

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΑΤΤΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΟΥΤΣΑΤΣΟΥ – ΛΑΔΙΚΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΩΝ ΜΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΑΓΩΝΙΣΤΩΝ ΤΟΥ
ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥΣ**

**ΔΗΜΗΤΡΑ ΣΩΤ. ΣΙΑΚΟΥΛΗ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ**

ΑΘΗΝΑ 2023

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ ΓΙΑ ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 24/05/13

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 06/02/14

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 17/03/14

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 22/02/23

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 01/03/23

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΥΠΟΣΤΗΡΙΞΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 21/03/23

ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Παρασκευή Μουτσάτσου – Λαδικού, Καθηγήτρια, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής Σχολής, Τομέας Βασικών Ιατρικών Επιστημών, Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας, Αττικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο. (Επιβλέπουσα)

Μιχαήλ Ν. Αλέξης, Ομότιμος Ερευνητής, ΙΧΒ, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Δήμητρα Μήτσιου Ερευνήτρια Β', ΙΧΒ, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Παρασκευή Μουτσάτσου – Λαδικού, Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρική Σχολή, Τομέας Βασικών Ιατρικών Επιστημών, Εργαστήριο Κλινικής Βιοχημείας, Αττικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο. (Επιβλέπουσα)

Ευανθία Κασσή, Καθηγήτρια, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ

Ευθυμία Κιτράκη, Καθηγήτρια, Σχολή Οδοντιατρικής, Τμήμα Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ

Κουλοχέρη Σταυρούλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής Σχολής, Τομέας Βασικών Ιατρικών Επιστημών, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, ΕΚΠΑ

Άννα-Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

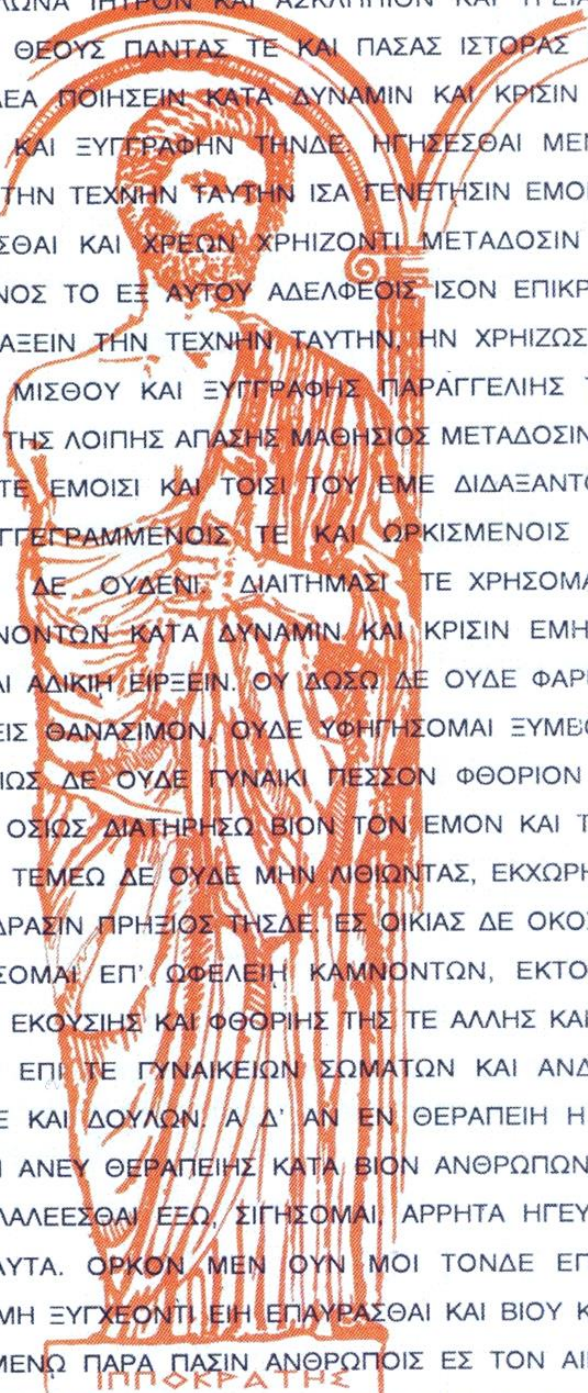
Μιχαήλ Ν. Αλέξης, Ομότιμος Ερευνητής, ΙΧΒ, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Δήμητρα Μήτσιου Ερευνήτρια Β', ΙΧΒ, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ: Γεράσιμος Δ. Σιάσος

