεγαλύτερων ηλικιών παρουσιάζουν χαμηλότερο κίνδυνο να εμφανίσουν άνοια και λιγότερες βλάβες της λευκής ουσίας στον εγκέφαλο σε σύγκριση με τους μη φορείς. Ο μοριακός μηχανισμός μέσα από τον οποίο ο ER22/23EK πολυμορφισμός προξενεί τις παραπάνω δράσεις είναι πιθανό να περιλαμβάνει υψηλότερη έκφραση του hGRa-A ισομόρφου (94 kDa) από το hGRa-B (91 kDa). Με βάση αυτό η δεύτερη ισομορφή έχει μεγαλύτερες δραστηριότητες trans-ενεργοποίησης και η μετατόπιση από την έκφραση της hGRa-A ισομορφής στην hGRa-B ισομορφή οδηγεί στην συνολική μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας ^[168, 169, 172].

Ο πολυμορφισμός, Bcl I ^[174], έχει πρόσφατα προσδιοριστεί ως μια αντικατάσταση του TGATCA σε TGATGA στο ιντρόνιο 2 και βρίσκεται 646 ζεύγη βάσεων κατάρρους από το εξώνιο 2 ^[175] ενώ παρατηρείται στο περίπου 37% του πληθυσμού. Οι υγιείς άντρες που είναι ομόζυγοι για το G αλληλόμορφο έχουν υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης μετά από γεύμα σε σύγκριση με τους άντρες που είναι ομόζυγοι για το C αλληλόμορφο ^[176]. Σε μια μεγάλη ομάδα ηλικιωμένων Ολλανδών η οποία σχετιζόταν με το G αλληλόμορφο βρέθηκαν χαμηλότερα επίπεδα κορτιζόλης μετά τη δοκιμή καταστολής της δεξαμεθαζόνης όπως επίσης παρατηρήθηκε και μια τάση μείωσης της κορτιζόλης στα άτομα με μικρή μάζα σώματος. Και στις δύο κατηγορίες παρατηρήθηκε υπερευαισθησία στα GC ^[169, 175]. Επίσης, σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή, την υπέρταση και την σπλαχνική παχυσαρκία. Στους ηλικιωμένους, το G αλληλόμορφο του Bcl I πολυμορφισμού σχετίζεται με χαμηλότερο BMI (μάζα σώματος) και μια τάση προς άλιπη μάζα σώματος, η οποία είναι πιθανό να προέρχεται από την αύξηση της ευαισθησίας στα γλυκοκορτικοειδή.

Πρόσφατα αυτός ο πολυμορφισμός, έχει συσχετιστεί με τη νόσο Crohn, μια άλλη φλεγμονώδη ασθένεια. Παρά το γεγονός όμως ότι και το Bcl I και ο ER22/23EK

πολυμορφισμός σχετίζονται με την αυξημένη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή δε θεωρούνται να έχουν θεραπευτικές ιδιότητες στα άτομα που υπόκεινται σε συστηματική θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή και πάσχουν από αιματολογικές κακοήθειες ^[168]. Τέλος, άτομα που είναι φορείς και για τους δύο αυτούς πολυμορφισμούς εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα χοληστερόλης και πίεση αίματος.

Ο TthIII πολυμορφισμός βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή του hGR γονιδίου 3807 ζεύγη βάσεων αντίθετα από την θέση έναρξης της μεταγραφής και δεν είναι λειτουργικός από μόνος του. Ωστόσο, η ER22/23EK παραλλαγή έχει βρεθεί να σχετίζεται μόνιμα με τον TthIII πολυμορφισμό. Επομένως, περιπτώσεις που παρατηρούνται στους φορείς αυτού του πολυμορφισμού και που σχετίζονται με την ανοχή στα γλυκοκορτικοειδή και ένα υγιές μεταβολικό προφίλ είναι πιθανό να προέρχονται ως αποτέλεσμα του ER22/23EK πολυμορφισμού ^[148, 172].

Ο πολυμορφισμός A3669G ο οποίος αλλάζει το A με το G στο νουκλεοσίδιο 3669 και βρίσκεται στη 3`μη μεταγραφόμενη περιοχή του εξωνίου 9β καταλήγει σε αυξημένη σταθερότητα του GRβ mRNA και βελτίωση της έκφρασης της GRβ πρωτεΐνης. Αυτός ο πολυμορφισμός δεν αλλάζει την αλληλουχία αμινοξέων αλλά αυξάνει την σταθερότητα του hGRβ mRNA και την hGRβ πρωτεϊνική έκφραση οδηγώντας σε μεγαλύτερη αναστολή της επαγόμενης hGRα μεταγραφικής δραστηριότητας και αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή. Η παρουσία του A3669G αλληλόμορφου σχετίζεται με μειωμένη κεντρική παχυσαρκία και ένα πιο ευνοϊκό λιπιδαιμικό προφίλ στα επηρεαζόμενα άτομα. Επιπρόσθετα, επιλεκτικά μολύνει την δραστηριότητα μετακαταστολής του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και συνδέεται με αυξημένη φλεγμονώδη κατάσταση, ρευματοειδή αρθρίτιδα και καρδιαγγειακή νόσο.

Έχει διερευνηθεί ότι περίπου το 27,6% του Ευρωπαϊκού πληθυσμού είναι ετερόζυγο για τον πολυμορφισμό A3669G και αυτό έχει συσχετιστεί με μειωμένη ένδειξη συχνότητας εμφάνισης κεντρικής παχυσαρκίας στις γυναίκες και ταυτόχρονη συνολική μείωση της χοληστερόλης με την αύξηση της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας στους άντρες. Αυτή η παρατήρηση είναι αμφιλεγόμενη γιατί δεν έχει αναφερθεί σε άλλες παρόμοιες μελέτες που έγιναν ή δεν παρατηρήθηκε σε φορείς από την Νότια Αφρική. Συνεπώς, ο πολυμορφισμός A3669G μπορεί να μην είναι μια αξιόπιστη ένδειξη για τα μεταβολικά προφίλ ανάμεσα στα διάφορα έθνη.

Επιπλέον, σχετίζεται με μειωμένη ανοσοκαταστολή. Για παράδειγμα, οι φορείς του A3669G πολυμορφισμού παρουσιάζουν υψηλότερο κίνδυνο να εμφανίσουν ρευματοειδή αρθρίτιδα (αυτοάνοση ασθένεια) ενώ μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης *S.aureus*. Σε πιο πρόσφατες μελέτες οι ομόζυγοι φορείς σχετίζονται με έναν προ-φλεγμονώδη φαινότυπο και τη στεφανιαία νόσο με αποτέλεσμα ο A3669G πολυμορφισμός να είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου για τη νόσο ^[148, 172].

. **Ο 9β πολυμορφισμός**, μια αλλαγή αδερίνης σε γουανίνη (A→G) βρίσκεται στην GRβ περιοχή του GR γονιδίου. Πληροφορίες *in vitro* δείχνουν ότι το G αλληλόμορφο αυτού του πολυμορφισμού οδηγεί σε πιο σταθερό GRβ mRNA και αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης του υποδοχέα της GRβ ισομορφής. Αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης της GRβ ισομορφής έχει συσχετιστεί με την αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή σε φλεγμονώδεις ασθένειες. Υψηλότερη συχνότητα του 9β πολυμορφισμού βρέθηκε σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Πρόσφατα, έχουν κατασκευαστεί απλότυποι από τους πολυμορφισμούς του GR γονιδίου για να προσδιορίσουν τη σχέση μεταξύ φαινοτυπικών αλλαγών και συγκεκριμένων αλληλόμορφων κινδύνου ^[172].

Σε μια πληθυσμιακή μελέτη βασισμένη στη βορειοανατολική Αγγλία, ετεροζυγώτες για έναν άλλον πολυμορφισμό εντός του ιντρονίου 2, **rs2918419 (T>C)** εντοπίστηκαν στο 25,8% των ατόμων (**Εικόνα 1.7.1**). Τα άτομα με την παραλλαγή rs2918419 είχαν επίσης αλληλία παραλλαγής στον τόπο Bcll, και ο διπλός πολυμορφισμός σχετίζεται με αντίσταση στην ινσουλίνη σε άνδρες, αλλά όχι στις γυναίκες ^[177]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι η βλαπτική επίδραση του Bcll πολυμορφισμού δεν παρατηρήθηκε απουσία του rs2918419. Κάτι αντίστοιχο έχει παρατηρηθεί και με τον Tthlll πολυμορφισμό ο οποίος σχετίζεται με την αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή και με ένα υγιές μεταβολικό προφίλ μόνο παρουσία του ER22/23EK πολυμορφισμού ^[168, 178, 179].

Επιπλέον, αρκετές μεταλλάξεις του GR γονιδίου έχουν ενοχοποιηθεί για γενικευμένη αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή (Primary Generalized Glucocorticoid Resistance-PGGR) οδηγώντας σε αντισταθμιστική ενεργοποίηση του άξονα

υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA) και υπερέκκριση της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH) στη συστηματική κυκλοφορία αλλά και για γενικευμένη υπερευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή (Primary Generalized Glucocorticoid Hypersensitivity-PGGH) που χαρακτηρίζεται από αντισταθμιστική

υπολειτουργία του άξονα. Οι μοριακοί μηχανισμοί που έχουν αποκαλυφθεί στις περιπτώσεις με PGGR ή PGGH μέχρι σήμερα καθώς και οι κλινικές εκδηλώσεις σε αυτές τις περιπτώσεις συνοψίζονται στον **πίνακα 1.7.1**.

Πίνακας 1.7.1: Μεταλλάξεις του hGR γονιδίου που προκαλούν PGGR ή PGGH

Author (Reference)	Mutation position		Molecular Mechanisms	Genotype	Phenotype
	cDNA phenotype	Amino acid			
Chrousos <i>et al.</i> [180]	1922 (A→T)	641 (D→V)	Transactivation ↓	homozygous	hypertension
Hurley <i>et al.</i> [181]			Affinity for ligand ↓ (x 3)		hypokalemic alkalosis
			Alkalosis		
			Nuclear translocation: 22 min		
			Abnormal interaction with GRIP1		
Karl <i>et al.</i> . [182]	4 bp deletion in exon-intron 6		hGRαnumber: 50% of control	heterozygous	hirsutism
			Inactivation of the affected allele		male pattern hair loss menstrual irregularities
Malchoff <i>et al.</i> [183]	2185 (G→A)	729(V→I)	Transactivation ↓	homozygous	precocious puberty
			Affinity for ligand ↓ (x 2)		hyperandrogenism
			Nuclear translocation: 120 min		
Malchoff <i>et al.</i> [183]	2185 (G→A)	729(V→I)	Abnormal interaction with GRIP1		
Karl <i>et al.</i> [184]	1676 (T→A)	559(I→N)	Transactivation ↓	heterozygous	hypertension
Kino <i>et al.</i> [185]			Decrease in hGR binding sites		oligospermia
			Transdominance (+)		infertility
			Nuclear translocation: 180		
			Abnormal interaction with GRIP1		
Ruiz <i>et al.</i> [186]	1430 (G→A)	477(R→H)	Transactivation ↓	heterozygous	hirsutism
Charmandari <i>et al.</i> [187]			No DNA binding		fatigue
			Nuclear translocation: 20 min		hypertension
Ruiz <i>et al.</i> [186]	2035 (G→A)	679(G→S)	Transactivation ↓	heterozygous	hirsutism

Author (Reference)	Mutation position		Molecular Mechanisms	Genotype	Phenotype
	cDNA phenotype	Amino acid			
Charmandari <i>et al.</i> [187]			Affinity for ligand ↓ (x 2)		fatigue
			Nuclear translocation: 30 min		hypertension
			Abnormal interaction with GRIP1		
Mendonca <i>et al.</i> [188]	1712 (T→C)	571(V→A)	Transactivation ↓	homozygous	ambiguous genitalia
			Affinity for ligand ↓ (x 6)		hypertension
			Nuclear translocation: 25 min		hypokalemia
			Abnormal interaction with GRIP1		hyperandrogenism
Vottero <i>et al.</i> [189]	2241 (T→G)	747(I→M)	Transactivation ↓	heterozygous	cystic acne
			Transdominance (+)		hirsutism
			Affinity for ligand ↓ (x 2)		oligo-amenorrhea
Vottero <i>et al.</i> [189]	2241 (T→G)	747(I→M)	Nuclear translocation ↓		
			Abnormal interaction with GRIP1		
Charmandari <i>et al.</i> [190]	2318 (T→C)	773 (L→P)	Transactivation ↓	heterozygous	fatigue
			Transdominance (+)		anxiety
			Nuclear translocation: 30 min		hirsutism
			Abnormal interaction with GRIP1		hypertension
Charmandari <i>et al.</i> [190]	2209 (T→C)	737 (F→L)	Transactivation ↓	heterozygous	hypertension
			Transdominance/time-dependent (+)		

1.7.1. Περιφερική και Κεντρική αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή

Η αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να ταξινομηθεί σε τέσσερις σημαντικές υποκατηγορίες συμπεριλαμβανομένου τη γενικευμένη κληρονομημένη αντίσταση

στα γλυκοκορτικοειδή, τη φαρμακολογικά προκληθείσα αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή, την επίκτητη ή ιστο-ειδική αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή, και τη φυσιολογική αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή συμπεριλαμβανομένων των γενετικών παραλλαγών στην ευαισθησία. Είναι γνωστό εδώ και πολλά έτη ότι μέσα στο φυσιολογικό πληθυσμό υπάρχει ευρεία μεταβλητότητα στην ευαισθησία στις γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες. Αυτή η μεταβλητότητα απεικονίζεται στο ευρύ φάσμα των απαντήσεων στην ίδια σχετική δόση των εξωγενών γλυκοκορτικοειδών που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία των διάφορων ασθενειών. Αρκετές μελέτες καταδεικνύουν ότι πρωτοπαθείς ή κληρονομικές ανωμαλίες στο γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών κάνουν ένα ποσοστό 6.6% του κανονικού πληθυσμού σχετικά υπερευαίσθητο στα γλυκοκορτικοειδή, ενώ ένα ποσοστό 2.3% είναι σχετικά ανθεκτικό. Αυτή η μεταβλητότητα βοηθά να εξηγήσει γιατί μερικά άτομα αναπτύσσουν τα σοβαρά δυσμενή αποτελέσματα κατά τη διάρκεια ορμονικής θεραπείας με μια χαμηλή δόση των γλυκοκορτικοειδών, όμως άλλες δεν αναπτύσσουν παρενέργειες ακόμη και κατά τη διάρκεια της μακροχρόνιας θεραπείας με μια πολύ υψηλότερη δόση των γλυκοκορτικοειδών.

Στις πρωτοπαθείς ή κληρονομικές ανωμαλίες, οι μεταλλαγές στο γονίδιο του GR έχει δείχτεί ότι καθιστούν τα άτομα ανθεκτικά ή υπερευαίσθητα στο σύστημα ανατροφοδότησης του HPA άξονα με συνθετικά γλυκοκορτικοειδή όπως η δεξαμεθαζόνη.

Τα συμπτώματα που συνδέονται με την αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) είναι συνέπεια της υπερδιέγερσης λόγω της σύνθεσης και την έκκρισης της ACTH από τον πρόσθιο βλεννογόνο αδένα. Η ανυψωμένη έκκριση της ACTH στη συνέχεια υποκινεί την αυξανόμενη παραγωγή των αδρενοκορτικοειδών και των αλατοκορτικοειδών ^[27].

Στα σύνδρομα που εμφανίζουν αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή (χαρακτηρισμένα από κόπωση, ήπια υπέρταση, αρρενοποίηση της γυναίκας, πρόωμη ήβη και παθολογική σπερματογένεση στον άνδρα), έχουν αναφερθεί αρκετές διαφορετικές ατέλειες του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών συμπεριλαμβανομένου της ελάττωσης του αριθμού των υποδοχέων, της ελάττωσης της συγγένειας, της θερμοαστάθειας, και σε μερικά περιστατικά ανωμαλίες στην γονιδιακή αλληλουχία του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Σ' αυτούς τους ασθενείς, η ικανοποιητική, αντισταθμιστική ενίσχυση στην έκκριση της ACTH αυξάνει τις συγκεντρώσεις της κορτιζόλης αλλά όπως αναφέρθηκε, οδηγεί επίσης στην ανύψωση της παραγωγής

των αλατοκορτικοειδών που συντίθεται κατά τη διάρκεια της γένεσης των στεροειδών καθώς επίσης και μια αυξημένη έκκριση των ανδρογόνων ορμονών. Τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν επίσης έναν θεμελιώδη ρόλο στην αναχαίτιση των φλεγμονωδών απαντήσεων από ερεθίσματα σε κάποια παθογόνα έκθεση (π.χ στρες) ^[192]. Η αποτυχία των γλυκοκορτικοειδών να εμποδίσουν τις φλεγμονώδεις απαντήσεις στο ερέθισμα μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη ασθενειών ^[192]. Παραδείγματος χάριν, τα πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η υπερβολική φλεγμονή μπορεί να διαδραματίσει έναν σημαντικό ρόλο σε διάφορες ιατρικές ασθένειες συμπεριλαμβανομένης της καρδιαγγειακής πάθησης, του διαβήτη και του καρκίνου (περιφερική αντίσταση) ^[193]. Έτσι, αν και τα γλυκοκορτικοειδή είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, οι απαντήσεις των ασθενών στα GCs ποικίλλουν πολύ. Λαμβάνοντας υπόψη τον κεντρικό ρόλο των γλυκοκορτικοειδών και των μονοπατιών σηματοδότησής τους στη διατήρηση της υγείας και την πρόληψη της ασθένειας, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι σε διάφορες διαταραχές που χαρακτηρίζονται από υπερβολικές φλεγμονώδεις απαντήσεις συμπεριλαμβανομένου της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, του άσθματος, και της φλεγμονώδους εντερικής ασθένειας η αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή εμφανίζεται σε ποσοστό μέχρι 80% των ασθενών (περιφερική αντίσταση στα GCs) ^[194-196]. Εντούτοις, αυξανόμενα στοιχεία προτείνουν ότι η φλεγμονή η ίδια μπορεί να συμβάλλει στη μειωμένη γλυκοκορτικοειδή ευαισθησία. Για παράδειγμα, στοιχεία έχουν καθιερώσει ότι τα μονοπάτια σηματοδότησης των κυτοκινών μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα μονοπάτια σηματοδότησης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και να επηρεάσουν μ' αυτόν τον τρόπο τη γλυκοκορτικοειδή δράση ^[197]. Τέτοια αποτελέσματα των κυτοκινών και των σηματοδοτικών μονοπατιών τους στους ορμονικούς υποδοχείς έχουν καταδειχθεί σε διάφορες άλλες καταστάσεις με παθοφυσιολογική σχετικότητα συμπεριλαμβανομένων των επιδράσεων του νεκρωτικού παράγοντα α των όγκων (TNF)-α και του NF-Κβ στη σηματοδότηση του υποδοχέα βιταμινών D και τη σχετικότητά του στην οστεοπόρωση ^[198]. Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα των

κυτοκινών και των μονοπατιών σηματοδότησής τους στην ορμονική σηματοδότηση γενικά και τη σηματοδότηση του GR ειδικά, είναι ένας σημαντικός τομέας της έρευνας σχετικά με την παθοφυσιολογία και θεραπεία των φλεγμονωδών και νευροψυχιατρικών ασθενειών. Επίσης, τα γλυκοκορτικοειδή

επάγουν σε μερικούς κυτταρικούς τύπους την απόπτωση, κάτι που οδήγησε στη χρησιμοποίηση αυτών των ορμονών για τη θεραπεία της οξείας λεμφογενούς λευχαιμίας και λεμφωμάτων.

Τέλος, σε μελέτη της E.Charmandari (2011) συσχετίστηκαν μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί του hGR γονιδίου με κάποιες κλινικές εκδηλώσεις (π.χ υπερκαλιαιμία) οδηγώντας σε γενικευμένη αντίσταση ή υπερευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή.