ΒΑΘΜΟΣ: Άριστα

ΙΠΠΟΚΡΑΤΙΚΟΣ ΟΡΚΟΣ ΚΕΙΜΕΝΟ



ΟΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΕΥΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΑΥΤΟΥ ΑΔΕΛΦΕΟΙΣ ΊΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ, ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΕΥΓΓΡΑΦΗΣ ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΕΣΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΕΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣ ΤΕ ΚΑΙ ΟΡΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ ΙΗΤΡΙΚΩ ΑΛΛΩ ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΟΥ ΤΕΜΕΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙΝ ΠΡΗΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΕΙΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΗΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ.

«Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα» (Νόμος

5543/1932, άρθρο 202, παράγραφος 2)

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Επώνυμο: Σιάκουλη
Όνομα: Δήμητρα
Ημερομηνία γέννησης: 12 Αυγούστου 1987
Τόπος γέννησης: Μαρούσι Αττικής
Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμη
Υπηκοότητα: Ελληνική
e-mail: dsiakouli@gmail.com

Σπουδές

- **2014** - ως σήμερα: Υποψήφια Διδάκτωρ στην Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- **2010-2012**: Φοίτηση στο μεταπτυχιακό κύκλο σπουδών στη Μοριακή & Εφαρμοσμένη Φυσιολογία, Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών Βαθμός «Άριστα» (9.1).
- **2005-2009**: Φοίτηση στο Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης. Βαθμός : «Καλώς» (6,49).
- **2005**: Απολυτήριο Γενικού Ενιαίου Λυκείου. Βαθμός : «Άριστα» (18,5).

Ανακοινώσεις σε Επιστημονικά Συνέδρια

- 1.Siakouli D**, Kollarou A, Kontogiorgis C, Hadjipavlou-Litina D. Coumarin Mannich Bases with potential antithrombotic and antioxidant role. *3rd Hellenic Symposium on Organic Synthesis, "From Chemistry to Biology, Medicine and Materials Science"*, 15-17 October 2009, Athens, Greece.
- 2. Siakouli D**, Kontogiorgis C, Litinas K, Hadjipavlou – Litina D. Synthesis and Biological Evaluation of Coumarin Mannich Bases as anti-inflammatory and antioxidant agents. *14th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry*. 23-25 April 2010, Thessaloniki, Greece.
- 3.** Kontos CK, Bantounas I, **Siakouli D**, and Pintzas A. The role of miR-21 in oncogenic signaling and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer. *62nd Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB)*, 9-11 December 2011, Athens, Greece.
- 4.** Zerva S, **Siakouli D**, Kyriakou V, Mitsiou DJ, Alexis MN. Combinatorial targeting of breast cancer with PI3K pathway inhibitors and antiestrogens: a comparative study using breast

cancer cell lines. *International Conference on Chemistry for Health*, 9-14 September 2012, Athens, Greece.

5. Potamitis C, Papavasileiou K, **Siakouli D**, Boulaka A, Papadopoulos M, Mitsiou DJ, Alexis MN, Zoumpoulakis P, Zervou M. Virtual screening approaches targeting glucocorticoid receptor. 15th Annual European Schrodinger User Meeting, 23-25 September 2015, The Westin Paris – Vendôme, Paris, France.

6. **Siakouli D**, Boulaka A, Potamitis C, Papavasileiou K, Roussaki M, Calogeropoulou T, Papadopoulos MG, Zoumpoulakis P, Zervou M, Alexis MN, Mitsiou DJ. Dissociated Glucocorticoids: Development of novel compounds and evaluation of their activity. 66th Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), 11-13 December 2015, Athens, Greece.

7. **Siakouli D**, Potamitis C, Boulaka A, Papavasileiou K, Roussaki M, Calogeropoulou T, Papadopoulos MG, Zoumpoulakis P, Alexis MN, Zervou M, Mitsiou DJ. Identification of Novel Nonsteroidal Selective Glucocorticoid Receptor Agonists. 67th Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), 10-12 November 2017, Athens, Greece.

8. E. Kritsi, C. Potamitis, **D. Siakouli**, A. Boulaka, A. C. Tenchiu, C. Nasaj, G. Panagiotou, V. Ganou, K. D. Papavasileiou, O. Kirkilessi, T. Calogeropoulou, M. N. Alexis, P. Zoumpoulakis, C. Arbez-Gindre, I.D. Kostas, D. J. Mitsiou and M. Zervou. New non-steroidal selective glucocorticoid receptor agonists. CMTPI-2019 Ioannina, Greece, 23-27 June, 2019.

9. **Dimitra Siakouli**, Eftichia Kritsi, Alia-Christina Tenchiu, Nikiforos Travlos, Georgios Panagiotou, Athina Boulaka, Katerina Nasaj, Constantinos Potamitis, Olga Kirkilessi, Andromachi Tzani, Theodora Calogeropoulou, Cécile Arbez-Gindre, Michael N. Alexis, Ioannis D. Kostas, Maria Zervou, Dimitra J. Mitsiou. Development of New Selective Glucocorticoid Receptor Agonists: hit-to-lead optimization. 70th Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), 29 November-1 December 2019, Athens, Greece.

10. Dimitra J. Mitsiou, Aggeliki K. Meligova, **Dimitra Siakouli**, Maria Zoumpouli, Sotiria Stasinopoulou, Vassiliki Ganou, Eleni-Fani Gkotsi, Aristotelis Chatziioannou, Olga Papadodima, Michael N. Alexis 'Prognostic significance of estrogen receptor beta in early-stage breast cancer'. The Steroid Hormones and Receptors in Health and Disease Conference', jointly organized by the Federation of American Societies for Experimental

Biology (FASEB) and the International Committee on Rapid Responses to Steroid Hormones), 25-27 May 2021.

11. Dimitra Siakouli, Georgios Panagiotou, Vassiliki Ganou, Eleni-Fani Gkotsi, Aristotelis Chatziioannou, Olga Papadodima, Michael N. Alexis, Dimitra J. Mitsiou. Non-steroidal Selective Glucocorticoid Receptor Agonists: the example of AZD956. 71th Annual Conference of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, 26 November-28 November 2021, Athens, Greece

Δημοσιεύσεις

- 1.** Ferraro A, Kontos CK, Boni T, Bantounas I, **Siakouli D**, Kosmidou V, Vlasi M, Spyridakis Y, Tsipras I, Zografos G, Pintzas A. Epigenetic regulation of miR-21 in colorectal cancer: ITGB4 as a novel miR-21 target and a three-gene network (miR-21-ITGB4-PDCD4) as predictor of metastatic tumor potential. *Epigenetics* 2014, 9(1):129-41. [doi: 10.4161/epi](https://doi.org/10.4161/epi).
- 2.** Potamitis C*, **Siakouli D***, Papavasileiou KD, Boulaka A, Ganou V, Roussaki M, Calogeropoulou T, Zoumpoulakis P, Alexis MN, Zervou M, Mitsiou DJ. Discovery of New Non-steroidal Selective Glucocorticoid Receptor Agonists. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018, doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.10.007. * equal contribution.
- 3.** Meligova AK, **Siakouli D**, Stasinopoulou S, Xenopoulou DS, Zoumpouli M, Ganou V, Gkotsi EF, Chatziioannou A, Papadodima O, Pilalis E, Alexis MN, Mitsiou DJ. ERβ1 Sensitizes and ERβ2 Desensitizes ERα-Positive Breast Cancer Cells to the Inhibitory Effects of Tamoxifen, Fulvestrant and Their Combination with All-Trans Retinoic Acid. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 3747. <https://doi.org/10.3390/ijms24043747>