1.7.2. Ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια (HPA) και ΣΚΠ

Η Σκλήρυνση κατά πλάκας αποτελεί μια απομυελινωτική νόσο του κεντρικού νευρικού συστήματος. Προτείνεται πως παθολογικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου και στην φλεγμονή επάγοντας την έναρξη της νόσου και την επακόλουθη απομυελίνωση ή νευρωτική εκφύλιση. Μελέτες σε ασθενείς καθώς και σε πειραματικά μοντέλα δείχνουν πως αυτοάνοσοι μηχανισμοί επάγουν την ενεργοποίηση λεμφοκυττάρων περιφερικά τα οποία στη συνέχεια διέρχονται στο ΚΝΣ, προκαλούν την ενεργοποίηση μακροφάγων και την επακόλουθη βλάβη της μυελίνης και ακολούθως των νευραξόνων ^[199].

Ορισμένες μελέτες προτείνουν πως ο άξονας υποθαλάμου υπόφυσης-επινεφριδίων (hypothalamic-pituitary-adrenal axis-HPA) παίζει σημαντικό ρόλο στην πορεία της νόσου. Η υπολειτουργία του HPA στους ασθενείς επιβεβαιώνεται από κάποιες παλαιότερες μελέτες, αντίθετα, πρόσφατες μελέτες δείχνουν υπερδραστηριότητα του HPA και αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και ACTH. Μελέτες σε νεκροτομικό υλικό ασθενών με ΣΚΠ ενισχύουν την υπερδραστηριότητα του άξονα επισημαίνοντας την παρουσία υπερπλασματικών επινεφριδίων ^[200] και αυξημένης παραγωγής CRH από τους υποθαλαμικούς νευρώνες ^[201]. Οι Bergh και συνεργάτες αναφέρουν υπερδραστηριότητα του HPA στους ασθενείς με ΣΚΠ η οποία σχετίζεται με την κλινική πορεία της νόσου και την επιβάρυνση της κλινικής εικόνας. Επισημαίνουν δε πως οι ασθενείς με πρωτοπαθώς προϊούσα μορφή (PRMS) παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη υπερδραστηριότητα του HPA έναντι των άλλων ομάδων ^[202].

Ανάλογα ευρήματα αναφέρουν και οι Gold και συν επιβεβαιώνοντας πως η υπερδραστηριότητα του HPA συσχετίζονταν σημαντικά με την κλινική πορεία της νόσου σε διάστημα 3 ετών, καταλήγοντας πως πιθανώς η δοκιμασία

ανταπόκρισης στη δεξαμεθαζόνη θα μπορούσε να αποτελέσει προγνωστικό παράγοντα της νόσου ^[203]. Ορισμένες μελέτες αναφέρουν μειωμένη ^[204], και άλλες φυσιολογική παραγωγή κορτιζόλης μετά καταστολή με χορήγηση δεξαμεθαζόνης ^[205]. Στο σύνολο των μελετών ως προς το ρόλο του HPA στην ΣΚΠ, τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά, ο αριθμός των ασθενών είναι περιορισμένος, δεν υπάρχει αξιολόγηση της δραστηριότητας του HPA ανάλογα με τη μορφή της νόσου, τη λήψη ή μη νοσοτροποποιητικής αγωγής, της συνύπαρξης κατάθλιψης ή κόπωσης.

Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις μειωμένης ευαισθησίας (GC insensitivity) των κυττάρων του ανοσοποιητικού στη ΣΚΠ. Οι DeRijk και συν έδειξαν πως τα κύτταρα του ανοσοποιητικού ήταν λιγότερο ευαίσθητα στην επαγόμενη από τα GC καταστολή της IL-6 σε σύγκριση με τους υγιείς ^[206]. Οι van Winsen και συν επιβεβαίωσαν την μειωμένη ευαισθησία GC να καταστείλουν την επαγόμενη από LPS παραγωγή TNF σε ασθενείς με RRMS έναντι υγιών μαρτύρων ^[207]. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανοχή στα GC (GC resistance) σε ασθενείς με ΣΚΠ δεν έχουν διευκρινιστεί. Οι van Winsen και συν μελέτησαν τους γονιδιακούς πολυμορφισμούς (αλληλία N363S, ER22/23EK, BclI) ως πιθανούς επαγωγείς της ανθεκτικότητας στα GC (GC resistance) αλλά δεν βρήκαν συσχέτιση ^[207]. Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι Ysraelit και συν σε ασθενείς με ΣΚΠ αναφέρουν υπερδραστηριότητα του HPA έναντι των υγιών μαρτύρων ενώ μελέτησαν για πρώτη φορά τη δραστηριότητα και την ικανότητα πρόσδεσης του υποδοχέα της κορτιζόλης στα λεμφοκύτταρα (activity and binding properties of GC-GRs) στις διάφορες μορφές ασθενών με ΣΚΠ. Σύμφωνα με τα ευρήματά τους, ενώ οι GRs δεν διέφεραν μεταξύ ασθενών και μαρτύρων ως προς τον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης (binding sites), όλοι οι ασθενείς με ΣΚΠ παρουσίασαν μειωμένη χημική συγγένεια της δεξαμεθαζόνης για τον GR έναντι των μαρτύρων. Συνεπώς, τα ευρήματα ως προς τη δυσλειτουργία του HPA στους ασθενείς με ΣΚΠ και οι μηχανισμοί ανοχής στα γλυκοκορτικοειδή (GC resistance) δεν έχουν διευκρινιστεί.

Κάποιοι ερευνητές προτείνουν πως πιθανώς συνυπάρχει διαταραχή του HPA σχετιζόμενη με τη μορφή της νόσου, υποθέτοντας πως η υπερδραστηριότητα του HPA εκφράζει την μετάπτωση της διαλείπουσας (RRMS) στην δευτεροπαθώς προϊούσα μορφή (SPMS). Η ενδεχόμενη διαταραχή του HPA δεν έχει μελετηθεί σε ασθενείς με κλινικά μεμονωμένο επεισόδιο.

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) ρυθμίζουν τη λειτουργία του άξονα HPA και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ΣΚΠ. Οι δράσεις των γλυκοκορτικοειδών μεσολαβούνται από τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) ενώ επικρατεί η άποψη ότι η μείωση στη GC-GR-μεσολαβούσα σηματοδότηση μπορεί να αποτελεί βασικό αιτιοπαθολογικό μηχανισμό στην υπερδραστηριότητα του άξονα στη ΣΚΠ. Η σηματοδότηση του GR είναι πολυπαραγοντική, εξαρτάται από την γονιδιακή αλληλουχία του υποδοχέα και αλληλεπιδρά με άλλα κυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης σε ποικίλα επίπεδα συμπεριλαμβανομένης της αλληλεπίδρασης του GR με άλλες κυτταροπλασματικές και πυρηνικές πρωτεΐνες όπως μεταγραφικούς παράγοντες και κινάσες. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η φωσφορυλίωση του υποδοχέα, είναι γνωστό ότι επηρεάζουν επίσης τη δραστηριότητά του. Από την άλλη πλευρά, αλλαγές στη δομή της χρωματίνης καθώς και η ακετυλίωση/από-ακετυλίωση των ιστονών, επηρεάζουν τη μεταγραφική δραστηριότητα.

Κλινικές μελέτες σε μοριακό επίπεδο, που αξιολογούν τις σύνθετες αλληλεπιδράσεις της σηματοδότησης του GR με άλλους καταρράκτες της κυτταρικής σηματοδότησης στη ΣΚΠ, είναι βασικά ανύπαρκτες.

1.7.3. Πολυμορφισμοί του GR γονιδίου στην ΣΚΠ

Η Σκλήρυνση κατά Πλάκας είναι μια χρόνια φλεγμονώδης και απομυελινωτική νόσος του κεντρικού νευρικού συστήματος με σύνθετη αιτιολογία. Άγνωστοι περιβαλλοντικοί παράγοντες πιστεύεται ότι μπορεί να πυροδοτήσουν τη νόσο σε γενετικώς ευαίσθητα άτομα. Οικογενειακές μελέτες γίνονται για να μελετηθεί η πορεία της νόσου καθώς και τα στάδια της εξέλιξής της.

Τα γλυκοκορτικοειδή παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της χρόνιας φλεγμονώδους νόσου όπως η ΣΚΠ και συχνά χρησιμοποιούνται για την θεραπεία αυτών των νόσων. Η φλεγμονώδης φύση της ΣΚΠ δείχνει ότι η ενδογένης

κορτιζόλη, η οποία ελέγχεται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων, παίζει ρόλο στην πορεία της νόσου και ενδεχομένως και στην ευαισθησία της. Ευαισθησία ως προς τα GCs θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένη φλεγμονή στην ΣΚΠ ενώ η αυξημένη δραστηριότητα του άξονα έχει συνδεθεί με νευροεκφυλισμό και αυξημένη αναπηρία ^[169, 208]. Πρόσφατα βρέθηκε

ότι η ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή σε ασθενείς με ΣΚΠ, ιδιαίτερα σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα-διαλείπουσα ΣΚΠ (RRMS), μειώνεται σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες (HC). Η μεταβλητότητα του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) είναι μια πιθανή εξήγηση για διαφορές στην ευαισθησία στα GC, και μπορούν να επηρεάσουν την πορεία της νόσου ^[169, 207].

Τρεις μόνο μελέτες από τους van Winsen και συν δείχνουν συσχέτιση της ΣΚΠ με τους πολυμορφισμούς N363S, ER22/ER23K και BclI του GR γονιδίου οι οποίοι φαίνεται να εναλλάσσουν την ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζοντας έτσι την πορεία της νόσου.

Σε κάποιες μελέτες ^[169, 209] χρησιμοποιήθηκαν οι πληροφορίες του γονότυπου για τον καθένα από τους παραπάνω πολυμορφισμούς ξεχωριστά για να συμπεράνουν απλότυπους πιστεύοντας πως οι ασθενείς που έχουν απλότυπους που σχετίζονται με μειωμένη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή παρουσιάζουν μια πιο επιθετική μορφή της νόσου. Έτσι χρησιμοποιώντας τα στοιχεία γονοτύπου για τους 9β (rs6198), TthIII (rs 10052957), ER22/23EK (rs6189 και rs6190), N363S (rs6195) και BclI (rs41423247) πολυμορφισμούς, συμπέραναν έξι απλοτύπους οι οποίοι ευθύνονται για περισσότερο από 99% των συνολικών παραγόμενων απλοτύπων. Από την μελέτη βρέθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον απλότυπο 6 (TthIII, 9β και ER22/23EK) του GR γονιδίου και μια πιο επιθετική μορφή της νόσου ΣΚΠ. Διαφορές στην πορεία της νόσου από την επίδραση των απλοτύπων 4 και 6 μπορεί να οφείλονται στις διαφορές στα μοριακά αποτελέσματα. Ο ER22/23EK πολυμορφισμός ο οποίος μειώνει την ικανότητα trans-ενεργοποίησης του GR μέσω των GRE φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του άξονα. Στην ΣΚΠ οι διεργασίες μετενεργοποίησης παίζουν σημαντικότερο ρόλο στη νόσο απ'ότι οι διεργασίες trans-ενεργοποίησης. Επιπλέον, μια μελέτη έδειξε συσχέτιση του ER22/23EK πολυμορφισμού με την μείωση της GC ευαισθησίας όπως μετρήθηκε μετά από τη δοκιμασία καταστολής

με δεξαμεθαζόνη σε Ολλανδούς υγιείς ηλικιωμένους, γεγονός το οποίο δεν παρατηρήθηκε για τον 9β πολυμορφισμό ^[169, 210]. Αυτό υποδεικνύει ότι η μειωμένη ευαισθησία στα GC δεν είναι αποτέλεσμα της ανισορροπίας σύνδεσης με τον πολυμορφισμό 9β ή TthIII. Με βάση αυτό δεν βρέθηκε επίσης συσχέτιση του απλότυπου 4 (9β TthIII). Πρόσφατη μελέτη βρήκε ότι υγιείς άντρες φορείς της 9β

παραλλαγής είχαν υψηλότερες συνολικές απαντήσεις κορτιζόλης μετά από κοινωνικό άγχος αλλά επίσης και αυξημένα επίπεδα ACTH μετά τη δοκιμασία καταστολής με δεξαμεθαζόνη, ένδειξη σχετικής έλλειψης ευαισθησίας στα GC στο επίπεδο του άξονα HPA. Μια ακόμα υπόθεση είναι ότι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που δεν είναι ευαίσθητα στα GC μπορεί να οδηγήσουν στην επιθετική πορεία της νόσου που οφείλεται στον μειωμένο έλεγχο των ανοσολογικών και φλεγμονωδών αντιδράσεων. Η ανισορροπία μεταξύ των δύο αυτών συστημάτων στην ΣΚΠ μπορεί τουλάχιστον εν μέρει να είναι κληρονομική, όπως μπορούμε να συμπεράνουμε από τα αποτελέσματα της μελέτης ^[211]. Τέλος υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι ο ER22/23EK πολυμορφισμός είναι λειτουργικός. Τα GCs παίζουν ρόλο στον έλεγχο της φλεγμονής και καταυτόν τον τρόπο η μειωμένη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη φλεγμονώδη δραστηριότητα. Σε πρόσφατες μελέτες ο ER22/23EK πολυμορφισμός σχετίστηκε με υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης μετά το DST, δηλώνοντας ότι οι φορείς αυτού του αλληλόμορφου είναι πιο ανθεκτικοί στις επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Η κορτιζόλη είναι ένα από τα πιο ισχυρά συστατικά ενδογενής ανατροφοδότησης στον προ-φλεγμονώδη μηχανισμό μεταγωγής σήματος και μια σχετική αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να προκαλέσει απώλεια ανοσολογικής ομοιόστασης και ανεξέλεγκτη ανοσοαπόκριση έναντι των δομικών συστατικών του ΚΝΣ. Αυτό μπορεί να δηλώνει ότι ο υποκείμενος μηχανισμός της συσχέτισης ανάμεσα στον ER22/23EK πολυμορφισμό και την πιο επιθετική πορεία της νόσου είναι μια αυξανόμενη φλεγμονή του ΚΝΣ εξαιτίας της μειωμένης καταστολής από τα γλυκοκορτικοειδή που προκαλείται από σχετική έλλειψη ευαισθησίας στα GCs.

Η αξονική βλάβη και ο εκφυλισμός των νευρώνων θεωρούνται πλέον ως οι κύριες αιτίες της προοδευτικής και μη αναστρέψιμης νευρολογικής αναπηρίας στη σκλήρυνση κατά πλάκας. Συνεπώς, η πιο επιθετική πορεία της νόσου στους φορείς του ER22/23EK πολυμορφισμού μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη

αξονική βλάβη. Στο επίπεδο του κεντρικού νευρικού συστήματος, η σχετική αντίσταση του GR θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη ανταπόκριση του GR στον υποθάλαμο, τον ιππόκαμπο και τον προμετωπιαίο, που είναι περιοχές του εγκεφάλου που εμπλέκονται στον έλεγχο ανάδρασης των γλυκοκορτικοειδών, οδηγώντας πιθανόν σε αυξημένη δραστηριότητα του άξονα. Η αντίσταση στα

γλυκοκορτικοειδή έχει συσχετιστεί με τον νευροπαθολογικό μηχανισμό στην νόσο Alzheimer. Επιπλέον, στην ΣΚΠ μια άμεση σχέση ανάμεσα στην υπερδραστηριότητα του άξονα και στον νευροεκφυλισμό έχει προταθεί από μελέτη δείχνοντας ότι η απελευθέρωση κορτιζόλης που επάγεται από τον έλεγχο απελευθέρωσης δεξαμεθαζο-κορτικοτροπίνης σχετίζεται αρνητικά με τις ενισχυόμενες βλάβες γαδολινίου και θετικά με το κοιλιακό μέγεθος ^[169, 212]. Τέλος, συμπερασματικά ο ER22/23EK πολυμορφισμός εκτός του ότι επάγει μειωμένη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή και σχετίζεται με έναν πιο “επιθετικό” φαινότυπο στην ΣΚΠ έχει επιδράσεις είτε στη φλεγμονή είτε στην αξονική απώλεια και για να προσδιοριστεί απαιτείται μεγάλο πλήθος δειγμάτων ^[169].

Σε άλλη μελέτη προκειμένου να διερευνηθεί η δραστηριότητα του άξονα σε ασθενείς με ΣΚΠ μελετήθηκαν ασθενείς και των πέντε κατηγοριών που πάσχουν από τη νόσο (PPMS, RRMS, RREMS, RRRMS, SPMS) ^[213]. Κανένας από αυτούς τους ασθενείς δεν έκανε θεραπεία με στεροειδή ή άλλα ανοσοτροποποιητικά και η δοκιμασία ελέγχου της σύνδεσης του GR σε μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) διεξήχθη χρησιμοποιώντας Dex. Ο αριθμός των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs) που εκκρίνουν IL-1β, IL-6, IFN-γ και TNF-α εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας ενζυμο-συνδεδεμένη ανοσορροφητική δοκιμασία spot (ELISPOT). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι τέσσερις κατηγορίες ασθενών εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα κορτιζόλης, ACTH, DHEAS συγκεντρώσεις πλάσματος και τιμές κορτιζόλης ούρων από τους μάρτυρες. Παρότι το 62% των ασθενών με ΣΚΠ δεν κατέστειλαν την δεξαμεθαζόνη (Dex), τα αποτελέσματα του τεστ καταστολής δεν συσχετίστηκαν με την παραγωγή IL-1β, IL-6, IFN-γ και TNF-α. Οι έλεγχοι σύνδεσης του GR δεν έδειξαν καμία διαφορά στις περιοχές σύνδεσης ανάμεσα στους ασθενείς και στους μάρτυρες . Ωστόσο, όλες οι ομάδες των ασθενών με MS παρουσίασαν μειωμένη GR συγγένεια και ευαισθησία σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου. Ο αριθμός των εκκρινόμενων IL-1β, IL-6, και TNF-α κυττάρων αυξήθηκε σημαντικά στους RRMS ασθενείς μόνο κατά τη

διάρκεια εξάρσεων σε αντίθεση με τα εκκρινόμενα IFN-γ κύτταρα τα οποία αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια εξάρσεων αλλά και ύφεσης. Τέλος, ο αριθμός των εκκρινόμενων PBMC CRH κυττάρων ήταν συγκριτικά μεγάλος σε όλες τις κατηγορίες των ασθενών με MS.

Συμπερασματικά, οι ασθενείς με ΣΚΠ εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα του άξονα με κυριάρχη ομάδα τους RREMS ασθενείς και ακολουθούν οι PPMS ασθενείς ενώ οι SPMS και RRRMS έδειξαν μέτρια και ενδιάμεσα επίπεδα αυξημένης δραστηριότητας αντίστοιχα. Επιπλέον, τα αιματοκύτταρα των ασθενών με ΣΚΠ βρέθηκε να είναι λιγότερα ευαίσθητα στα GCs σε σύγκριση με τα κύτταρα των μαρτύρων καθώς επίσης και οι ασθενείς με μειωμένη ευαισθησία του GR παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα φλεγμονής, συνεπώς μεγαλύτερη παραγωγή των IL-1β, IL-6, IFN-γ και TNF-α.

Στη μελέτη των Lisa L.M. van Winsen et al., 2005 ^[214] εκτιμήθηκε η συσχέτιση ανάμεσα στους πολυμορφισμούς του GR γονιδίου και της ευαισθησίας στα GC ανάμεσα στα υγιή άτομα και στους ασθενείς με ΣΚΠ. Στα υγιή άτομα το N363S αλληλόμορφο του GR σχετίστηκε με μειωμένη ευαισθησία στα GC in vitro και αυξημένη in vivo. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου αυτός ο πολυμορφισμός επηρεάζει την ευαισθησία στα GC δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Επιπρόσθετα, βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στο N363S αλληλόμορφο του GR και την μειωμένη περιφερική ευαισθησία στα GC. Ωστόσο, στους ασθενείς με ΣΚΠ κανένα από τα αλληλόμορφα (N363S, ER22/23EK και BclIG) δεν σχετίστηκε με μεταβαλλόμενη ευαισθησία στα GC. Επίσης, ο συνδυασμός των παραπάνω πολυμορφισμών δε μπορεί να εξηγήσει τις παρατηρούμενες διαφορές.