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν, άμεσα ή έμμεσα, στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Παρασκευή Μουτσάτσου - Λαδικού, επιβλέπουσα της διδακτορικής μου διατριβής, για τις εύστοχες παρατηρήσεις, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες οφείλω στον Δρ. Μιχαήλ Αλέξη και στην Δρ. Δήμητρα Μήτσιου, συνεπιβλέποντες της διδακτορικής μου διατριβής και εργαστηριακούς μου γονείς, για την ευκαιρία που μου έδωσαν να ενταχθώ στην ομάδα τους, το Εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας του Ινστιτούτου Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας (ΙΧΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ). Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Δρ. Αλέξη για την καθοδήγησή του κατά τα πρώτα χρόνια μαθητείας μου στο εργαστήριο, διότι η υποστήριξη και η επίβλεψή του ήταν καθοριστικές στην απόφασή μου να αρχίσω την εκπόνηση της διατριβής. Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην Δρ. Μήτσιου για τις συμβουλές της, την ειλικρινή στήριξη σε εργαστηριακό και προσωπικό επίπεδο, την επιμονή και την υπομονή που ανεξάντλητα μου έδωσε όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς την αμέριστη βοήθειά της δεν θα είχα φτάσει σε αυτό το σημείο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Ενδοκρινολογίας για τη συνεργασία μας και το όμορφο περιβάλλον που δημιουργήσαμε. Οι καλές στιγμές μας στο εργαστήριο θα είναι πάντα μια γλυκιά ανάμνηση. Ιδιαίτερο ευχαριστώ στην Βένια Γάνου, η οποία ανέκαθεν ήταν πρόθυμη να προσφέρει τη βοήθεια της τόσο σε πρακτικό όσο και ψυχολογικό επίπεδο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Θεοδώρα Καλογεροπούλου και την ομάδα της Φαρμακευτικής Χημείας, την Δρ. Μαρία Ζερβού και την ομάδα της Μοριακής Ανάλυσης, τον Δρ. Ιωάννη Κώστα και την ομάδα της Οργανικής και Οργανομεταλλικής Χημείας και την Δρ. Όλγα Παπαδόδημα και την ομάδα της Μεταβολικής Μηχανικής και Βιοπληροφορικής για το σχεδιασμό και τη σύνθεση των υποψήφιων ενώσεων και τη βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων του RNA sequencing.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες τα άτομα που με στηρίζουν στην εκτός εργαστηρίου μου ζωή. Ευχαριστώ τις φίλες μου Ιωάννα Καπελέρη, Ανδρονίκη Κατσαρού, Σοφία Κάστιζα και Νικολέτα Μπέση που είναι πάντα δίπλα μου και πάντα έτοιμες να μοιραστούμε τις καλές και τις κακές μας στιγμές. Ευχαριστώ τα αδέρφια μου Παρασκευή και Νίκο που από τη πρώτη μέρα μέχρι και σήμερα συμπαραστέκονται σε αυτή την επίπονη

προσπάθειά μου. Ευχαριστώ τα ανίψια μου Σωτήρη, Αγγελική και Τάτη, των οποίων η παιδική ανεμελιά γέμισε με ευτυχία τη ζωή μου.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου, Σωτήρη και Παναγιώτα, για την απεριόριστη αγάπη και φροντίδα τους, τη στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια, την εμπιστοσύνη τους και όλα τα εφόδια που μου πρόσφεραν προκειμένου να κατακτήσω τους στόχους μου. Οι πολύτιμες συμβουλές σας πάντα θα καθορίζουν το τρόπο σκέψης μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1.0 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Γλυκοκορτικοειδή και υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών	1
1.2 Δομή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών	2
1.3 Ισομορφές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών	4
1.4 Μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών	6
1.5 Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών	8
1.6 Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ	11
1.7 NF-κΒ και καρκίνος	14
1.8 Ο ρόλος του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στη φλεγμονή: προφλεγμονώδης και αντιφλεγμονώδης δράση	14
1.9 Κλινική Χρήση των Γλυκοκορτικοειδών – Παρενέργειες	16
1.10 Επιλεκτικοί Αγωνιστές του Υποδοχέα Γλυκοκορτικοειδών	18
2.0 ΣΚΟΠΟΣ	21
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
1.0 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
1.1. Υλικά	22
1.1.1. Αντιδραστήρια και άλλα υλικά	22
1.1.2 Κυτταρικές σειρές	23
1.1.3 Αποστείρωση	23
1.1.4 Αντισώματα	24
1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	24
1.2.1. Καλλιέργεια κυττάρων	24
1.2.2. Προσδιορισμός της ενεργότητας της λουσιφεράσης	25
1.2.3. Προσδιορισμός σχετικού αριθμού κυττάρων με χρήση crystal violet	26
1.2.4 Μέτρηση της σχετικής χημικής συγγένειας πρόσδεσης ενώσεων σε καθαρό ανασυνδυασμένο ανθρώπινο υποδοχέα GR	27
1.2.5 Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων με χρήση του trypan blue	28
1.2.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών παρουσία SDS (SDS/PAGE)	28
1.2.7 Ανοσοχημική ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western	29
1.2.8 Ανοσοκυτταροχημική ανάλυση με έμμεσο ανοσοφθορισμό	30
1.2.9 Απομόνωση RNA από κύτταρα	31
1.2.10 Αντίστροφη μεταγραφή: σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του συμπληρωματικού DNA (cDNA)	32
1.2.11 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR)	33
1.2.12 Ανάλυση του συνολικού μεταγραφομικού προφίλ (RNA-sequencing)	35
1.2.13 Στατιστική ανάλυση	36
2.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
2.1 Ταυτοποίηση μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με χρήση φαρμακοφόρων μοντέλων	37
2.1.1 Ταυτοποίηση μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με χρήση φαρμακοφόρου μοντέλου που αναπτύχθηκε με βάση την πρόσδεση ενός αμιδίου της πυρολιδινόνης στο διευρυμένο τμήμα πρόσδεσης ορμόνης του GR.	37