Μια πιο παλιά μελέτη των Florian Then Bergh et al., 1997 ^[215] εξέτασε τα χαρακτηριστικά της πρόσδεσης του GR σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος από ασθενείς με ΣΚΠ και βρέθηκε συγκρίσιμη η συγγένεια και η μέγιστη ικανότητα σύνδεσης σε ασθενείς με ΣΚΠ και υγιή άτομα μάρτυρες. Μελετήθηκε ομάδα ασθενών με ΣΚΠ καθώς και υγιή άτομα που ταίριαζαν στην ηλικία και στο φύλο. Οι παράμετροι σύνδεσης του GR δε διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στους υγιείς και στους ασθενείς καθώς επίσης δεν ανιχνεύτηκε καμία επίδραση της ηλικίας, του φύλου, της πορείας, της διάρκειας και της σοβαρότητας της νόσου ή προηγούμενης θεραπείας με στεροειδή. Τέλος, τα υγιή άτομα εμφάνισαν μια μέτρια συσχέτιση ανάμεσα στη συγγένεια σύνδεσης του GR στα λεμφοκύτταρα και

τη ρυθμιστική λειτουργία στο επίπεδο του υποθαλάμου οι ενώ οι πάσχοντες δεν την εμφάνισαν. Αυτές οι πληροφορίες έδειξαν ότι η φυσιολογική σχέση ανάμεσα στη σύνδεση και στη λειτουργία του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών διαταράσσεται στην ΣΚΠ ^[215].

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν:

- Η μοριακή ανάλυση του γονιδίου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GRα).
- Η συσχέτιση της ύπαρξης μοριακών αλλαγών στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με την απόκριση ή όχι στη χορηγούμενη θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη και την κλινική βελτίωση των ασθενών με τη νόσο της Σκλήρυνσης Κατά Πλάκας.

ΜΕΡΟΣ Β΄

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. ΥΛΙΚΑ

1.1. Πληθυσμός υπο μελέτη

1.1.1 Φυσιολογικοί Μάρτυρες

Ως φυσιολογικοί μάρτυρες θεωρήθηκαν τα άτομα που δεν πάσχουν από ΣΚΠ ή από συναισθηματική διαταραχή (π.χ κατάθλιψη) και τα οποία δεν υπόκεινται σε θεραπευτική αγωγή λόγω άλλου νοσήματος.

1.1.2 Ασθενείς

Η επιλογή των ασθενών έγινε από την κ. Ε. Ευαγγελοπούλου (Ιατρός Νευρολόγος) στο Αιγινήτειο Νοσοκομείο στην Αθήνα. Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν είκοσι άτομα που πάσχουν από ΣΚΠ και τα οποία δεν ελάμβαναν κορτιζόνη τρεις μήνες πριν την εισαγωγή στη μελέτη, ανοσοτροποποιητική ή ανοσοκατασταλτική αγωγή καθώς και κεντρικώς δρώντα φάρμακα όπως αντικαταθλιπτικά ή νευροληπτικά. Ορισμένοι ασθενείς παρουσίαζαν την RRMS (relapsing/remitting) μορφή της νόσου, άλλοι την SPMS (secondary progressive) ενώ άλλοι την CIS (Clinically Isolated Syndrome) μορφή της νόσου.

Οι ασθενείς ενημερώθηκαν και έδωσαν τη συγκατάθεσή τους για τη συγκεκριμένη μελέτη πριν τη διενέργεια της αιμοληψίας, η οποία πραγματοποιήθηκε στο Αιγινήτειο Νοσοκομείο στην Αθήνα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Σχεδιασμός πειράματος

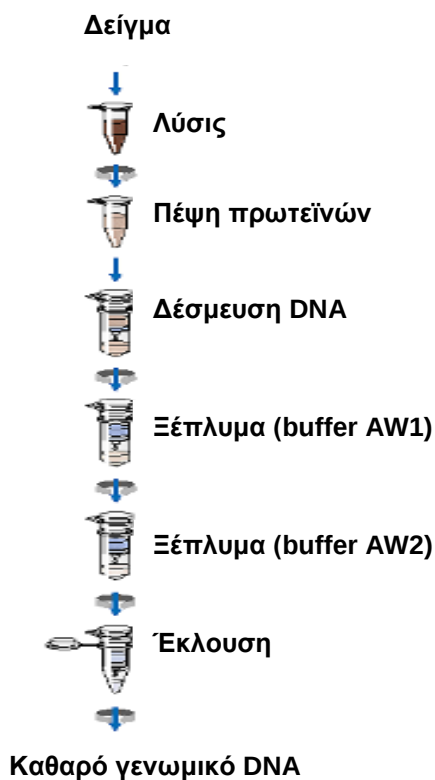
- Απομόνωση DNA από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος
- Πολλαπλασιασμός των εξωνίων 2-9 του GRa γονιδίου με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).
- Ανίχνευση των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v και έλεγχος του μεγέθους τους.
- Αναζήτηση πολυμορφισμών ή μεταλλάξεων με τη μέθοδο του προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA (DNA sequencing).

2.2 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση του DNA από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος, το οποίο είχε τοποθετηθεί σε φιαλίδια με EDTA 5% w/v, χρησιμοποιήθηκε το kit QIAamp DNA Blood Mini Kit του οίκου QIAGEN. Το δείγμα ψύχεται σε T -20°C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

Το DNA απομονώνεται από τα εμπύρνηνα λευκοκύτταρα ενώ τα διαφοροποιημένα απύρνηνα ερυθροκύτταρα απομακρύνονται με κατάλληλες διεργασίες. Η διαδικασία της απομόνωσης του γονιδιακού DNA περιλαμβάνει στάδια λύσης των ερυθρών και λύσης των μεμβρανών των λευκών αιμοσφαιρίων, απελευθέρωση DNA, καταστροφή των πρωτεϊνών (ιστονών) και καθίζησή τους με μορφή ιζήματος και την τελική κατακρήμνιση του DNA.

Τα στάδια που ακολουθήθηκαν απεικονίζονται στην παρακάτω **εικόνα 2.1**:



Εικόνα 2.1: Στάδια απομόνωσης γενωμικού DNA

Σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου “erppendorf” των 1,5 ml μεταφέρονται 20μl από διάλυμα της QIAGEN πρωτεϊνάσης (C: 20μg/μl) προκειμένου να αποδομηθούν οι πρωτεΐνες και σε αυτά προστίθενται 200 μl περιφερικού αίματος και 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος AL. Το δείγμα ομογενοποιείται με τη βοήθεια του οργάνου αναταράξεως (vortex).

Με την παραπάνω διαδικασία, πραγματοποιείται λύση των λευκών αιμοσφαιρίων με τη βοήθεια του ρυθμιστικού διαλύματος AL και καταστροφή των πρωτεϊνών με τη δράση του ισχυρού πρωτεωλυτικού ενζύμου της πρωτεϊνάσης K.

Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση δείγματος στους 56°C για 10 min για να δράσει η πρωτεϊνάση και να γίνει λύση των κυττάρων.

Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την προσθήκη 200μl αιθανόλης (96-100%) στο δείγμα και ανάδευση με τη βοήθεια του vortex. Η προσθήκη της αιθανόλης προκαλεί κατακρήμνιση του DNA. Μετά την ανάμειξη πραγματοποιείται σύντομη φυγοκέντρηση στο δείγμα το οποίο στη συνέχεια μεταφέρεται με προσοχή σε μια στήλη που εμπεριέχεται στο kit, η οποία τοποθετείται σε ένα σωλήνα συλλογής των 2ml. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 13000 rpm / min για 1min.

Κατόπιν, η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα συλλογής και ο προηγούμενος απομακρύνεται.

Με προσεκτικό άνοιγμα της στήλης προστίθενται 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW1 και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13000 rpm / min για 1min. Η στήλη τοποθετείται σε καθαρό σωλήνα συλλογής και ο προηγούμενος απομακρύνεται.

Το επόμενο βήμα το οποίο επαναλαμβάνεται δύο φορές περιλαμβάνει την προσθήκη 500μl ρυθμιστικού διαλύματος AW2 στο δείγμα, το οποίο φυγοκεντρείται στις 13000 rpm / min για 3 min.

Στο τελευταίο στάδιο, η στήλη μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου “erpendorf” των 1,5ml ενώ ο προηγούμενος απομακρύνεται. Στο δείγμα προστίθενται 200μl ρυθμιστικού διαλύματος AE και πραγματοποιείται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Τέλος, το δείγμα φυγοκεντρείται για 1 min στις 13000 rpm / min.

Η τελική συγκέντρωση DNA που αναμένεται να πάρουμε από την περιγραφείσα διαδικασία είναι περίπου 40ng/μl.

Για την εκτίμηση της ποιότητας του DNA που απομονώθηκε τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε γέλη αгарόζης 1%.

2.3 Τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (**Polymerase Chain Reaction, PCR**) είναι μία από τις πιο σημαντικές μεθόδους της μοριακής βιολογίας η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA, από πολλές χιλιάδες μέχρι εκατομμύρια φορές. Περιγράφηκε το 1984 από τον Karry Mullis που τιμήθηκε για την ανακάλυψη του αυτή το 1993 με το βραβείο Νόμπελ.

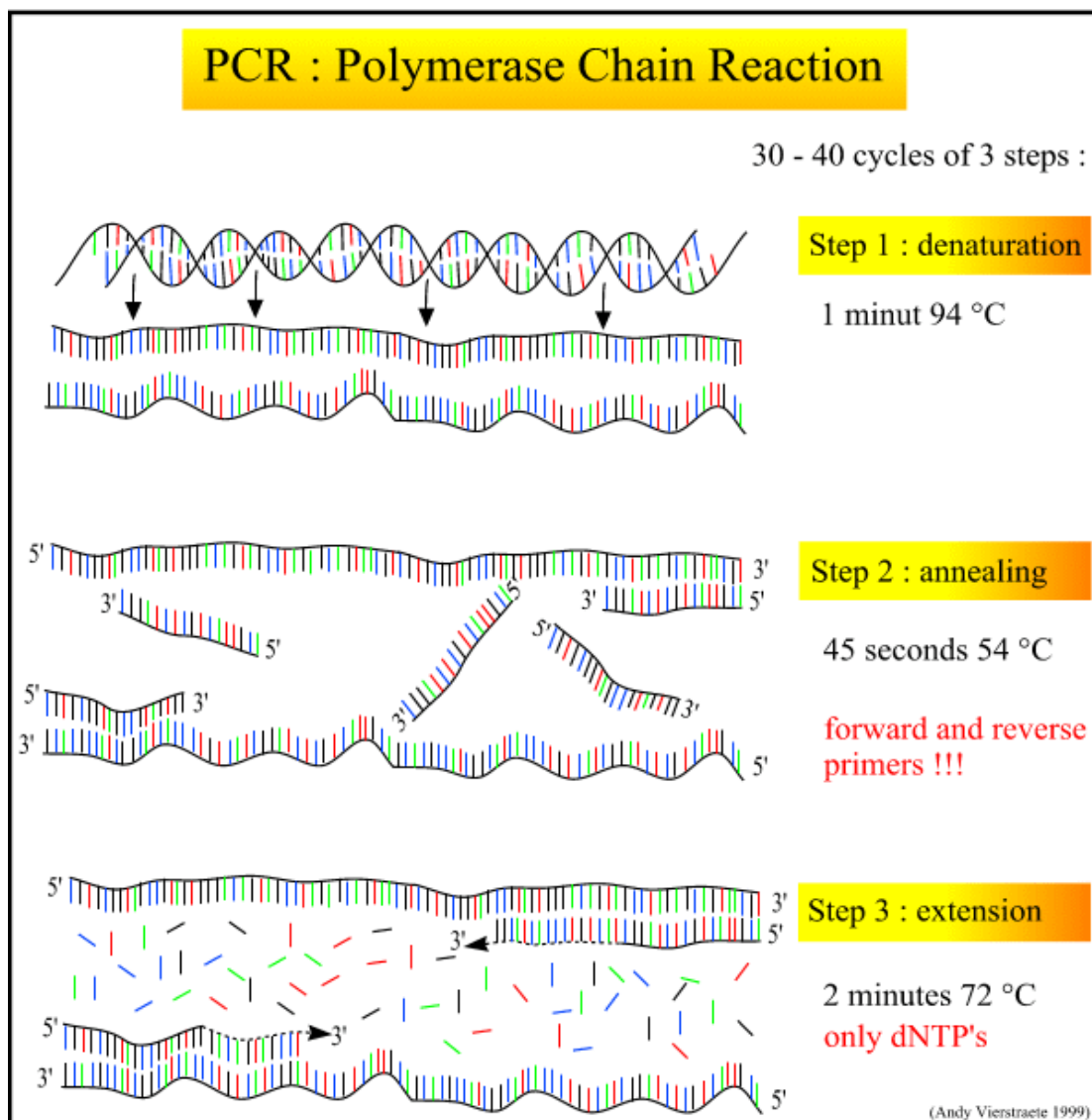
Η PCR βασίζεται στην επανάληψη ενός κύκλου που περιλαμβάνει τα παρακάτω τρία (3) διαδοχικά στάδια (**Εικόνα 2.2**):

1. Το δείγμα επωάζεται συνήθως στους 94 °C, όπου λαμβάνει χώρα η αποδιάταξη (**Denaturation**) των αλυσίδων του δίκλωνου τμήματος DNA-στόχου.
2. Το δείγμα ψύχεται στη θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών (συνήθως στους 50-60 °C), ώστε να λάβει χώρα η ένωσή τους με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες κάθε κλώνου (**Annealing**).

3. Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 °C προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης. Έτσι, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων με την προσθήκη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των εκκινητών (**Extension**). Η προσθήκη των νουκλεοτιδίων από την DNA πολυμεράση γίνεται με ρυθμό έως και 100 βάσεις ανά δευτερόλεπτο (www.invitrogen.com/qPCR Handbook).

Οι εκκινητές (**primers**) είναι ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15-20 νουκλεοτιδίων ο καθένας και είναι συμπληρωματικοί των αλληλουχιών στα άκρα κάθε κλώνου (**Forward & Reverse primers**). Η DNA πολυμεράση (**Taq polymerase**) είναι ένα ένζυμο που απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και βοηθάει στη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου.

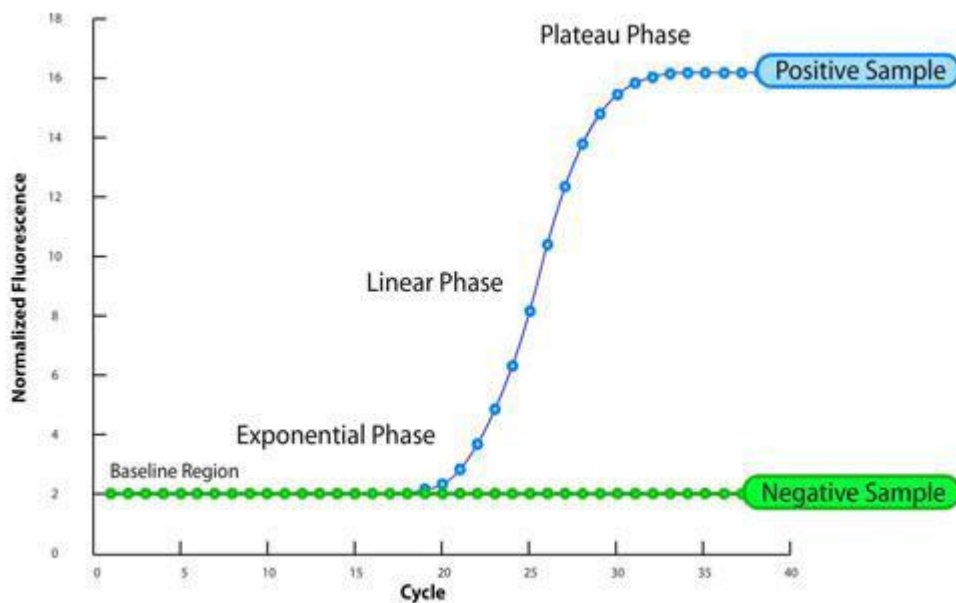
Μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης PCR, εκτός από τους εκκινητές, την πολυμεράση και το προς αντιγραφή τμήμα γονιδίου, υπάρχουν και τα τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTP's) που είναι τα απαραίτητα για τη σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων νουκλεοτίδια, ιόντα μαγνησίου (Mg²⁺) που απαιτούνται για την ενίσχυση της ενζυμικής δραστηριότητας της DNA πολυμεράσης και την ειδικότητα της αντίδρασης και ένα ρυθμιστικό διάλυμα για τη διατήρηση του pH στις τιμές 7.5-8.0 ^[215].



Εικόνα 2.2. Τα τρία διαδοχικά στάδια (steps) της PCR

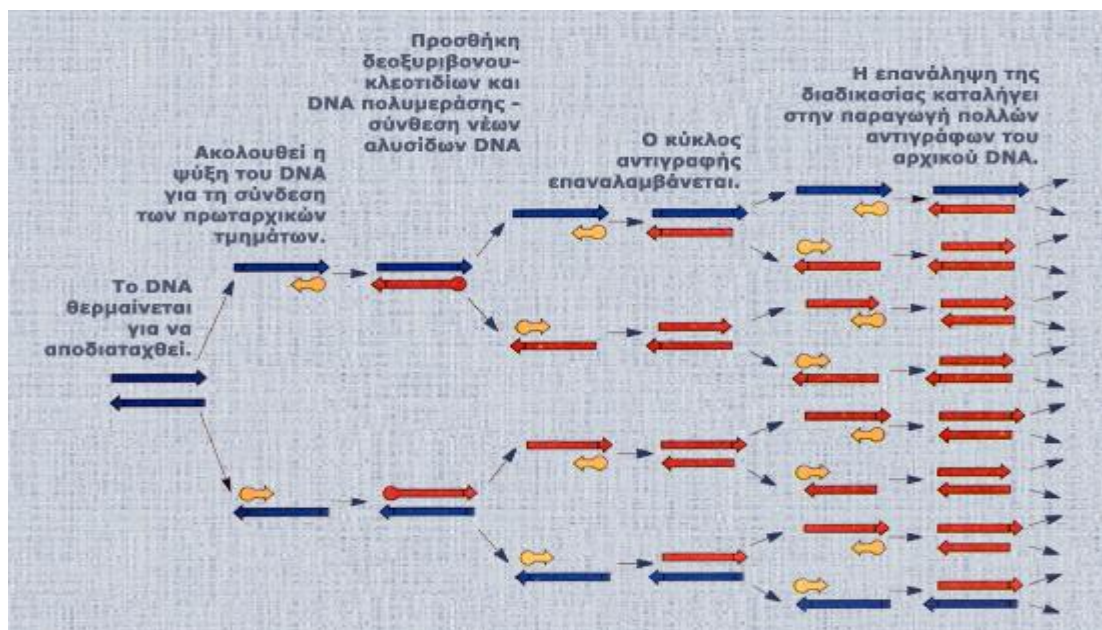
Η αντίδραση της PCR χωρίζεται στις εξής τρεις (3) φάσεις (**Εικόνα 2.3**):

- Εκθετική φάση (**Exponential**): η αντιγραφή της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA είναι πολύ αποτελεσματική.
- Γραμμική φάση (**Linear**): παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων του γονιδίου-στόχου λόγω μείωσης των αντιδραστηρίων.
- **Plateau** φάση: έχει σταματήσει η αντίδραση και παραγωγή νέων αντιγράφων λόγω εξάντλησης των αντιδραστηρίων.



Εικόνα 2.3: Η αντίδραση του PCR χωρίζεται σε 3 φάσεις

Η αντίδραση της PCR ολοκληρώνεται συνήθως μετά από 30-40 κύκλους που είναι αρκετοί για τη σύνθεση εκατομμυρίων αντιγράφων του αρχικού τμήματος DNA. Σε κάθε κύκλο λαμβάνει χώρα ο διπλασιασμός του αριθμού των αντιγράφων του επιλεγμένου γονιδίου και τα νέα αντίγραφα χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο (**Εικόνα 2.4**).



Εικόνα 2.4: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας της PCR

Στην παρούσα εργασία τα εξώνια 2 - 9 του hGRa γονιδίου πολλαπλασιάστηκαν με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών του πίνακα 2. Το εξώνιο 1 δεν πολλαπλασιάστηκε διότι το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου βρίσκεται στο εξώνιο 2.

Η PCR αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 25μl περιλαμβάνοντας 1μl DNA, 12.5μl HotStar MasterMix (Qiagen) και 2.5μM για τον κάθε εκκινητή. Οι εκκινητές βρίσκονται σε μορφή διαλύματος σε διάφορες συγκεντρώσεις και διατηρούνται στους -20 °C.

Στα δείγματά μας προσθέσαμε και ένα αρνητικό μάρτυρα (δείγμα χωρίς γονιδιακό DNA) ώστε να μπορούμε να διαπιστώσουμε στο τέλος της αντίδρασης την παρουσία επιμόλυνσης.

Το πρόγραμμα που ακολουθείται για τον εκλεκτικό πολλαπλασιασμό περιλαμβάνει 3 στάδια τα οποία παρουσιάζονται στα παρακάτω βήματα:

ΣΤΑΔΙΟ I: STEP 1: 95 °C -15min (Ενεργοποίηση του ενζύμου-HotStar MasterMix)

ΣΤΑΔΙΟ II: STEP 2: 94 °C-1min
STEP 3: 46 °C-60 °C- 1min **35κύκλοι**

ΣΤΑΔΙΟ III: STEP 4: 72 °C-1min
STEP 5: 72 °C-5min
STEP 6: 10 °C-

Πίνακας 2.1 : Ζεύγη εκκινητών, θερμοκρασία υβριδισμού και μέγεθος του προϊόντος στα 8 εξώνια

<i>Εξώνια</i>	<i>Εκκινητές</i>	<i>Θερμοκρασία Υβριδισμού</i>	<i>Μέγεθος προϊόντος</i>
Exon 2F	5'-GATTCGGAGTTAACTAAAAG-3'	47 °C	1184bp
Exon 2R	5'-GTCCATTCTTAAGAAACAG-3'		
Exon 2Fseq	5'-GACTGGCACCAACGGTGG-3'		
Exon 2Rseq	5'-TCTGATCTCCAAGGACTC-3'		
Exon 3F	5'-AGTTCACTGTGAGCATTCTG-3'	46 °C	167bp
Exon 3R	5'-CGTGAGAAATAAAACCAAGT-3'		
Exon 4F	5'-GACAGAAGGCTGTCCTTATA-3'	55 °C	117bp
Exon 4R	5'-CATTATGCGTATCAAGCATA-3';		
Exon 5F	5'-GAATAAACTGTGTAGCGCAG-3',	55 °C	279bp
Exon 5R	5'-TAGTCCCCAGAACTAAGAGA-3'		
Exon 6F	5'-GATCTTCTGAAGAGTGTTGC-3'	55 °C	145bp
Exon 6R	5'-GGGAAAATGACACACATACA-3'		
Exon 7F	5'-GAAAGTTCTCCAAAATTCTG-3'	57 °C	131bp
Exon 7R	5'-TTGGTGTCACCTTACTGTGCC-3'		
Exon 8F	5'-GACACAGTGAGACCCTATCT-3'	60 °C	158bp
Exon 8R	5'-CACCAACATCCACAAACTGG-3'		
Exon 9F	5'-TGTAACCCGGCTGGATAAAT-3'	55 °C	153bp
Exon 9R	5'-TTGACAACGAAGTGCACATAA-3'		

2.4 Έλεγχος των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης, συγκέντρωσης 2% w/v. Σε 120 ml ρυθμιστικού διαλύματος 10x TBE, διαλύθηκαν 2,4 g αγαρόζης με θέρμανση σε θερμαινόμενη μαγνητική πλάκα και στη συνέχεια προστέθηκαν 6 μl χρωστικής βρωμιούχο αιθίδιο. Το 2% w/v διάλυμα της αγαρόζης, αφέθηκε να πολυμεριστεί για περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε διάλυμα TBE. Μετά τον πολυμερισμό τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για 90 λεπτά σε 100 V. Σε 5μl προϊόντος PCR από κάθε δείγμα προστίθενται 1μl χρωστικής και ο συνολικός όγκος των 6μl φορτώνεται ξεχωριστά σε κάθε μια από τις θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων του πηκτώματος.

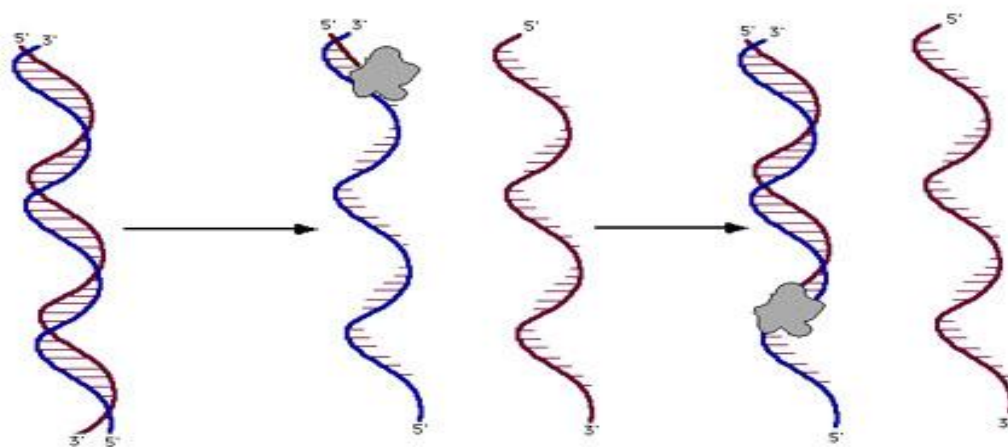
Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης μπορούμε να ελέξουμε τον διαχωρισμό των ζωνών του DNA με λάμπα υπεριώδους φωτός και να το φωτογραφίσουμε. Η αξιολόγηση του μεγέθους των ζωνών που εμφανίζονται κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR γίνεται μετά από σύγκριση τους με το DNA μάρτυρα γνωστού μεγέθους που ηλεκτροφορείται παράλληλα. Στη θέση όπου είχε τοποθετηθεί το τυφλό δείγμα δεν αναμένεται να εμφανιστεί καμία ζώνη διότι το δείγμα δεν υπάρχει DNA ^[215].

2.5 Μέθοδος προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA (DNA sequencing)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μέθοδος κατά Sanger η οποία στηρίζεται στην *in vivo* σύνθεση του DNA παρουσία άλυσο-τερματικών τριφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων (ddNTPs). Επινόηθηκε από τον Frederick Sanger το 1977 ο οποίος μάλιστα τιμήθηκε μαζί με τον Walter Gilbert με βραβείο Nobel χημείας το 1980.

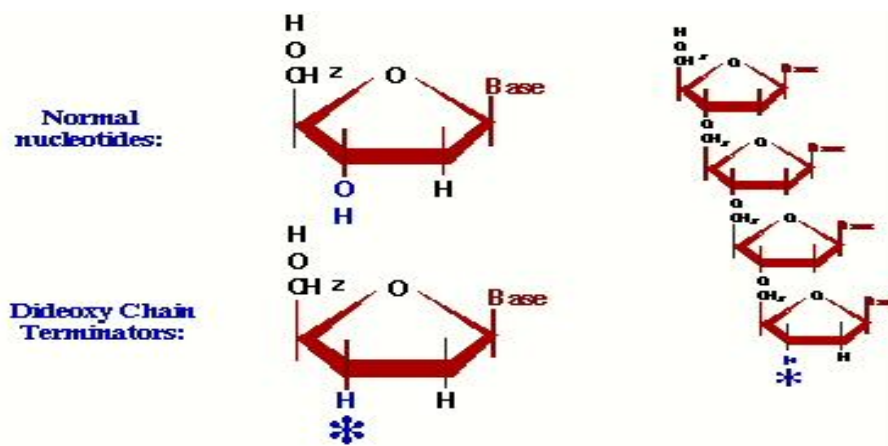
Το αρχικό στάδιο της μεθόδου είναι η παρασκευή μονόκλωνων μορίων DNA, που θα χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία (**Εικόνα 2.5**).

Στη συνέχεια ένας εκκινητής (primer) προσδένεται στην ίδια θέση κάθε μορίου και αυτός δρα ως ένα πρωταρχικό τμήμα στη σύνθεση ενός νέου κλώνου DNA, που είναι συμπληρωματικός του αρχικού κλώνου. Η σύνθεση του νέου κλώνου καταλύεται από την DNA πολυμεράση I και απαιτεί τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs – dATP - dCTP – dGTP και dTTP) ως υποστρώματα.



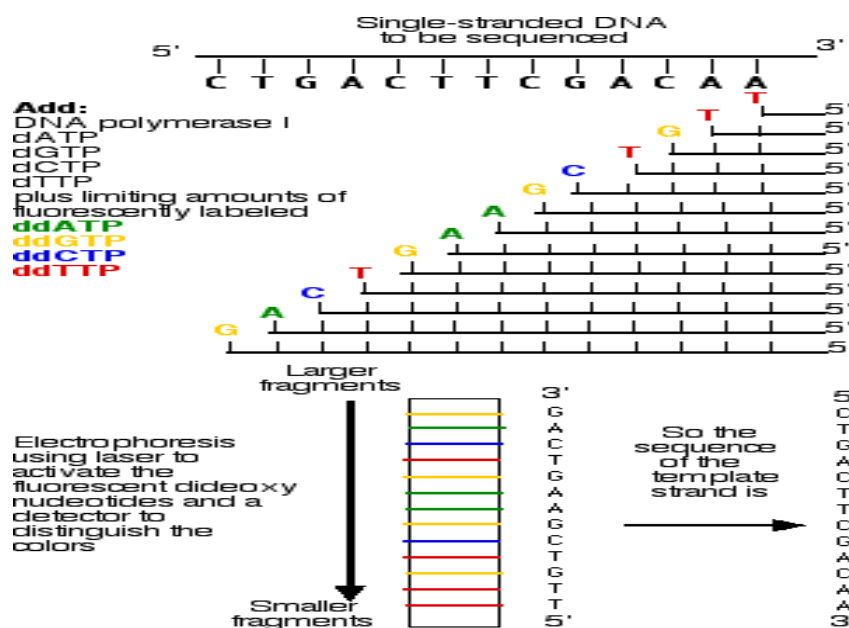
Εικόνα 2.5: Παρασκευή μονόκλωνων μορίων DNA, που θα χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία.

Στη συγκεκριμένη μέθοδο μαζί με τα τέσσερα dNTPs, προστίθεται και μια μικρή ποσότητα διδεοξυνουκλεοτιδίου (ddNTP). Η DNA πολυμεράση δε διακρίνει τα dNTPs από τα ddNTPs και έτσι ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο μπορεί να προσδεθεί στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα. Στα ddNTPs λείπει το –OH του 3ου άνθρακα της δεοξυριβόζης, με αποτέλεσμα η DNA πολυμεράση να μην μπορεί να συνεχίσει την επιμήκυνση, αφού δεν μπορεί να συνδεθεί με το επόμενο νουκλεοτίδιο (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6: Στα *ddNTPs* λείπει το $-OH$ του 3ου άνθρακα της δεοξυριβόζης, με αποτέλεσμα η DNA πολυμεράση να μην μπορεί να συνεχίσει την επιμήκυνση, αφού δεν μπορεί να συνδεθεί το επόμενο νουκλεοτίδιο.

Έτσι, αν μαζί με τα φυσιολογικά *dNTPs* προστεθεί και μια μικρή ποσότητα σημασμένων *ddNTPs*, η επιμήκυνση κάθε νεοσυντιθέμενης αλυσίδας σταματά απέναντι από τις θέσεις των *ddNTPs* του DNA εκμαγείου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός συνόλου από DNA θραύσματα διαφορετικού μεγέθους^[215] (**Εικόνα 2.7**).



Εικόνα 2.7: DNA θραύσματα διαφορετικού μεγέθους, που αντιστοιχούν σε διαφορετικές θέσεις

Χρησιμοποιήθηκε το sequencer ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer του οίκου Applied Biosystems και το κιτ BigDye Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit του ιδίου Οίκου (**Εικόνα 2.8**).

Τα θραύσματα του DNA διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε τριχοειδές (capillary electrophoresis) και ανιχνεύονται με κάμερα laser.



Εικόνα 2.8: Το ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer του οίκου Applied Biosystems

Στα δείγματα που αναλύσαμε (προϊόντα PCR) πριν την φόρτιση έγινε καθαρισμός (Exo SAP-IT) προκειμένου να απομακρυνθούν τα dNTPs και οι ποσότητες των εκκινητών που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί. Εν συνεχεία έγινε η αντίδραση του “Cycle sequencing”

Για αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το BigDye Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) και κάθε αντίδραση περιείχε τα παρακάτω:

- | | |
|---------------------------------|--------------|
| • Big Dye Terminator | 0.25 μ l |
| • 5x Sequencing reaction buffer | 1.75 μ l |
| • εκκινητής (3.2 pmol/ μ l) | 0.5 μ l |
| • H ₂ O | 6.5 μ l |
| • PCR προϊόν | 1 μ l |

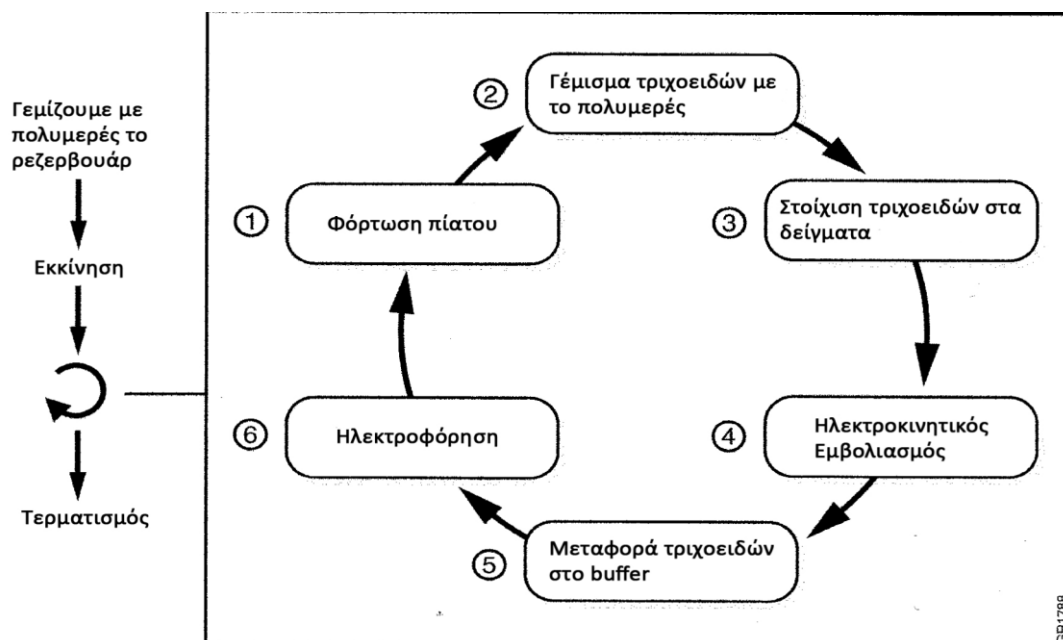
Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση του “Cycle sequencing” ήταν οι εξής:

STEP 1: 96 °C-1min

STEP 2: 96 °C-10sec
50°C -5sec
60°C-4 min
10 °C-
25κύκλοι

Τα προϊόντα της αντίδρασης του DNA sequencing υποβλήθηκαν σε καθαρισμό (EtOH precipitation) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του sequencer ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer του οίκου Applied Biosystems.

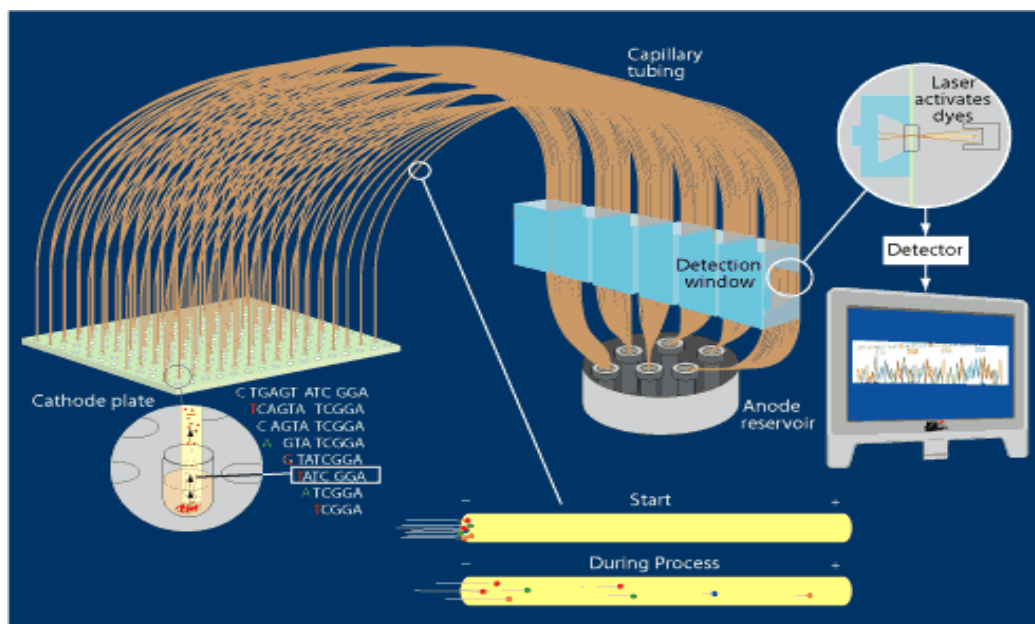
Ο κύκλος λειτουργίας του sequencer ακολουθεί διαγραμματικά στην **εικόνα 2.9**



Εικόνα 2.9: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου λειτουργίας του sequencer ABI PRISM 3100

Έπειτα από την διαδικασία καθαρισμού τα προϊόντα της αντίδρασης τοποθετήθηκαν στο sequencer ABI PRISM 3100 να την έναρξη της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης σε τριχοειδές. Γεγονότα ανά στάδιο κατά την διαδικασία της ηλεκτροφόρησης:

- i. Τοποθετούμε το πιάτο με τα δείγματα στον Αυτόματο μηχανισμό υποδοχής δείγματος
- ii. Τα τριχοειδή γεμίζουν με το 3100 POP-6 πολυμερές
- iii. Ο αυτόματος μηχανισμός δείγματος τοποθετεί τα τριχοειδή μέσα στο πιάτο που βρίσκονται τα δείγματα
- iv. Το σημειωμένο με τη χρωστική DNA φορτώνεται στα τριχοειδή μέσω σύντομης ηλεκτροφόρησης.
- v. Ο αυτόματος μηχανισμός δείγματος τοποθετεί τα τριχοειδή στο buffer για να αρχίσει η ηλεκτροφόρηση
- vi. Όταν τα δείγματα φτάσουν στον ανιχνευτή περνάνε από τη δέσμη λέιζερ
- vii. Οι φθορίζουσες εκπομπές από τα δείγματα συλλέγονται και αναλύονται από το φασματογράφο και εστιάζονται στην CCD (**Εικόνα 2.10**).



Εικόνα 2.10: Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης

2.6 Κατανομή χ^2 ή Fisher

Ο έλεγχος χ^2 αποτελεί ένα μέτρο απόστασης ανάμεσα στις παρατηρήσεις (συχνότητες κελιών) και τις αναμενόμενες συχνότητες, οι οποίες υπολογίζονται από την υπόθεση ότι δεν υπάρχει σχέση ανάμεσα στις μεταβλητές. Η τιμή του χ^2 που υπολογίζεται συγκρίνεται με τιμή από πίνακα κατανομής χ^2 για να φανεί η στατιστική σημαντικότητα. Η στατιστική διαδικασία (δηλαδή ο έλεγχος) Fisher χρησιμοποιείται στην περίπτωση που ένα ή περισσότερα κελιά έχουν αναμενόμενη συχνότητα μικρότερη ή ίση του πέντε (5). Γενικά, η διαδικασία αυτή προτείνεται για περιπτώσεις μικρού δείγματος

ΜΕΡΟΣ Γ΄

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

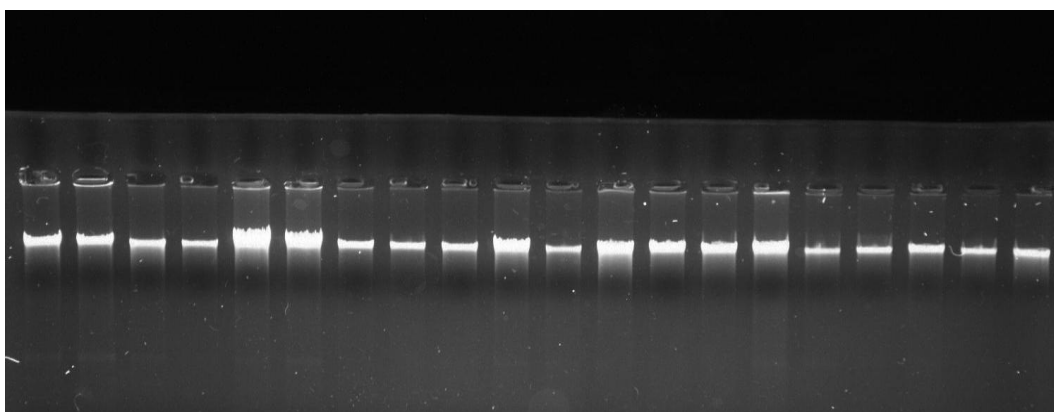
1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.1 Ηλεκτροφόρηση DNA δειγμάτων

Εκχύλιση DNA από λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε σε 20 ασθενείς που πάσχουν από ΣΚΠ και οι οποίοι δεν ελάμβαναν κορτιζόνη τρεις μήνες πριν την εισαγωγή στη μελέτη, ανοσοτροποποιητική ή ανοσοκατασταλτική αγωγή καθώς και κεντρικώς δρώντα φάρμακα όπως αντικαταθλιπτικά ή νευροληπτικά. Κάποιοι από τους ασθενείς παρουσίαζαν την RRMS (relapsing/remitting) μορφή της νόσου, άλλοι την SPMS (secondary progressive) ενώ άλλοι την CIS (Clinically Isolated Syndrome) μορφή της νόσου.