2.1.1.1 Αξιολόγηση των επιλεγμένων υποψήφιων επιλεκτικών αγωνιστών του GR ως προς την ικανότητα τους να επάγουν την μεταγραφή μέσω των στοιχείων απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή.	40
2.1.2 Βελτιστοποίηση των πρόδρομων μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.	55
2.1.2.1. Επίδραση των υπό εξέταση ενώσεων στην ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω GRE	58
2.1.2.2. Επίδραση των υπό εξέταση ενώσεων στην έκφραση γονιδίων-στόχων του GR και του NF-κΒ	62
2.2 Αποτίμηση της αντικαρκινικής δράσης των μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του GR	64
2.3 Μελέτη της δράσης του μη στεροειδούς επιλεκτικού αγωνιστή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, AZD9567	68
2.3.1 Επίδραση της ένωσης AZD9567 στην ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω GRE	68
2.3.2 Επίδραση της ένωσης AZD9567 στην έκφραση γονιδίων-στόχων του GR και του NF-κΒ	70
2.3.3 Μεταγραφομικό προφίλ του μη στεροειδούς επιλεκτικού αγωνιστή του GR AZD9567 σε σύγκριση με το προφίλ της δεξαμεθαζόνης.	75
2.3.3.1. Μεταγραφομικό προφίλ του μη στεροειδούς επιλεκτικού αγωνιστή του GR AZD9567 σε σύγκριση με το προφίλ της δεξαμεθαζόνης απουσία φλεγμονώδους απόκρισης	76
2.3.3.2 Μεταγραφομικό προφίλ του μη στεροειδούς επιλεκτικού αγωνιστή του GR AZD9567 σε σύγκριση με το προφίλ της δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με την πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης	86
2.3.3.2.1 Δράση της ένωσης AZD9567 σε σύγκριση με τη δράση της δεξαμεθαζόνης στην καταστολή των γονιδίων που επάγονται από την πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης	86
2.3.3.2.2 Δράση της ένωσης AZD9567 σε σύγκριση με τη δράση της δεξαμεθαζόνης στη ρύθμιση νέων γονιδίων μετά από την πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης	90
3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	96
4. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	104
5. SUMMARY	106
III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	107
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ (Συμπληρωματικοί Πίνακες, ΣΠ1-ΣΠ22)	116

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ANOVA:	Ανάλυση της διακύμανσης
CCL2	Προσδέτης χημειοκίνης (μοτίβο C-C) 2
cDNA:	Συμπληρωματικό DNA
Dex	Δεξαμεθαζόνη
DMEM:	Ελάχιστο θρεπτικό υλικό κατά Dulbecco
DMSO:	Διμεθυλσουλφοξίδιο
DNA:	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTP:	Δεοξυτριφωσφορικά νουκλεοτίδια
DTT:	Διθειοθρεϊτόλη
E2:	17β-οιστραδιόλη
ECL:	Ενισχυμένη χημειοφωταύγεια
EDTA:	Αιθυλενοδιάμινο-τετραοξικό οξύ
FBS:	Ορός εμβρύου βοός
FP:	Πολωσιμετρία φθορισμού
GAPDH	Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης
GC	Γλυκοκορτικοειδές
GR	Υποδοχέας Γλυκοκορτικοειδών
GRE	Στοιχείο απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή
HC	Υδροκορτιζόνη
LPS	Λιποπολυσακχαρίτης
MEM:	Ελάχιστο θρεπτικό υλικό
MB:	Μοριακό βάρος
mRNA:	Αγγελιοφόρο RNA
NF-kB	Πυρηνικός παράγοντας kB
OHT	4-υδροξυ-ταμοξιφαίνη
PBS:	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PCR:	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
Real-Time-PCR:	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο
RNA:	Ριβονουκλεϊκό οξύ
RNasin:	Αναστολέας ριβονουκλεασών
RU486	Μιφεπριστόνη
SDS:	Δωδεκυλικό θειϊκό νάτριο
SEGRA	Επιλεκτικός αγωνιστής του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

TA	Τριαμσινολόνη
TAT	αμινοτρανσφεράση τυροσίνης
TBS:	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris
TCA:	Τριχλωρικό οξύ
TEMED:	N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενδιαμίνη
TNF	Παράγοντας νέκρωσης όγκου

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

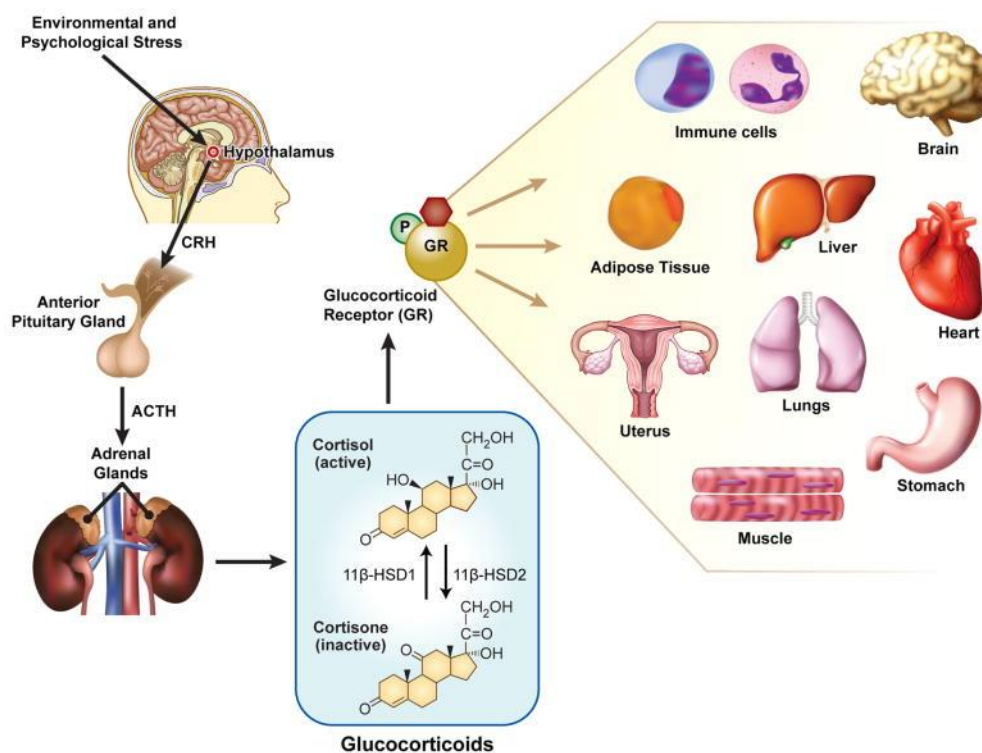
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γλυκοκορτικοειδή και υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) είναι απαραίτητες στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες εκκρίνονται από τον φλοιό των επινεφριδίων. Οι στεροειδείς ορμόνες είναι μια οικογένεια λιπόφιλων οργανικών ενώσεων με τέσσερις δακτυλίους διατεταγμένους σε μια συγκεκριμένη μοριακή διαμόρφωση, το δακτύλιο του στερανίου. Στον χαρακτηριστικής δομής ανθρακικό σκελετό υπάρχουν δέκα εφτά άτομα άνθρακα, κάθε δακτύλιος έχει δύο κοινά άτομα με έναν άλλο, οι τρεις από τους δακτυλίους αποτελούνται από έξι άτομα άνθρακα και ο τέταρτος από πέντε. Κατά τη στεροειδογένεση, τη μεταβολική οδό παραγωγής στεροειδών από τη χοληστερόλη, οι διαφορετικές λειτουργικές ομάδες που μπορούν να συνδεθούν στον πυρήνα των τεσσάρων δακτυλίων καθώς και η κατάσταση οξειδωσης τους δημιουργούν τη μεγάλη ποικιλία των στεροειδών ορμονών (Porcu et al, 2016). Μια ειδική κατηγορία στεροειδών ορμονών είναι τα γλυκοκορτικοειδή. Τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν μία ποικιλία από φυσιολογικές διεργασίες όπως η ανάπτυξη, ο μεταβολισμός, η ομοιόσταση, η απόπτωση κ.α. Η έκκριση τους ελέγχεται από τον άξονα υποθαλάμου - υπόφυσης - επινεφριδίων. Εσωτερικά και εξωτερικά σήματα διεγείρουν τον υποθάλαμο να απελευθερώσει την ορμόνη κορτικοεκλυτίνη η οποία δρα στη πρόσθια υπόφυση και προκαλεί τη σύνθεση και την έκκριση της ορμόνης αδρενοκορτικοτροπίνη (ACTH). Στη συνέχεια η αδρενοκορτικοτροπίνη δρα στο φλοιό των επινεφριδίων ώστε να διεγείρει την παραγωγή και την έκκριση των γλυκοκορτικοειδών (Aguilera et al, 1997) (Εικόνα 1). Οι βιολογικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών διαμεσολαβούνται μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR; NR3C1) ο οποίος εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και ιστούς και ρυθμίζει πολλές βιολογικές λειτουργίες σε κύτταρα του ανοσοποιητικού αλλά και σε αρκετά όργανα και ιστούς όπως ο εγκέφαλος, το ήπαρ, η καρδιά, οι πνεύμονες, ο λιπώδης ιστός, οι μυς και το αναπαραγωγικό σύστημα (Oakley and Cidlowski, 2013 - Cruz-Topete and Cidlowski, 2015 - Timmermans et al 2019) (Εικόνα 1).