Τα δείγματα των 20 ασθενών (A1-A20) ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v όπως φαίνεται και στην **εικόνα 1.1**.

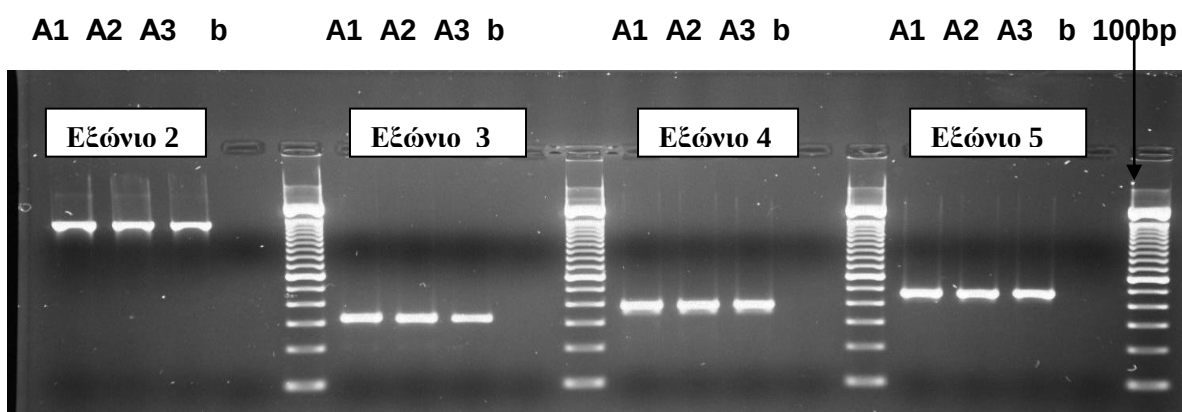
A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 A17 A18 A19 A20



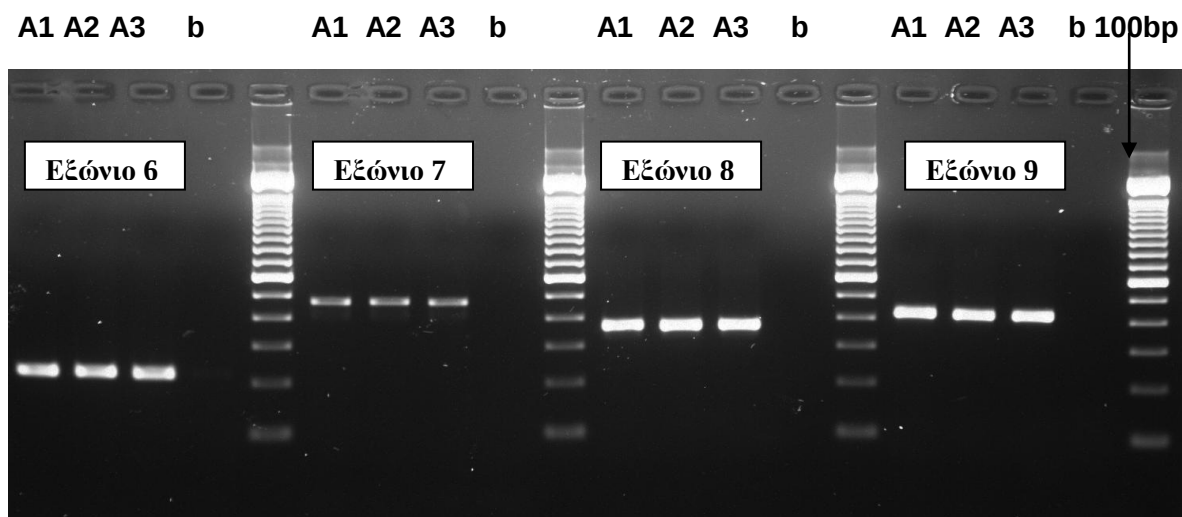
Εικόνα 1.1: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA A1-A20 σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v

1.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Τα εξώνια 2 - 9 του hGRα γονιδίου πολλαπλασιάστηκαν με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και πήραμε τα παρακάτω προϊόντα (Εικόνα 1.2α-1.2β):



Εικόνα 1.2α: Από τους ασθενείς A1, A2, A3 πήραμε τα παραπάνω προϊόντα στα εξώνια 2-5



Εικόνα 1.2β: Από τους ασθενείς A1, A2, A3 πήραμε τα παραπάνω προϊόντα στα εξώνια 6-9

1.3 DNA sequencing

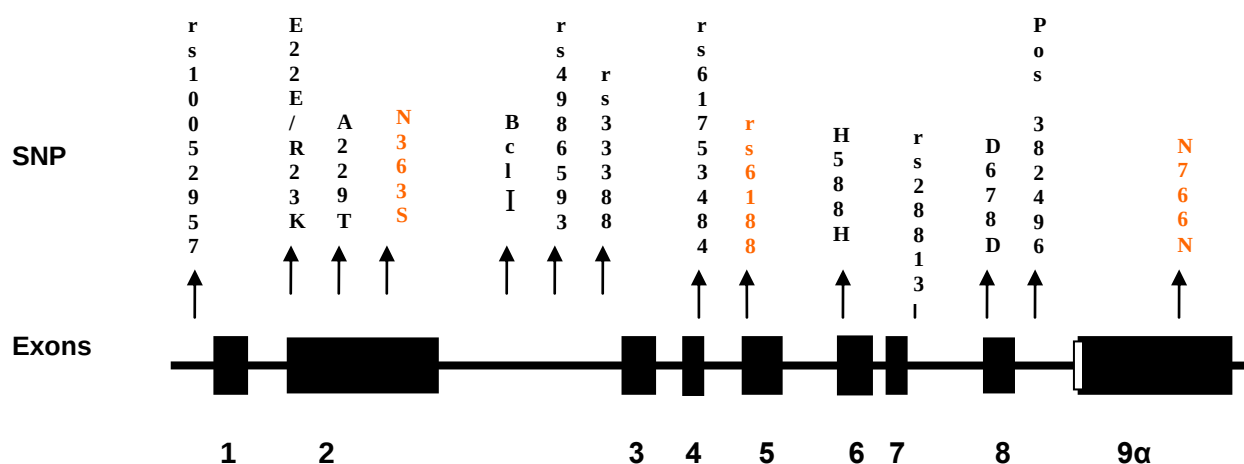
Τα προϊόντα της PCR χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση πολυμορφισμών ή μεταλλάξεων στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου με τη μέθοδο προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA (DNA sequencing).

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί αρκετοί πολυμορφισμοί του GR γονιδίου στους ασθενείς με ΣΚΠ. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA των εξωνίων 2-9 του γονιδίου ανέδειξε την παρουσία 3 πολυμορφισμών των: N363S, N766N και μια αλλαγή γουανίνης σε θυμίνη (G>T) -16 νουκλεοτίδια από την θέση ματίσματος (ιντρόνιο 4- εξώνιο 5).

Η αλλαγή ασπαραγίνης σε σερίνη στο κωδικόνιο 363 (Asn363Ser-**N363S**) ως αποτέλεσμα μιας A>G σημειακής μετάλλαξης στο νουκλεοτίδιο 1088 (rs6195) έχει συσχετισθεί με υψηλότερη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή *in vivo* σε άλλες μελέτες [214]. Πρόκειται για σημειακή μετάλλαξη στο εξώνιο 2 που αλλάζει το κωδικόνιο 363 από AAT > AGT (**Εικόνα 1.4**). Από τους 20 ασθενείς με ΣΚΠ μόνο 4 ασθενείς βρέθηκαν ετεροζυγώτες (A/G) ως προς τον πολυμορφισμό αυτό εκ των οποίων οι 2 βρισκόταν στην RRMS φάση ενώ οι άλλοι 2 στην **φάση SPMS**. Οι υπόλοιποι 16 ασθενείς βρέθηκαν να είναι ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο A. Ο πολυμορφισμός **N766N** (rs6196), αλλαγή κυτοσίνης σε θυμίνη (c.2298 C>T) (**Εικόνα 1.5**), βρίσκεται στο εξώνιο 9, στο νουκλεοτίδιο 2298. Πέντε ασθενείς βρέθηκαν ετεροζυγώτες (C/T), οι 3 ανήκαν στην φάση SPMS και οι άλλοι 2 ασθενείς στην φάση CIS. Οι υπόλοιποι 15 πάσχοντες ήταν ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο T.

Στο ιντρόνιο 4 εντοπίστηκε μια αλλαγή γουανίνης σε θυμίνη (G>T) -16 νουκλεοτίδια από την θέση ματίσματος του εξωνίου 5 (ιντρόνιο 4-εξώνιο 5; **Εικόνα 1.6**). Οκτώ ασθενείς, 2 από την RRMS φάση, 3 από την φάση SPMS και 3 από την φάση CIS βρέθηκαν ετεροζυγώτες (G/T), 9 ήταν ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο G, και 3 ήταν ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο T (**Πίνακας 1.1-1.3**).

Στην παρακάτω εικόνα (απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα οι 3 πολυμορφισμοί οι οποίοι εντοπίστηκαν σε αυτή τη μελέτη ενώ με μαύρο χρώμα οι πολυμορφισμοί που άλλες μελέτες έχουν εντοπίσει στο γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (**Εικόνα 1.3**).



Εικόνα 1.3: Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας της ισομορφής α του GR ανέδειξε την παρουσία 3 πολυμορφισμών (απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα) οι οποίοι εντοπίστηκαν σε ασθενείς με την νόσο ΣΚΠ

Οι 2 από τους 6 ασθενείς που βρίσκονται στην RRMS φάση είναι ετεροζυγώτες (A/G) ως προς τον πολυμορφισμό **N363S** (rs6195) και εμφανίζουν κλινική βελτίωση. Αντίστοιχη ετεροζυγωτία παρατηρείται και στην φάση SPMS χωρίς να εμφανίζει ο ένας εκ των δύο ασθενών απόκριση ενώ στη φάση CIS όλοι οι ασθενείς είναι ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο A. Σε αυτή τη φάση οι 6 από τους 8 ασθενείς εμφανίζουν κλινική βελτίωση, ένας εμφανίζει μέτρια βελτίωση και ο ασθενής 20 δεν εμφανίζει καμία βελτίωση (**Πίνακας 1.1**).

Στο ιντρόνιο 4 (G>T) -16 νουκλεοτίδια από την θέση ματίσματος, οι 2 από τους 6 ασθενείς που βρίσκονται στην RRMS φάση είναι ετεροζυγώτες (G/T) ως προς τον πολυμορφισμό από τους οποίους ο ένας (ασθενής 1) εμφανίζει μέτρια βελτίωση ενώ ο άλλος (ασθενής 8) δεν αποκρίνεται στη θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη. Από τους 6 ασθενείς που βρίσκονται στην φάση SPMS οι 3 είναι ετεροζυγώτες ως προς τον πολυμορφισμό, οι 2 από τους 6 εμφανίζουν ομοζυγωτία ως προς το G αλληλόμορφο ενώ ο ασθενής 4 είναι ομόζυγος ως προς το αλληλόμορφο A (**Πίνακας 1.2**). Ποικιλομορφία παρατηρείται ως προς την κλινική βελτίωση των ασθενών αυτής της φάσης καθώς οι 2 από τους 3 ετεροζυγώτες δεν αποκρίνονται στη θεραπεία όπως και οι ομοζυγώτες ως προς το αλληλόμορφο G. Μόνο ο ασθενής 4 (ομόζυγος ως προς T) και ο ασθενής 16 (ετερόζυγος) αποκρίνονται θετικά. Στην φάση CIS οι 3 μόνο από τους 8 ασθενείς είναι ετεροζυγώτες, οι υπόλοιποι 3 είναι ομοζυγώτες ως προς το αλληλόμορφο G και οι 2 στους 8 είναι ομοζυγώτες ως προς το αλληλόμορφο T. Κλινική βελτίωση παρατηρείται σε όλους τους ασθενείς εκτός από τον ασθενή 13 (ετερόζυγος) που εμφανίζει μέτρια βελτίωση και τον ασθενή 20 (ομόζυγος ως προς αλληλόμορφο G) ο οποίος αποκρίνεται αρνητικά (**Πίνακας 1.3**).

Πίνακας 1.1: Συσχέτιση RRMS φάσης με την κλινική απόκριση των ασθενών στην θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη και τους πολυμορφισμούς N766N, -16 G/T και N363S.

Ασθενείς	RRMS Ασθενείς	Κλινική απόκριση	Exon 9:c.2298 C/T p.N766N, rs6196	Intron 4 -16 G/T, rs6188	Exon 2: c.1088 A/G p.N363S, rs6195
1	RRMS	Medium improvement	T	G/T	A
3	RRMS	Yes	T	G	A/G
8	RRMS	No	T	G/T	A
9	RRMS	Yes	T	G	A/G
14	RRMS	Yes	T	G	A
17	RRMS	Yes	T	G	A

Πίνακας 1.2: Συσχέτιση SPMS φάσης με την κλινική απόκριση των ασθενών στην θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη και τους πολυμορφισμούς N766N, -16 G/T και N363S.

Ασθενείς	SPMS Ασθενείς	Κλινική απόκριση	Exon 9:c.2298 C/T p.N766N, rs6196	Intron 4 -16 G/T, rs6188	Exon 2: c.1088 A/G p.N363S, rs6195
2	SPMS	No	T	G/T	A
4	SPMS	Yes	C/T	T	A/G
7	SPMS	No	T	G	A
11	SPMS	No	C/T	G	A/G
15	SPMS	No	T	G/T	A
16	SPMS	Yes	C/T	G/T	A

Πίνακας 1.3: Συσχέτιση CIS φάσης με την κλινική απόκριση των ασθενών στην θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη και τους πολυμορφισμούς N766N, -16 G/T και N363S.

Ασθενείς	CIS Ασθενείς	Κλινική απόκριση	Exon 9:c.2298 C/T p.N766N, rs6196	Intron 4 -16 G/T, rs6188	Exon 2: c.1088 A/G p.N363S, rs6195
5	CIS	Yes	T	G/T	A
6	CIS	Yes	T	G	A
10	CIS	Yes	T	G	A
12	CIS	Yes	C/T	T	A
13	CIS	Medium improvement	T	G/T	A
18	CIS	Yes	T	T	A
19	CIS	Yes	C/T	G/T	A
20	CIS	No	T	G	A

Στο εξώνιο 9, στη φάση RRMS όλοι οι ασθενείς είναι ομόζυγοι (T) ως προς τον πολυμορφισμό N766N (rs6196). Οι 4 από τους 6 εμφανίζουν θετική απόκριση, ο ασθενής 1 εμφανίζει μέτρια απόκριση στη θεραπεία και ο ασθενής 8 δεν αποκρίνεται. Στη φάση SPMS το 50% των ασθενών είναι ετερόζυγοι (C/T) ως προς τον πολυμορφισμό από τους οποίους οι 2 αποκρίνονται στη θεραπεία ενώ ο ασθενής 11 δεν εμφανίζει κλινική βελτίωση. Οι υπόλοιποι ασθενείς είναι ομόζυγοι ως προς το αλληλόμορφο T και δεν εμφανίζουν κλινική βελτίωση.

Ετεροζυγωτία εμφανίζουν και οι 2 από τους 8 ασθενείς που βρίσκονται στην φάση CIS οι οποίοι αποκρίνονται θετικά στη θεραπεία. Οι υπόλοιποι ασθενείς είναι ομόζυγοι ως προς το αλληλόμορφο T εκ των οποίων οι 4 αποκρίνονται στη θεραπεία, ο ασθενής 13 εμφανίζει μέτρια απόκριση ενώ ο ασθενής 20 δεν εμφανίζει κάποια κλινική βελτίωση.

Επιπρόσθετα, έγινε ταξινόμηση των ασθενών σε δύο κατηγορίες: κλινικής απόκρισης και μη κλινικής απόκρισης προκειμένου να γίνει συνολική συσχέτιση των ασθενών που αποκρίνονται στην θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη (12 ασθενείς) και εκείνων που δεν αποκρίνονται στην θεραπεία (6 ασθενείς). Από αυτή τη ταξινόμηση διαπιστώθηκε ότι 3 από τους 12 ασθενείς που αποκρίθηκαν θετικά στην θεραπεία βρέθηκαν να είναι ετεροζυγώτες (A/G) ως προς τον N363S πολυμορφισμό, 3 από τους 12 βρέθηκαν να είναι ετεροζυγώτες (G/T) ως προς τον πολυμορφισμό που εντοπίστηκε -16 νουκλεοτίδια από την θέση ματίσματος (ιντρόνιο 4- εξώνιο 5), 6 από τους 12 να είναι ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο G και 3 από τους 12 να είναι ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο T του ίδιου πολυμορφισμού. Όσον αφορά τον N766N πολυμορφισμό, 4 από τους 12 ασθενείς βρέθηκαν να είναι ετερόζυγοι (C/T) ενώ οι υπόλοιποι ήταν ομόζυγοι για το T αλληλόμορφο (**Πίνακας 1.4**).

Πίνακας 1.4: Συσχέτιση των ασθενών που αποκρίνονται στην θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη με τους πολυμορφισμούς N766N, -16 G/T και N363S.

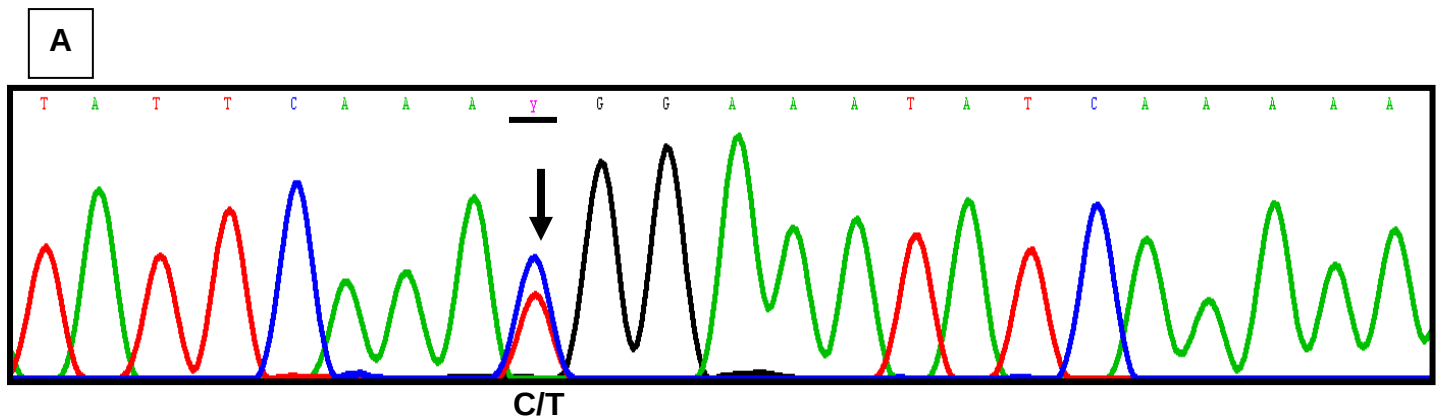
Κλινική απόκριση	Exon 9:c.2298 C/T p.N766N, rs6196	Intron 4 -16 G/T rs6188	Exon 2: c.1088 A/G, p.N363S, rs6195
Ασθενής 3	T	G	A/G
Ασθενής 4	C/T	T	A/G
Ασθενής 5	T	G/T	A
Ασθενής 6	T	G	A
Ασθενής 9	T	G	A/G
Ασθενής 10	T	G	A
Ασθενής 12	C/T	T	A
Ασθενής 14	T	G	A
Ασθενής 16	C/T	G/T	A
Ασθενής 17	T	G	A
Ασθενής 18	T	T	A
Ασθενής 19	C/T	G/T	A
Αριθμός γονοτύπων	TT: 8 C/T: 4	TT: 3 GG: 6 G/T: 3	AA: 9 A/G: 3

Από τους ασθενείς που δεν αποκρίθηκαν στην θεραπεία μόνο ένας ασθενής βρέθηκε να είναι ετεροζυγώτης (G/T) για τον N363S και για τον N766N πολυμορφισμό ενώ 3 από τους 6 ασθενείς βρέθηκαν να είναι ετεροζυγώτες (G/T) για τον πολυμορφισμό που εντοπίστηκε -16 νουκλεοτίδια από την θέση ματίσματος (ιντρόνιο 4- εξώνιο 5) (**Πίνακας 1.5**). Ο τελευταίος πολυμορφισμός που προαναφέρθηκε φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα ετεροζυγωτίας (G/T) στους ασθενείς που δεν αποκρίνονται στην θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη σε σύγκριση με τους ασθενείς που εμφανίζουν κλινική βελτίωση (**Πίνακας 1.4-1.5**).

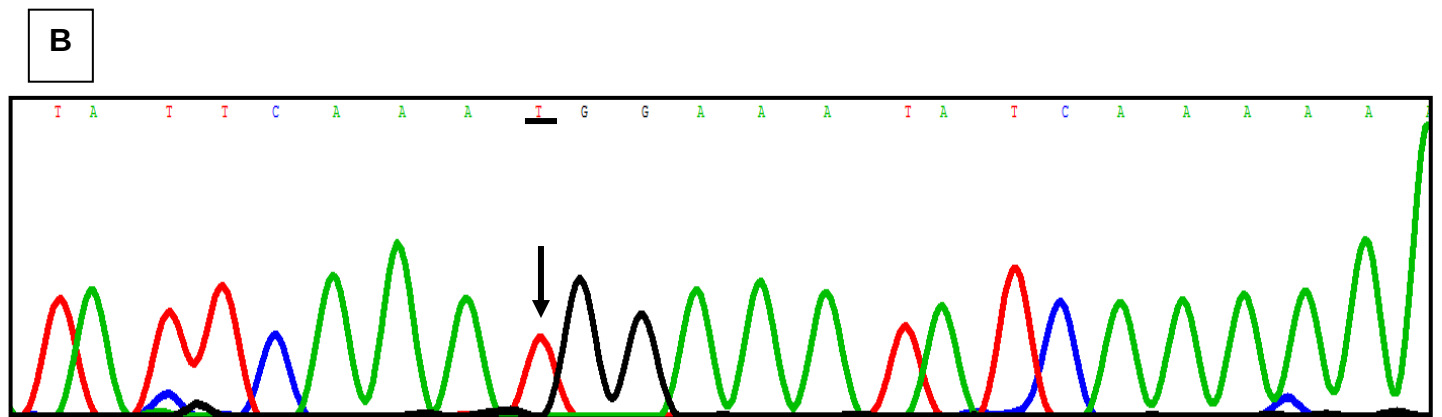
Πίνακας 1.5: Συσχέτιση των ασθενών που δεν αποκρίνονται στην θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη με τους πολυμορφισμούς N766N, -16 G/T και N363S.

Μη κλινική απόκριση	Exon 9:c.2298 C/T p.N766N, rs6196	Intron 4 -16 G/T, rs6188	Exon 2: c.1088 A/G p.N363S, rs6195
Ασθενής 2	T	G/T	A
Ασθενής 7	T	G	A
Ασθενής 8	T	G/T	A
Ασθενής 11	C/T	G	A/G
Ασθενής 15	T	G/T	A
Ασθενής 20	T	G	A
Αριθμός γονοτύπων	TT: 5 C/T: 1	GG: 3 G/T: 3	AA: 5 A/G: 1

Εικόνα 1.4: Χρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του εξωνίου 9 στην περιοχή γύρω από το κωδικόνιο 766
rs 6196: Εξώνιο 9 c.C2298T, p. N766N

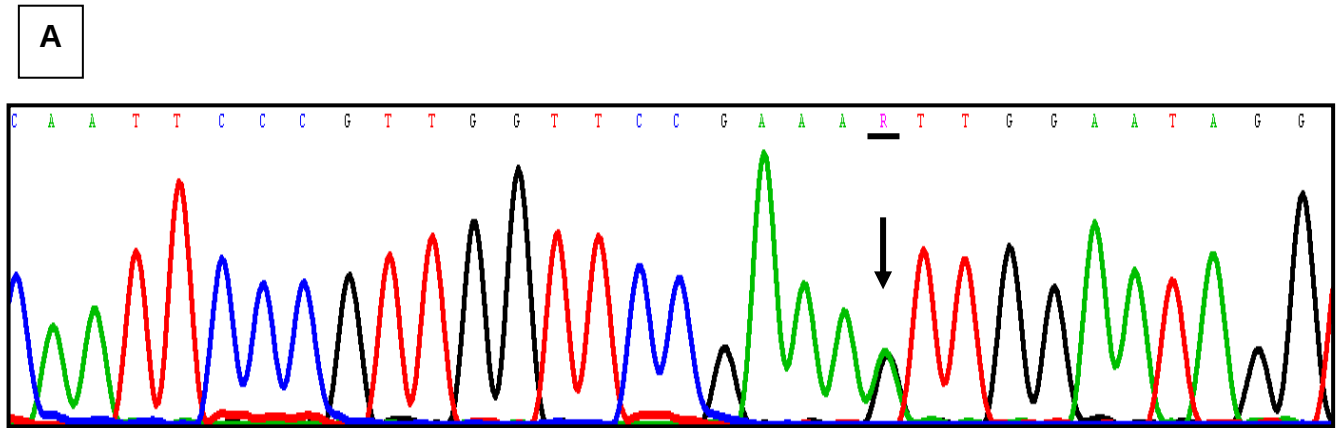


A: Ο ασθενής 1 είναι ετεροζυγώτης ως προς τον πολυμορφισμό N766N και στο π.2298 παρουσιάζει αλλαγή κυτοσίνης σε θυμίνη (c.2298 C>T)



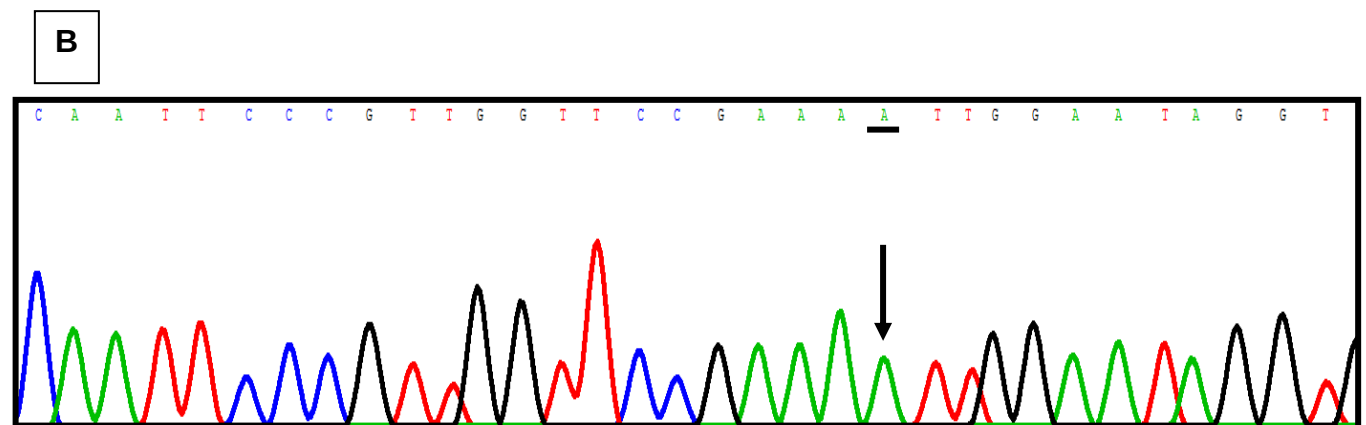
B: Ο ασθενής 2 είναι ομοζυγώτης ως προς τον πολυμορφισμό N766N και στο c.2298 παρουσιάζει θυμίνη (T)

**Εικόνα 1.5: Χρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του εξωνίου 2 στην περιοχή γύρω από το κωδικόνιο 363
rs 6195: Εξώνιο 2 c.A1088G, p. N363S**



G/A

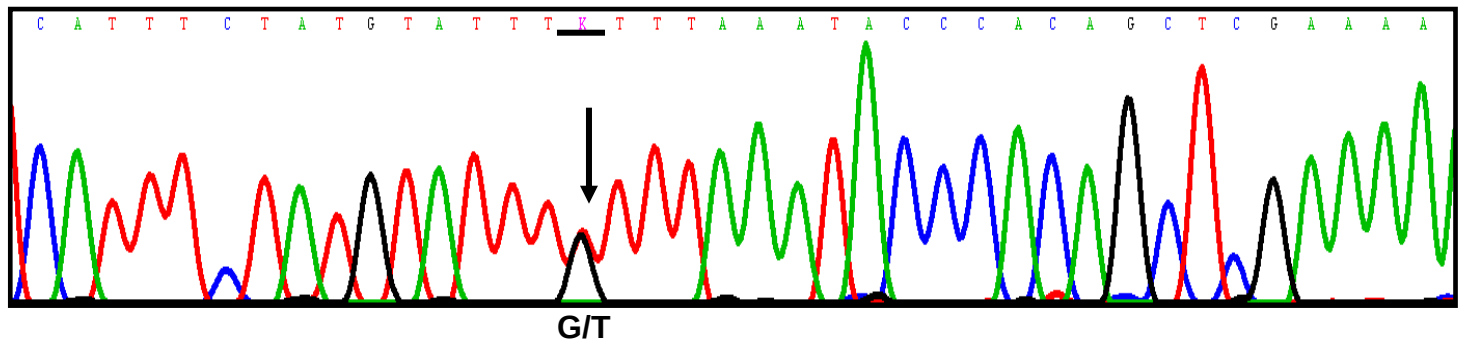
A: Ο ασθενής 3 είναι ετεροζυγώτης ως προς τον πολυμορφισμό N363S και στο π.1088 παρουσιάζει αλλαγή αδενίνης σε γουανίνη (c.1088, A>G).



B: Ο ασθενής 2 είναι ομοζυγώτης ως προς τον πολυμορφισμό N363S και στο c.1088 παρουσιάζει

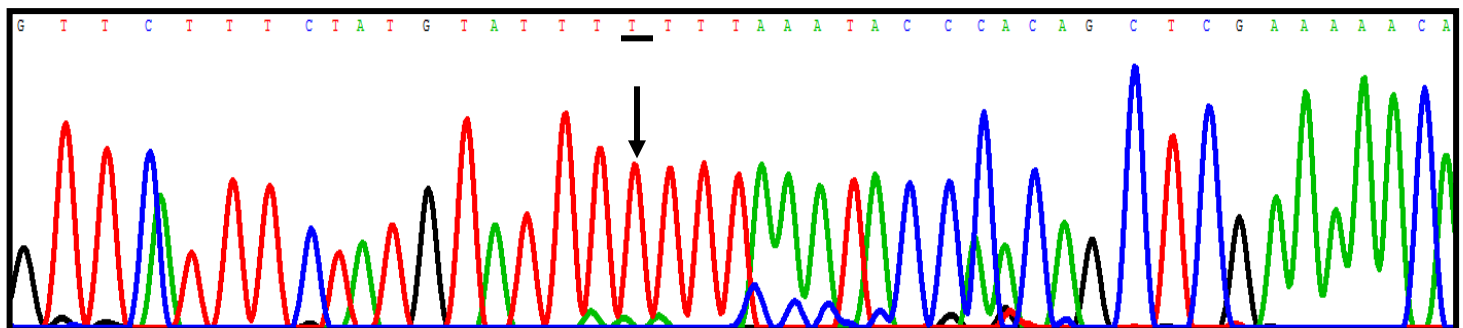
Εικόνα 1.6: Χρωματογράφημα μέρους της αλληλουχίας του ιντρονίου 4 (εξώνιο 5).
Αλλαγή γουανίνης σε θυμίνη (G>T) -16 νουκλεοτίδια από την θέση ματίσματος
rs6188

A



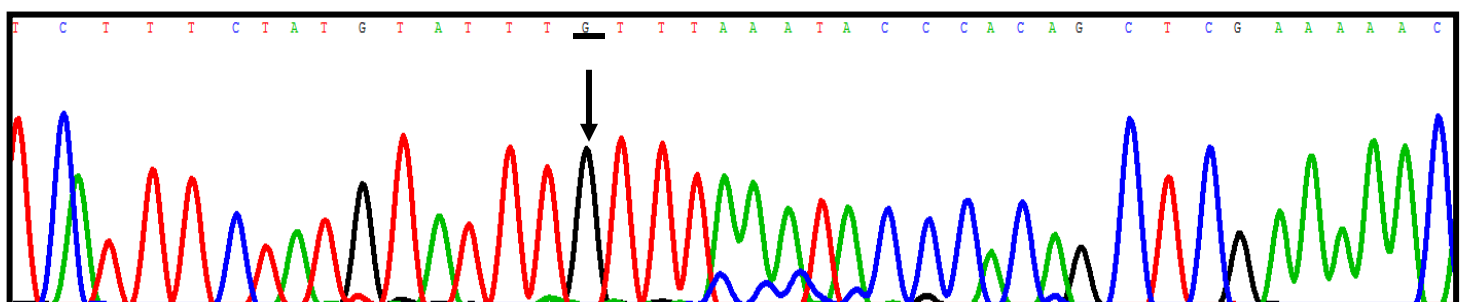
A: Ο ασθενής 3 είναι ετεροζυγώτης ως προς τον πολυμορφισμό rs6188 και παρουσιάζει μια αλλαγή γουανίνης σε θυμίνη (G>T) -16 νουκλεοτίδια από την θέση ματίσματος

B



B: Ο ασθενής 7 είναι ομοζυγώτης ως προς τον πολυμορφισμό rs6188 και παρουσιάζει μια αλλαγή θυμίνης

Γ



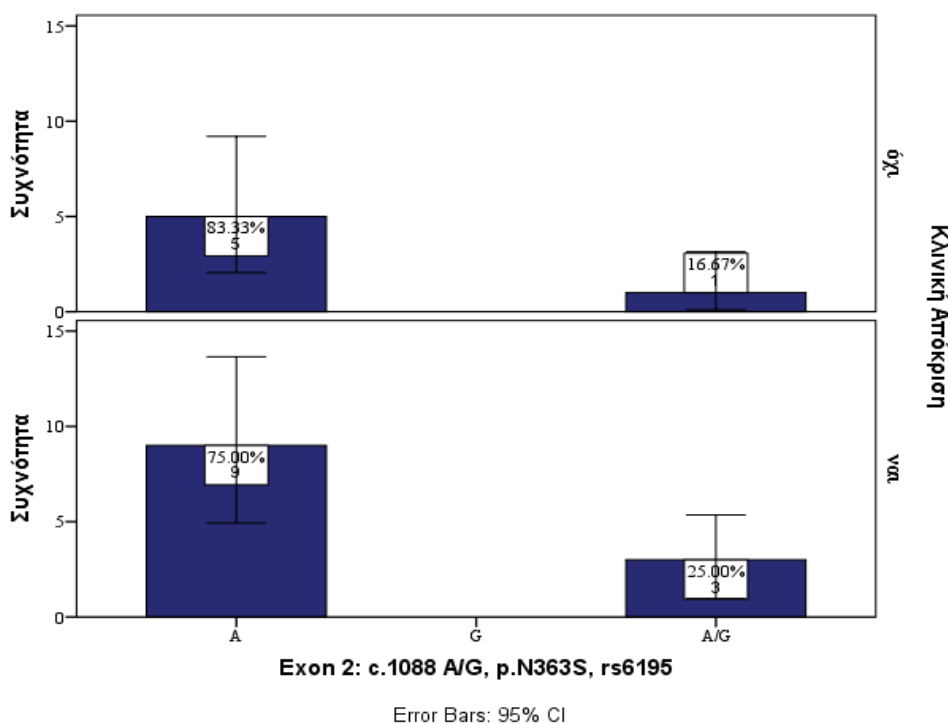
Γ: Ο ασθενής 7 είναι ομοζυγώτης ως προς τον πολυμορφισμό rs6188 και παρουσιάζει μια αλλαγή γουανίνης

1.4 Στατιστική Ανάλυση

Οι κατηγορικές μεταβλητές περιγράφονται ως συχνότητες και ποσοστά (%). Η διαδικασία χ^2 ή/και **Fisher** χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της υπόθεσης και βρέθηκε να μην υπάρχει συσχετισμός μεταξύ των 3 πολυμορφισμών και της κλινικής απόκρισης των ασθενών. Κανένα από τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικό αφού η τιμή p παρέμεινε πάνω από το όριο 0.05 (95% διάστημα εμπιστοσύνης).

Πολυμορφισμός Exon 2: c.1088 A/G, p.N363S, rs6195:

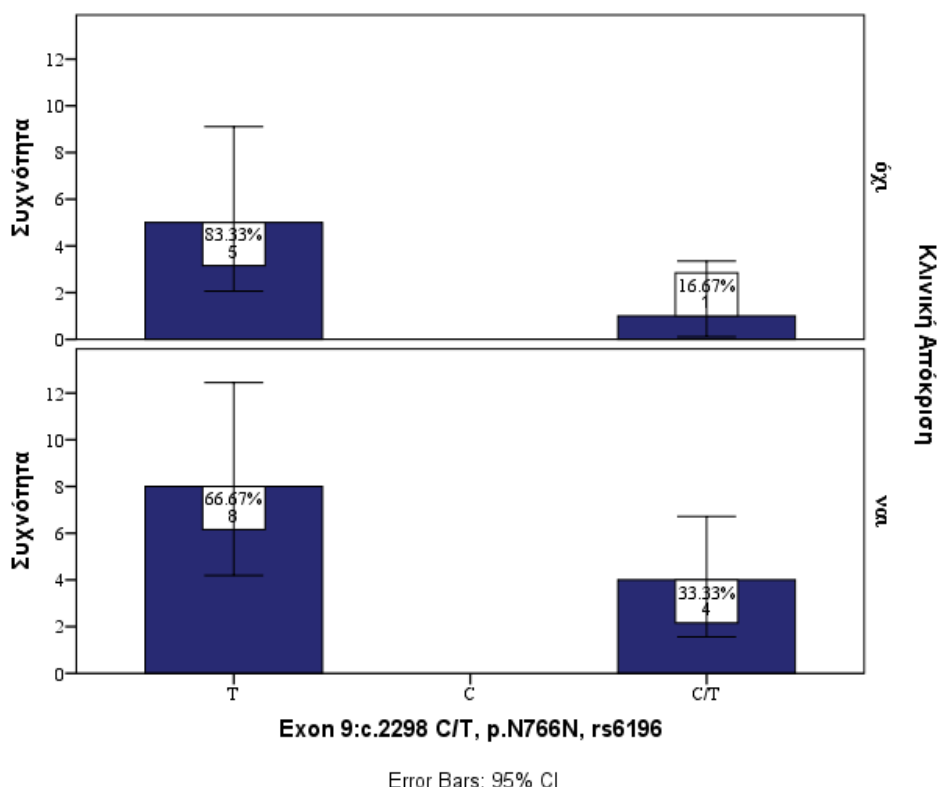
Το ποσοστό των γονοτύπων **AA** ήταν υψηλότερο από το ποσοστό των γονοτύπων **A/G** ανεξάρτητα αν οι ασθενείς παρουσίασαν ή όχι κλινική απόκριση (βλ. **σχήμα 1**). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς χωρίς κλινική απόκριση είχαν ποσοστό γονοτύπων **AA** 83.33%, ενώ γονοτύπων **A/G** 16.67%. Οι ασθενείς με κλινική απόκριση παρουσίασαν ποσοστά 75% και 25% αντίστοιχα. Και στις δυο περιπτώσεις δεν βρέθηκαν γονότυποι **GG**.



Σχήμα 1: Ανάλυση γονοτύπων-Πολυμορφισμός Exon 2: c.1088 A/G, p.N363S, rs6195 και κλινική απόκριση ασθενών. $\chi^2 = 1.61$, Fisher's $p = 0.593$.

Πολυμορφισμός Exon 9:c.2298 C/T, p.N766N, rs6196:

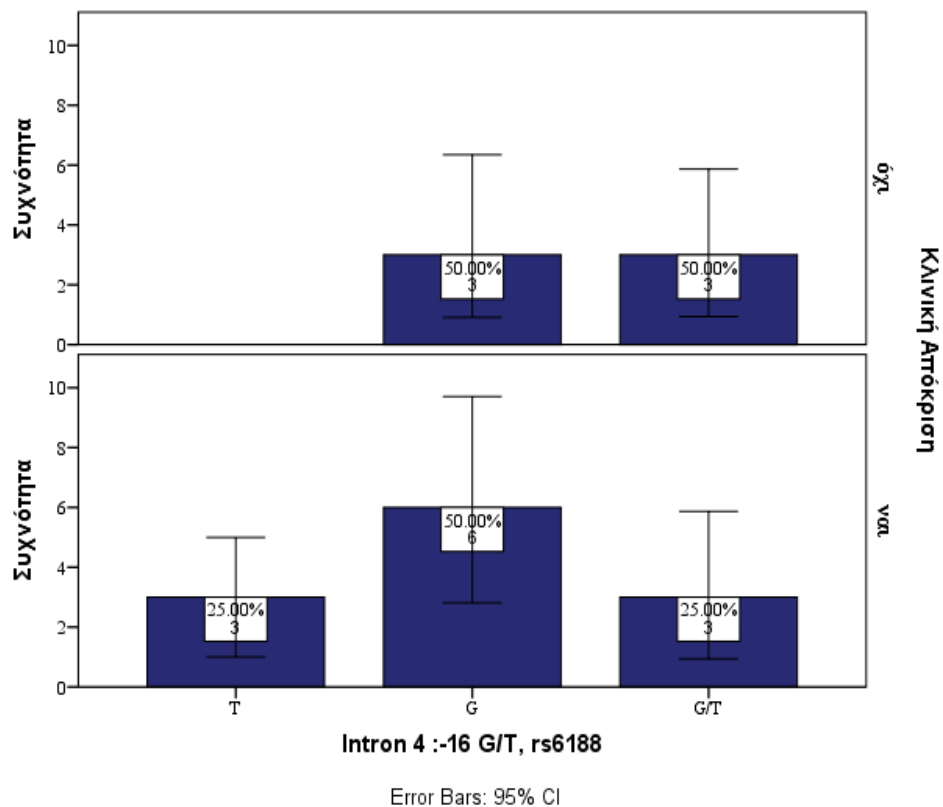
Το ποσοστό των γονοτύπων **ΤΤ** ήταν υψηλότερο από το ποσοστό των γονοτύπων **С/Т** ανεξάρτητα αν οι ασθενείς παρουσίασαν ή όχι κλινική απόκριση (βλ. **σχήμα 2**). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς χωρίς κλινική απόκριση είχαν ποσοστό γονοτύπων **ΤΤ** 83.33%, ενώ γονοτύπων **С/Т** 16.67%. Οι ασθενείς με κλινική απόκριση παρουσίασαν ποσοστά 66.67% και 33.33% αντίστοιχα. Και στις δυο περιπτώσεις δεν βρέθηκαν γονότυποι **СС**.



Σχήμα 2: Ανάλυση γονοτύπων-Πολυμορφισμός Exon 9:c.2298 C/T, p.N766N, rs6196 και κλινική απόκριση ασθενών. $\chi^2 = 0.554$, Fisher's $p = 0.439$.

Πολυμορφισμός Intron 4 :-16 G/T, rs6188:

Το ποσοστό των γονοτύπων **GG** ήταν ίσο και στις δυο περιπτώσεις κλινικής απόκρισης (βλ. **σχήμα 3**). Αντίθετα, το ποσοστό των **G/T** γονοτύπων ήταν υψηλότερο όταν δεν υπήρχε κλινική απόκριση από τους ασθενείς. Σε αυτή την περίπτωση επίσης δεν παρουσιάστηκαν γονότυποι **TT**.



Σχήμα 3: Ανάλυση γονοτύπων-Πολυμορφισμός Intron 4 :-16 G/T, rs6188 και κλινική απόκριση ασθενών: $\chi^2 = 2.25$, $p = 0.325$.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο σκοπός της παρούσης διπλωματικής εργασίας ήταν: 1) ο προσδιορισμός της αλληλουχίας της ισομορφής α του GR σε 20 δείγματα DNA ασθενών με ΣΚΠ και η ανάδειξη μοριακών αλλαγών (μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών) που σχετίζονται με την ΣΚΠ νόσο, 2) η συσχέτιση της ύπαρξης μοριακών αλλαγών στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με την απόκριση ή όχι στη χορηγούμενη θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη και την κλινική βελτίωση των ασθενών με τη νόσο της ΣΚΠ.

Στην παρούσα εργασία **για πρώτη φορά** στον Ελληνικό χώρο αναλύθηκε με απ'ευθείας αλληλούχιση ολόκληρη η κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου σε ασθενείς με ΣΚΠ και αναδείχθηκε η παρουσία 3 πολυμορφισμών των: N363S, N766N και μια αλλαγή γουανίνης σε θυμίνη (G>T) -16 νουκλεοτίδια από την θέση ματίσματος (ιντρόνιο 4 -εξώνιο 5).

Ο N363S πολυμορφισμός σε άλλες μελέτες που σχετίζονταν με την επίδραση των πολυμορφισμών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε ασθενείς με ΣΚΠ έχει αποδειχθεί ότι επάγει μειωμένη ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή και έχει συσχετιστεί με έναν πιο "επιθετικό" φαινότυπο στην ΣΚΠ (**L.M.L van Winsen et.al., 2007**). Στην εργασία αυτή ο παραπάνω πολυμορφισμός συσχετίστηκε με την απόκριση στην θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη των πασχόντων και δεν βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση της κλινικής απόκρισης και του πολυμορφισμού.

Ο N766N (rs6196) πολυμορφισμός είναι γνωστός πολυμορφισμός, δεν έχει όμως συσχετιστεί από προηγούμενες μελέτες με την ΣΚΠ. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας της ισομορφής α του GR ανέδειξε μια αλλαγή κυτοσίνης σε θυμίνη, c.2298 C>T, στο εξώνιο 9, N766N. Από τους 20 ασθενείς οι 5 είναι ετεροζυγώτες. Οι 3 ασθενείς βρισκόταν στην SPMS φάση ενώ οι υπόλοιποι 2 βρισκόταν στην CIS φάση παρουσιάζοντας κλινική βελτίωση. Οι 2 από τους 3 ετεροζυγώτες της SPMS φάσης παρουσίαζαν κλινική βελτίωση ενώ ο ασθενής 11 δεν αποκρίθηκε στην θεραπεία. Η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε συσχέτιση της κλινικής απόκρισης στην θεραπεία με τον πολυμορφισμό.

Ενας τρίτος νέος πολυμορφισμός προσδιορίστηκε στην παρούσα μελέτη. Πρόκειται για μια αλλαγή γουανίνης σε θυμίνη (G>T) -16 νουκλεοτίδια από την θέση ματίσματος (ιντρόνιο 4- εξώνιο 5). Ετεροζυγωτία εμφάνισαν οι 8 από τους 20

πάσχοντες από τους οποίους οι 2 βρισκόταν στην φάση RRMS με τον ασθενή 1 να παρουσιάζει μέτρια κλινική βελτίωση και τον ασθενή 8 να μην αποκρίνεται στην θεραπεία. Οι 3 ασθενείς από τους 20 βρισκόταν στην SPMS φάση με τον ασθενή 11 να μην αποκρίνεται και τους ασθενείς 4 και 16 να αποκρίνονται θετικά στην θεραπεία. Τέλος, οι 2 ασθενείς της CIS φάσης εμφάνιζαν κλινική βελτίωση στην θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη. Ανεξάρτητα από την φάση των ασθενών η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε να συσχετίζεται η κλινική απόκριση των ασθενών με τον πολυμορφισμό.

Οι μέχρι σήμερα μελέτες έχουν συσχετίσει 3 πολυμορφισμούς (N363S, ER22/23EK, *BclI*G) με την νόσο, δεν έχουν όμως αναλύσει ολόκληρη την κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου όπως έγινε στην παρούσα μελέτη ^[169, 211, 214]. Από τους 3 παραπάνω πολυμορφισμούς μόνο ο N363S εντοπίστηκε και στην παρούσα μελέτη.

Σύμφωνα με την μελέτη των L.M.L van Winsen et.al., 2007 ^[169] ο ER22/23EK πολυμορφισμός επιδρά είτε στη φλεγμονή είτε στην αξονική απώλεια των ασθενών με ΣΚΠ, επάγει μειωμένη ευαισθησία στα GC και σχετίζεται με έναν πιο “επιθετικό” φαινότυπο στην ΣΚΠ.

Η ανίχνευση της παρουσίας του *BclI* πολυμορφισμού γίνεται με πέψη PCR προϊόντων με το περιοριστικό ένζυμο *BclI* και πρόκειται για αντικατάσταση του T $\underline{G}$ ATCA σε T $\underline{C}$ ATCA στο ιντρόνιο 2, 646 ζεύγη βάσεων από το εξώνιο 2 ^[175]. Στους ασθενείς με ΣΚΠ δεν έχει βρεθεί να συσχετίζεται με εναλλασόμενη ευαισθησία στα GC ^[169].

Συμπερασματικά, η αλληλούχιση της ισομορφής α του GR γονιδίου δεν ανέδειξε την παρουσία παθολογικής μετάλλαξης σε κανένα από τους 20 ασθενείς που μελετήθηκαν. Ανέδειξε όμως την παρουσία 3 πολυμορφισμών των: N363S, N766N και την αλλαγή γουανίνης σε θυμίνη (G>T) -16 νουκλεοτίδια από την θέση ματίσματος (ιντρόνιο 4- εξώνιο 5). Ο N363S πολυμορφισμός είχε αναδειχθεί και από προηγούμενες μελέτες να σχετίζεται με την ΣΚΠ νόσο ενώ οι άλλοι δύο πολυμορφισμοί για πρώτη φορά συσχετίζονται με την νόσο από την παρούσα μελέτη.

Επίσης, έγινε συσχέτιση της κλινικής απόκρισης των ασθενών με ΣΚΠ στην θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη με τον κάθε πολυμορφισμό. Από την στατιστική ανάλυση (χ^2 ή/και **Fisher**) βρέθηκε να μην υπάρχει συσχετισμός μεταξύ των 3 πολυμορφισμών και της κλινικής απόκρισης των ασθενών ενώ κανένα από τα

αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικό αφού η τιμή p παρέμεινε πάνω από το όριο 0.05. Αντίθετα, παλαιότερη μελέτη των Lisa L.M van Winsen (2007) έδειξε να υπάρχει συσχέτιση του N363S πολυμορφισμού και της απόκρισης των ασθενών στην θεραπεία με δεξαμεθαζόνη καθώς το μέγεθος του δείγματος των ασθενών ήταν σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό της παρούσας μελέτης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η **πολλαπλή σκλήρυνση ή σκλήρυνση κατά πλάκας** (*multiple sclerosis, MS*), είναι μια χρόνια νευρολογική, αυτοάνοση ασθένεια κατά την οποία το ανοσοποιητικό σύστημα επιτίθεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα προκαλώντας απομυελίνωση.

Η αγωγή με κορτικοστεροειδή (μεθυλπρεδνιζολόνη) μπορεί να μειώσει τόσο την εξέλιξη της υποτροπής της νόσου όσο και τη μακροπρόθεσμη έκβασή της. Μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις ή πολυμορφισμοί στο γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών καθιστούν τα άτομα ανθεκτικά ή υπερευαίσθητα στα γλυκοκορτικοειδή.

Συνεπώς, σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν: α) ο προσδιορισμός της αλληλουχίας της ισομορφής α του GR σε 20 δείγματα DNA ασθενών με ΣΚΠ και η ανάδειξη μοριακών αλλαγών (πολυμορφισμών ή μεταλλάξεων), που σχετίζονται με την ΣΚΠ νόσο, β) η συσχέτιση των μοριακών αλλαγών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με την απόκριση ή όχι στη χορηγούμενη θεραπεία με μεθυλπρεδνιζολόνη και την κλινική βελτίωση των ασθενών με τη νόσο της ΣΚΠ.

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την μελέτη της κωδικοποιούσας περιοχής της ισομορφής α του GR γονιδίου ήταν: 1) Απομόνωση γονιδιακού DNA από περιφερικό αίμα των ασθενών με ΣΚΠ, 2) Εκλεκτικός πολλαπλασιασμός των εξωνίων του GR γονιδίου με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) και 3) Ανίχνευση μεταλλάξεων ή πολυμορφισμών με την μέθοδο αλληλούχησης του DNA (sequencing).

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας δεν ανέδειξε την παρουσία παθολογικής μετάλλαξης. Ανιχνεύτηκαν 3 πολυμορφισμοί: οι N363S, N766N και μια αλλαγή γουανίνης σε θυμίνη (G>T) -16 νουκλεοτίδια πριν την θέση ματίσματος (ιντρόνιο 4-εξώνιο 5). Έγινε συσχέτιση του κάθε πολυμορφισμού και της κλινικής απόκρισης στη θεραπεία και η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι δεν υπάρχει συσχετισμός μεταξύ των 3 πολυμορφισμών και της κλινικής απόκρισης των ασθενών ενώ κανένα από τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικό αφού η τιμή p παρέμεινε πάνω από το όριο 0.05.

SUMMARY

Multiple sclerosis or MS (multiple sclerosis, MS), is a chronic neurological, autoimmune disease in which the immune system attacks the central nervous system causing demyelination.

Treatment with corticosteroids (methylprednisolone) can reduce both the development of recurrent disease and the long-term outcome. Studies have shown that mutations or polymorphisms in the glucocorticoid receptor make persons resistant or hypersensitive to glucocorticoids.

The purpose of the present study was: a) to determine the sequence of isoform α of the GR gene in 20 DNA samples of patients with MS disease and the presence of molecular alterations (mutations or polymorphisms) associated with MS disease, b) the correlation of molecular changes of glucocorticoid receptor to the response or not in administered methylprednisolone therapy and clinical improvement of patients with MS disease.

The methodology used to study the coding region of isoform α of GR gene was: 1) Isolation of genomic DNA from peripheral blood of patients with MS, 2) Selective amplification of exons of the GR gene by the polymerase chain reaction (PCR) and 3) Detection of mutations or polymorphisms DNA sequencing method.

DNA sequencing did not reveal the presence of pathological mutation but only the detection of 3 polymorphisms: N363S, N766N and a guanine to thymine change (G> T) -16 nucleotides before the splice cite (intron 4 - exon 5). We tried to make a correlation between the above 3 polymorphisms and the clinical response to treatment. The statistical analysis showed that there was no correlation and that none of the results were not statistically significant ($p>0.05$).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Keirstead H S, T Ben-Hur, B Rogister, et al., 1999, Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule-Positive CNS Precursors Generate Both Oligodendrocytes and Schwann Cells to Remyelinate the CNS after Transplantation. J Neurosci. 19(17):7529-7536.
2. Robert J Fox, MD, Patrick J. Sweeney, 2004, MD. Multiple Sclerosis. Cleve Clin J Med. Chapter outline.
3. Γρηγοράκης Δ. Διατροφή & Σκλήρυνση κατά Πλάκας. Εκδόσεις Βήτα, Αθήνα, 2003.
4. Parris M. Kidd, PhD. 2001, Multiple Sclerosis, An Autoimmune Inflammatory Disease: Prospects for its Integrative Management. Med Rev 6(6):540-566.
5. Keirstead H S, T Ben-Hur, B Rogister, et al., 1999, Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule-Positive CNS Precursors Generate Both Oligodendrocytes and Schwann Cells to Remyelinate the CNS after Transplantation. Neurosci. 19(17):7529-7536.
6. Parris M. Kidd, PhD. Multiple Sclerosis, 2001, An Autoimmune Inflammatory Disease: Prospects for its Integrative Management. Med Rev 6(6):540-566.
7. Λογοθέτη Α Ιωάννη. Νευρολογία Β΄ Έκδοση. Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών, Θεσσαλονίκη, 1988.
8. Sharon Warren, Kenneth G. Warren. 2004, Πολλαπλή σκλήρυνση. Εκδόσεις Βήτα, Αθήνα.
9. Lorraine de S. 1997, Θεραπευτική προσέγγιση στη Σκλήρυνση κατά Πλάκας. Εκδόσεις Έλλην.
10. Andreoli, Bennett, Carpenter, Plum, et al. 1996, Cecil Παθολογία Γ΄ Έκδοση, Β΄ Τόμος. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.
11. Polman CH, Reingold SC, Edan G et al., 2005, Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". Ann Neurol. 58(6):840-6).

12. Goodin DS. 2005, Treatment of multiple sclerosis with human beta interferon. *Int MS J.* 12(3):96-108.
13. Farell R, Heaney D, Giovannoni G. 2005, Emerging therapies in multiple sclerosis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 10(4):797-816).
14. Wolinsky JS. 2006, The use of glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *Adv Neurol.* 98:273-92).
15. Etemadifar M, Janghorbani M, Shaygannejad V. 2006, Comparison of Betaferon, Avonex, and Rebif in treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 113(5):283-7).
16. Morrissey SP, Le Page E, Edam G. 2005, Mitoxantrone in the treatment of multiple sclerosis. *Int MS J.* 12(3):74-87.
17. Long et al., 1940, The adrenal cortex and carbohydrate metabolism. *Endocrinology.*
18. Carmen Sandi. 2004, Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules, *Nature Reviews Neuroscience* 5, 917.
19. Rhen T, Cidlowski JA. 2005, "Antiinflammatory action of glucocorticoids-- new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.* 353 (16): 1711–23.
20. Bolt et al., 2001, Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant.
21. Grunfeld, 1990, Glucocorticoids in blood pressure regulation.
22. Sapolsky et al., 1986, The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis.
23. Morand and Leech, 1999, Glucocorticoid regulation of inflammation: the plot thickens.
24. Gomez-Sanchez and Gomez-Sanchez, 2001, Role of central mineralocorticoid receptors in cardiovascular disease.
25. Daban et al., 2005, Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and bipolar disorder. *Psychiatr Clin N Am.* 28:469-480.
26. Robert Newton, 2000, Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?, *Thorax* 55:7 603 613 doi:10.1136/thorax.55.7.603.
27. DeBosscher et al., 2003, A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression.
28. Reichardt et al., 2000, Molecular genetic dissection of glucocorticoid receptor function in vivo. *Z. Rheumatol* 59 Suppl 2:II/1-5.

29. Belvisi et al., 2001, Therapeutic benefit of a dissociated glucocorticoid and the relevance of in vitro separation of transrepression from transactivation activity.
30. Miner J.N , 2002, Designer glucocorticoids.
31. Chrousos, G.P. 1995, The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation. *N. Engl. J. Med.* 332:1351-1362.
32. Smith, S.M and Vale, W.W, 2006, The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress.
33. McQuade και Young, 2000, Future therapeutic targets in mood disorders: the glucocorticoid receptor.
34. Hanley και Van de Kar, 2003, Serotonin and the neuroendocrine regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and disease.
35. Suda et al., 1987, Multiple Feedback Regulatory Loops upon Rat Hypothalamic Corticotropin-releasing Hormone Secretion.
36. Sawchenko et al., 1992, Co-localization of neuroactive substances in the endocrine hypothalamus.
37. Φυσιολογία 2005, W.F.Boron, E.L.Boulpaep edited.
38. Daban et al., 2005, Psychiatr Clin N Am, Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and bipolar disorder. *Psychiatr Clin North Am.* 28:469–480
39. Keller-Wood και Dallaman, 1984, Corticosteroid inhibition of ACTH secretion.
40. Feldman και Weidenfeld, 1995, Neural mechanisms in the corticosteroid feedback effects on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis.
41. Jacobson και Sapolsky, 1991, The Role of the Hippocampus in Feedback Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis.
42. Denise Tischer et al., 2007, Glucocorticoid in the control of neuroinflammation.
43. Hafler, 2004, Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 113, 788–794
44. Rivers et al., 1933, Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J. Exp. Med.* 58.
45. Kawakami et al., 2005, Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. *J. Exp. Med.* 201, 1805–1814.

46. Hemmer et al., 2006, Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 201–211.
47. Bjartmar and Trapp, 2001, Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr. Opin. Neurol.* 14, 271–278
48. Komiyama et al., 2006, IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2006; 177, 566–573.
49. Friese and Fugger, 2005, Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* 128, 1747–1763
50. Murray, 2006, Diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *BMJ* 332, 525–527.
51. Fontoura et al., 2006, Emerging therapeutic targets in multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 19, 260–266.
52. Screpanti et al., 1989, Crisanti, A., Mathieson, B.J., Frati, L., Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T cell antigen receptor or IL-2 receptor. *J. Immunol.* 1989; 142, 3378–3383
53. Herold et al., 2006, Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 60–72.
54. Tabi et al., 1994, Apoptotic elimination of V beta 8.2+ cells from the central nervous system during recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis induced by the passive transfer of V beta 8. 2+ encephalitogenic T cells. *Eur. J. Immunol.* 24, 2609–2617.
55. Schmidt et al., 2004, Glucocorticoid induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance, *Cell Death and Differentiation* 11:S45-S55
56. Leussink et al., 2001, High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch. Neurol.* 58, 91–97
57. Migita et al., 1997, Apoptosis induction in human peripheral blood T lymphocytes by high-dose steroid therapy. *Transplantation* 63, 583–587.

58. McCombe et al., 1996, Corticosteroid treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat results in loss of V beta 8.2+ and myelin basic protein-reactive cells from the spinal cord, with increased total T-cell apoptosis but reduced apoptosis of V beta 8.2+ cells. *J. Neuroimmunol.* 70, 93–101.
59. Paul and Bolton, 1995, Inhibition of blood–brain barrier disruption in experimental allergic encephalomyelitis by short-term therapy with dexamethasone or cyclosporin A. *Int. J. Immunopharmacol.* 17, 497–503.
60. Holger M. Reichardt, 2007, Glucocorticoids in the control of neuroinflammation.
61. Elovaara et al., 2000, Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy. *Arch. Neurol.* 57, 546–551.
62. Elovaara et al., 1998, Methylprednisolone reduces adhesion molecules in blood and cerebrospinal fluid in patients with MS. *Neurology* 51, 1703–1708.
63. Gelati et al., 2000, High-dose methylprednisolone reduces cytokine induced adhesion molecules on human brain endothelium. *Can. J. Neurol. Sci.* 27, 241–244.
64. Adams et al., 2007, The fibrin-derived 377–395 peptide inhibits microglia activation and suppresses relapsing paralysis in central nervous system autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 204, 571–582.
65. Sorensen et al., 2002, Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 127, 59–68.
66. Tischner et al., 2006, Polyclonal expansion of regulatory T cells interferes with effector cell migration in a model of multiple sclerosis. *Brain* 129, 2635–2647.
67. Elovaara et al., 2006, Effect of high-dose methylprednisolone treatment on CCR5 expression on blood cells in MS exacerbation. *Acta Neurol. Scand.* 113, 163–166.
68. Wang et al., 2003, Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J. Immunol.* 176, 1695–1702.

69. Moreira et al., 2006, Effect of the treatment with methylprednisolone on the cerebrospinal fluid and serum levels of CCL2 and CXCL10 chemokines in patients with active multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 114, 109–113.
70. Mirowska-Guzel et al., 2006, High dose of intravenously given glucocorticosteroids decrease IL-8 production by monocytes in multiple sclerosis patients treated during relapse. *J. Neuroimmunol.* 176, 134–140.
71. Almawi et al., 1996, Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J. Leukoc. Biol.* 60, 563–572.
72. Gayo et al., 1998, Glucocorticoids increase IL-10 expression in multiple sclerosis patients with acute relapse. *J. Neuroimmunol.* 85, 122–130.
73. Correale et al., 1998, Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4⁺ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J. Immunol.* 161, 3365–3374.
74. Kleinert et al., 1996, Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol. Pharmacol.* 49, 15–21.
75. Redford et al., 1997, Nitric oxide donors reversibly block axonal conduction: demyelinated axons are especially susceptible. *Brain* 120, 2149–2157.
76. Sloka and Stefanelli, 2005, The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 11, 425–432
77. Navarro et al., 2006, Circulating dendritic cells subsets and regulatory T-cells at multiple sclerosis relapse: differential shortterm changes on corticosteroids therapy. *J. Neuroimmunol.* 176, 153–161.
78. Chen et al., 2008, Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol Endocrinol* Ahead of print.
79. Kumar and Thompson, 2005, Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship.
80. Beato et al., 1996, Interaction of steroid hormone receptor with the transcription initiation complex.

81. Jensen and Jacobsen, 1962, Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 17:387-414.
82. Clever and Karlson, 1960, Induction of puff changes in the salivary gland chromosomes of *Chironomus tentans* by ecdysone. *Exp Cell Res* 20: 623-626.
83. Noteboom and Gorski, 1965, Stereospecific binding of estrogens in the rat uterus. *Arch Biochem Biophys* 111(3):559-568.
84. Hollenberg et al., 1985, Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318(6047):635-641.
85. Walter et al., 1985, Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(23):7889-93
86. Weinberger et al., 1985a, Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection. *Science* 228(4700):740-742.
87. Chandler et al., 1983, DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo. *Cell* 33(2):489-499.
88. Payvar et al., 1983, Sequence specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region. *Cell* 35 (2 Pt 1):381-392.
89. Scheidereit et al., 1983, The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumour virus. *Nature* 304(5928):749-752.
90. Karin et al., 1984, Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature* 308(5959):513-519.
91. Krust et. Al., 1986, The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors, 1986
92. Green and Chambon, Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor. *Nature* 325(6099):75-78.
93. Kumar et al., 1987, Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51(6):941-951
94. Beato M, 1989, Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56(3):335-44.

95. Nichols et al., 1998, Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists.
96. Guiochon-Mantel et al., 1991, Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor.
97. Pratt and Toft, 1997, Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones.
98. Godowski and Picard, 1989, Steroid receptors. How to be both a receptor and a transcription factor. *Biochem Pharmacol* 38(19):3135-3143.
99. Zhou and Cidlowski, 2005, The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses.
100. Dong and Cidlowski, 2003, *Encyclopedia of Hormones*.
101. Hollenberg et al., 1985, Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318(6047): 635-641.
102. Bamberger et al., 1996, Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 17(3), 245-261
103. Carlstedt-Duke et al., 1987, Domain structure of the glucocorticoid receptor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(13):4437-4440.
104. Giguere et al., 1986, Functional domains of the human glucocorticoid receptor.
105. Rusconi and Yamamoto, 1987, Functional dissection of the hormone and DNA binding, activities of the glucocorticoid receptor.
106. Luisi et al., 1991, Crystallographic Analysis of the Interaction of the Glucocorticoid Receptor with DNA.
107. Yudt et al., 2003, *Mol Cell Biol*, Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta. *Mol Cell Biol* 23(12):4319-4330
108. de Castro et al., 1996, The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential psychological role.
109. Oakley et al., 1997, Expression and Subcellular Distribution of the β -Isoform of the Human Glucocorticoid receptor.

110. Pujols et al., 2002, Expression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in human cells and tissues.
111. Vottero and Chrousos, 1999, Glucocorticoid Receptor beta: View I. Trends Endocrinol Metab 10: 333-8. 20.
112. Carlstedt-Duke, 1999, Glucocorticoid Receptor beta: View II. Trends Endocrinol Metab. 10(8):339-342
113. Oakley et al., 1999, The dominant negative activity of the glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. J Biol Chem 274(39):27857-27866
114. Lu and Cidlowski, 2004, The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms.
115. Lu and Cidlowski, 2006, TRENDS in Cell Biology.
116. McEwan et al., 1997, Mechanism of gene expression by the glucocorticoid receptor: role of protein-protein interactions.
117. Pratt and Toft, 1997, Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones.
118. Pratt, 1998, The hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors.
119. Pratt, 1993, The role of heat shock proteins in regulating the function, folding and trafficking of the glucocorticoid receptor.
120. DeFranco et al., 1995, Nuclear cytoplasmic shuttling of steroid receptors.
121. Freeman et al., 2000, The p23 molecular chaperones act at a late step in intracellular receptor action to differentially affect ligand efficacies.
122. Javier R. Revollo and John A. Cidlowski, 2009, Mechanisms Generating Diversity in Glucocorticoid Receptor Signaling.
123. Savory et al., 2001, Glucocorticoid Receptor Homodimers and Glucocorticoid-Mineralocorticoid Receptor Heterodimers Form in the Cytoplasm through Alternative Dimerization Interfaces.
124. Ou et al., 2001, Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene.
125. Stahn et al., 2007, Molecular and Cellular Endocrinology.

126. Dostert and Heinzl, 2004, Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid answer, *Curr Pharm Des* 10:2807-2816
127. Spencer et al., 1997, Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase.
128. Darimont et al., 1998, Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions.
129. Bodwell et al., 1998, Glucocorticoid receptor phosphorylation: overview, function and cell cycle dependence.
130. Krstic et al., 1997, Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases electively and ifferentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor.
131. Rogatsky et al., 1998, Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinas.
132. Wang et al., 2002, Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo.
133. Sakai et al., 1988, Hormone-mediated repression: a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene. *Genes Dev* 2(9):1144-1154.
134. Diamond et al., 1990, Transcription factor interactions selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* 249(4974):1266-1272.
135. Barnes, 2006, Corticosteroid effects on cell signalling.
136. McKay and Cidlowski, 1999, Molecular control of immune/inflammatory responses interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 20(4):435-459.
137. Wissink et al., 1997, Distinct domains of the RelA NF-kappaB subunit are required for negative cross-talk and direct interaction with the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 272(35):22278-22284.
138. Buttgereit, 2000, Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action.
139. Tasker et al., 2006, Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors.

140. Maier et al., 2005, G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane.
141. Bartholome et al., 2004, Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis.
142. Balsalobre et al., 2000, Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signalling.
143. Reichardt and Schutz, 1998, Molecular genetic dissection of glucocorticoid receptor function in vivo.
144. Javier R. Revollo and Cidlowski, 2009, Mechanisms Generating Diversity in Glucocorticoid Receptor Signaling.
145. Faus and Haendler, 2006, Post-translational modifications of steroid receptors.
146. Krstic-Demonacos and Demonacos, 2001, Post -translational modifications of steroid receptors.
147. Duma et al., 2006, Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification.
148. Nicolas C. Nicolaides et al., The Human Glucocorticoid Receptor: Molecular Basis of Biologic Function, Steroids 2010.
149. Hunter, Signaling—2000 and Beyond, 2000.
150. Hill and Treisman, 1995, Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity.
151. Karin, 1992, Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease.
152. Rochette-Egly, 2003, Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation.
153. Singh and Moudgil, 1985, Phosphorylation of rat liver glucocorticoid receptor. J Biol Chem 260:3684-3690.
154. Grandics et al., 1984, Phosphorylation in vivo of rat hepatic glucocorticoid receptor. Biochem Biophys Res Commun 120:59-65.
155. Danielsen et al., 1986, The mouse glucocorticoid receptor: mapping of functional domains by cloning, sequencing and expression of wild-type and mutant receptor proteins. EMBO J 5:2513-2522.

156. Miesfeld et al., 1984, Characterization of a steroid hormone receptor gene and mRNA in wild-type and mutant cells. *Nature* 312(5996):779-781.
157. Orti et al., 1992, Phosphorylation of Steroid Hormone Receptors.
158. Bodwell et al., 1991, Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor.
159. Bodwell et al., 1998, Glucocorticoid receptor phosphorylation:overview, function and cell-cycle dependence.
160. Hollenberg and Evans, 1988, Multiple and cooperative transactivation domains of the human glucocorticoid receptor.
161. Godowski et al., 1988, Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-LexA fusion proteins. *Science* 241:812-816.
162. Schaaf and Cidlowski, 2003, Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity.
163. Nordeen et al., 1994, The coupling of multiple signal transduction pathways with steroid response mechanisms.
164. Bodwell et al., 1996, Glucocorticoid receptor: ATP and cell cycle dependence, phosphorylation and hormone resistance.
165. Ismaili and Garabedian, 2004, Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation.
166. Webster et al., 1997, Mouse Glucocorticoid Receptor Phosphorylation Status Influences Multiple Functions of the Receptor Protein.
167. Wallace and Cidlowski, 2001, Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids.
168. Katherine L.Gross and Cidlowski, 2008, Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair.
169. L.M.L. van Winsen et al., 2007, Glucocorticoid receptor gene polymorphisms associated with more aggressive disease phenotype in MS.
170. Huizenga et al., 1998, A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with an increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 144-151.
171. Russcher et al., 2005b, Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 5804-5810.

172. Evangelia Charmandari, 2011, Primary Generalized Glucocorticoid Resistance and Hypersensitivity.
173. Russcher et al., 2005a, Increased expression of the glucocorticoid receptor-A translational isoform as a result of the ER22/23EK polymorphism. *Mol. Endocrinol.* 19, 1687-1696.
174. Weaver et al., 1992, An association between a BclI restriction fragment length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women. *J. Mol. Endocrinol.* 9, 295–300.
175. van Rossum et al., 2003, Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 59, 585–592.
176. Rosmond et al., 2000, A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Obes. Res.* 8, 211–218.
177. Syed, A.A. et al., 2008, A common intron 2 polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with insulin resistance in men. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 68, 879–884.
178. van Rossum, E.F. and Lamberts, S.W. 2004, Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog. Horm. Res.* 59, 333–357.
179. van Rossum, E.F. et al., 2004, Characterization of a promoter polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relationship to three other polymorphisms. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 61, 573–581.
180. Chrousos GP, Vingerhoeds A, Brandon D, Eil C, Pugeat M, DeVroede M, Loriaux DL, Lipsett MB: Primary cortisol resistance in man: a glucocorticoid receptor-mediated disease. *J Clin Invest* 1982; 69: 1261–1269.
181. Hurley DM, Accili D, Stratakis CA, Karl M, Vamvakopoulos N, Rorer E, Constantine K, Taylor SI, Chrousos GP: Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J Clin Invest* 1991; 87: 680–686.
182. Karl M, Lamberts SW, Detera-Wadleigh SD, Encio IJ, Stratakis CA, Hurley DM, Accili D, Chrousos GP: Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 683–689.

183. Malchoff DM, Brufsky A, Reardon G, McDermott P, Javier EC, Bergh CH, Rowe D, Malchoff CD: A mutation of the glucocorticoid receptor in primary cortisol resistance. *J Clin Invest* 1993; 91: 1918–1925.
184. Karl M, Lamberts SW, Koper JW, Katz DA, Huizenga NE, Kino T, Haddad BR, Hughes MR, Chrousos GP: Cushing's disease preceded by generalized glucocorticoid resistance: clinical consequences of a novel, dominant-negative glucocorticoid receptor mutation. *Proc Assoc Am Physicians* 1996; 108: 296–307.
185. Kino T, Stauber RH, Resau JH, Pavlakis GN, Chrousos GP: Pathologic human GR mutant has a transdominant negative effect on the wild-type GR by inhibiting its translocation into the nucleus: importance of the ligand-binding domain for intracellular GR trafficking. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5600–5608.
186. Ruiz M, Lind U, Gafvels M, Eggertsen G, Carlstedt-Duke J, Nilsson L, Holtmann M, Stierna P, Wikstrom AC, Werner S: Characterization of two novel mutations in the glucocorticoid receptor gene in patients with primary cortisol resistance. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 55: 363–371.
187. Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Zachman K, Alatsatianos A, Chrousos GP: Functional characterization of the natural human glucocorticoid receptor (hGR) mutants hGR α R477H and hGR α G679S associated with generalized glucocorticoid resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1535–1543.
188. Mendonca BB, Leite MV, de Castro M, Kino T, Elias LL, Bachega TA, Arnhold IJ, Chrousos GP, Latronico AC: Female pseudohermaphroditism caused by a novel homozygous missense mutation of the GR gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1805–1809.
189. Vottero A, Kino T, Combe H, Lecomte P, Chrousos GP: A novel, C-terminal dominant negative mutation of the GR causes familial glucocorticoid resistance through abnormal interactions with p160 steroid receptor coactivators. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2658–2667.
190. Charmandari E, Raji A, Kino T, Ichijo T, Tiulpakov A, Zachman K, Chrousos GP: A novel point mutation in the ligand-binding domain (LBD) of the human glucocorticoid receptor (hGR) causing generalized glucocorticoid resistance: the importance of the C terminus of hGR LBD in conferring transactivational activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3696–3705.

191. Zhu HJ, Dai YF, Wang O, Li M, Lu L, Zhao WG, Xing XP, Pan H, Li NS, Gong FY: Generalized glucocorticoid resistance accompanied with an adrenocortical adenoma and caused by a novel point mutation of human glucocorticoid receptor gene. *Chin Med J* 2011; 124: 551–555.
192. Raison and Miller, 2003, When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders.
193. Raison et al., 2006, Cytokines Sing the Blues: Inflammation and the Pathogenesis of Depression.
194. Holsboer, 2000, The corticosteroid receptor hypothesis of depression.
195. Pariante and Miller, 2001, Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment.
196. Heuser et al., 1994, The combined dexamethasone/CRH: a refined laboratory test for psychiatric disorders.
197. Miller et al., 1999, Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function.
198. Nanes, 2003, Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology.
199. Keegan BM et al. *Ann Rev Med*, Chemokine Receptors and Multiple Sclerosis Pathogenesis 2002; Compston, A., Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502-1517.
200. Reders AT, Makowiec RL, Lowy MT. 1994, Adrenal size is increased in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 51. 151-4.
201. Erkut ZA, Hofman MA, Ravid R, Swad DF. 1995, Increased activity of hypothalamic corticotropin releasing hormone neurons in multiple sclerosis, *J Neuroimmunol* 62, 27-33 1995.
202. Bergh FT et al., 1999, Dysregulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis is related to the clinical course of the disease *Neurology* 53:772-777.
203. Gold SM. 2005, Hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity predicts disease progression in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 165, 186-91.
204. Reder AT et al. 1987, Dexamethasone suppression test abnormalities in multiple sclerosis, relation to ACTH therapy. *Neurology* 849-53.

205. Limone P et al., 2002, Hypothalamic pituitary adrenal axis function and cytokine production in multiple sclerosis with or without interferon- β treatment. *Acta Neurol Scand* 105, 372-77.
206. DeRijk, R.H et al., 2004, Corticosteroid resistance in a subpopulation of multiple sclerosis patients as measured by ex vivo dexamethasone inhibition of LPS induced IL-6 production. *J. Neuroimmunol* 151, 180-188.
207. van Winsen, L.M et al., 2005, Sensitivity to glucocorticoids is decreased in relapsing remitting multiple sclerosis, *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 734-740.
208. Gold et al., 2005, The role of stress-response systems for the pathogenesis and progression of MS. *Trends Immunol.* 26, 644–652.
209. Lisa M. L van Winsen et al., 2009, A Glucocorticoid Receptor Haplotype TthIII1/ER22/23EK/9 β Is Associated with a More Aggressive Disease Course in Multiple Sclerosis.
210. van den Akker EL et al., 2006, Glucocorticoid receptor polymorphism affects transrepression but not transactivation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (7), 2800–2803.
211. Schumann et al., 2002, Activity of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in multiple sclerosis: correlations with gadolinium-enhancing lesions and ventricular volume. *Ann. Neurol.* 51, 763–767.
212. Maria C. Ysraelit et al., 2010, Impaired hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in patients with multiple sclerosis.
213. Lisa L.M. van Winsen et al., 2005, The impact of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on glucocorticoid sensitivity is outweighed in patients with multiple sclerosis.
214. Florian Then Bergh et al., 1997, Binding characteristics of the glucocorticoid receptor in peripheral blood lymphocytes in multiple sclerosis.
215. Current Protocols Essential Laboratory Techniques, 2008, John Wilsey and Sons, Inc.