Ο GR είναι μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος ενεργοποιείται μέσω της σύνδεσης της αντίστοιχης ορμόνης (γλυκοκορτικοειδές) και ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών ορμονών και στην ευρύτερη οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Το γονίδιο του GR του ανθρώπου είναι το πρώτο που κλωνοποιήθηκε το 1985 (Barnes PJ, 1998) και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 5 (5q31). Πολλές πληροφορίες για τη δομή του μορίου του GR προήλθαν από την κλωνοποίηση του cDNA του υποδοχέα του ανθρώπου (777 αμινοξέα) και

του υποδοχέα ποντικού και αρουραίου (795 και 783 αμινοξέα, αντίστοιχα) (Francke and Foellmer, 1989).



Cruz-Topete and Cidlowski (2015), doi: 10.1159/000362724.

Εικόνα 1: Γλυκοκορτικοειδή: έκκριση από τον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια και δράση.

Κατά την έκθεση σε στρες ο υποθάλαμος διεγείρεται και απελευθερώνει την ορμόνη κορτικοεκλυτίνη (CRH) η οποία με τη σειρά της διεγείρει την πρόσθια υπόφυση να εκκρίνει την αδρενοκορτικοτροπίνη (ACTH) που επάγει την έκκριση κορτιζόλης από τον φλοιό των επινεφριδίων. Η κορτιζόλη μετατρέπεται στην ανενεργή κορτιζόνη από την αφυδρογονάση 11β-HSD2(11b-hydroxysteroid dehydrogenase 2). Αντίθετα, η αφυδρογονάση 11β-HSD1 (11b-hydroxysteroid dehydrogenase 1) μετατρέπει την κορτιζόνη σε κορτιζόλη που ασκεί τη δράση της σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και ιστούς.

1.2 Δομή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

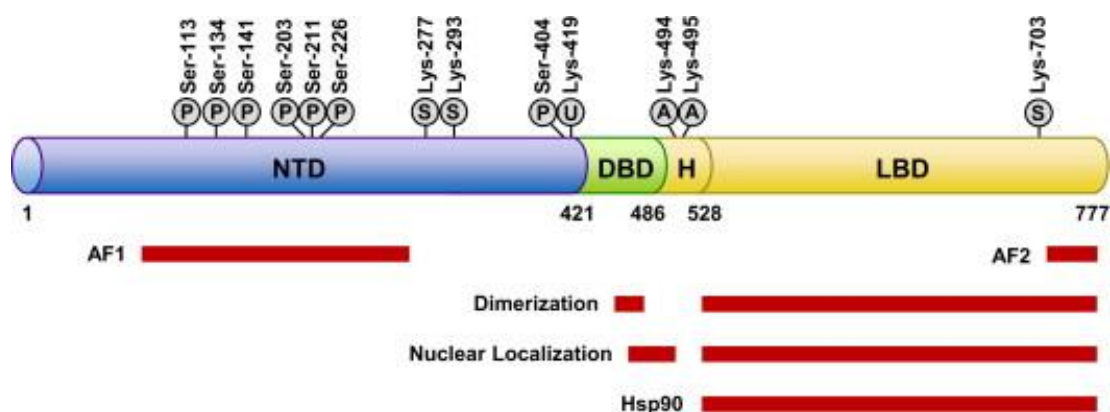
Ο GR αποτελείται από τρεις λειτουργίες περιοχές με σαφώς διακριτούς ρόλους (Kumar and Thompson 2005 - Oakley and Cidlowski 2013) όπως φαίνεται στην Εικόνα 2:

- το αμινοτελικό του μορίου (N-terminal domain, NTD) περιέχει τα κύρια αντιγονικά κέντρα της πρωτεΐνης. Στη περίπτωση του ανθρώπινου υποδοχέα αποτελείται από 421 αμινοξέα. Η περιοχή αυτή που δεν είναι υψηλά διατηρημένη μεταξύ των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, φαίνεται να είναι κυρίως υπεύθυνη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποδοχέα στην οποία συμμετέχει και η περιοχή σύνδεσης της ορμόνης.

- το τμήμα σύνδεσης στο DNA (DNA-binding domain, DBD) που εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα του μορίου, και είναι υπεύθυνο για τη σύνδεση του υποδοχέα στις ειδικές

αλληλουχίες GRE (glucocorticoid responsive elements, στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή). Η σύνδεση του υποδοχέα στο DNA φαίνεται ότι γίνεται μέσω δύο δακτυλίων που σχηματίζονται στην πλούσια σε κυστεΐνες περιοχή σύνδεσης στο DNA (αμινοξέα 421-486).

- το τμήμα σύνδεσης της ορμόνης (Ligand-binding domain, LBD) στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 528-777 του ανθρώπινου υποδοχέα. Απουσία ορμόνης η περιοχή αυτή καταστέλλει τη μεταγραφική λειτουργία του υποδοχέα. Στο τμήμα αυτό βρίσκεται και η περιοχή σύνδεσης της πρωτεΐνης-συνοδού hsp90. Μεταξύ του DBD και του LBD υπάρχει μια ευέλικτη περιοχή (Hinge region).



Oakley and Cidlowski (2013), doi:10.1016/j.jaci.2013.09.007.

Εικόνα 2: Δομή και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις του ανθρώπινου GR. Παρουσιάζονται τα τμήματα του GR και οι περιοχές που εμπλέκονται στη μεταγραφική ενεργότητα (AF1 και AF2), στον διμερισμό, στην πυρηνική μετατόπιση και στη σύνδεση της hsp90. Επίσης, παρουσιάζονται τα αμινοξέα που τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά: φωσφορυλίωση (P), σουμοϋλίωση (S), ουμπικουτινίωση (U), και ακετυλίωση (A).

Οι περιοχές AF1 και AF2 (transactivation domains) εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της ρύθμισης της μεταγραφής από τον GR. Η AF1 βρίσκεται στο αμινοτελικό τμήμα του μορίου και μεταξύ των αμινοξέων 77 και 262 ενώ η περιοχή AF2 βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Η λειτουργία της περιοχής AF1 δεν εξαρτάται από την παρουσία ορμόνης ενώ αυτή της AF2 εξαρτάται απόλυτα. Ειδικά για την περιοχή AF1 έχει βρεθεί ότι αλληλοεπιδρά άμεσα με τη βασική μεταγραφική μηχανή σταθεροποιώντας με τον τρόπο αυτό το σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής στο οποίο συμμετέχει η RNA πολυμεράση II.

Επιπλέον βρέθηκαν δύο περιοχές του μορίου του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πυρηνική εντόπιση του παρουσία της ορμόνης και οι οποίες

ονομάζονται σήματα πυρηνικής εντόπισης NLS1 και NLS2 (nuclear localization signals). Γενικά τα σήματα πυρηνικής εντόπισης είναι βασικές περιοχές των πρωτεϊνών που είναι αναγκαίες για την ενεργητική μεταφορά πρωτεϊνών μεγάλου βάρους στον πυρήνα. Το NLS1 αντιστοιχεί στα αμινοξέα 478 – 506 του ανθρώπινου υποδοχέα. Το NLS2 βρίσκεται μέσα στο τμήμα σύνδεσης της ορμόνης και η ενεργότητα του εξαρτάται από τη σύνδεση της ορμόνης (Bledsoe et al, 2002).

1.3 Ισομορφές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

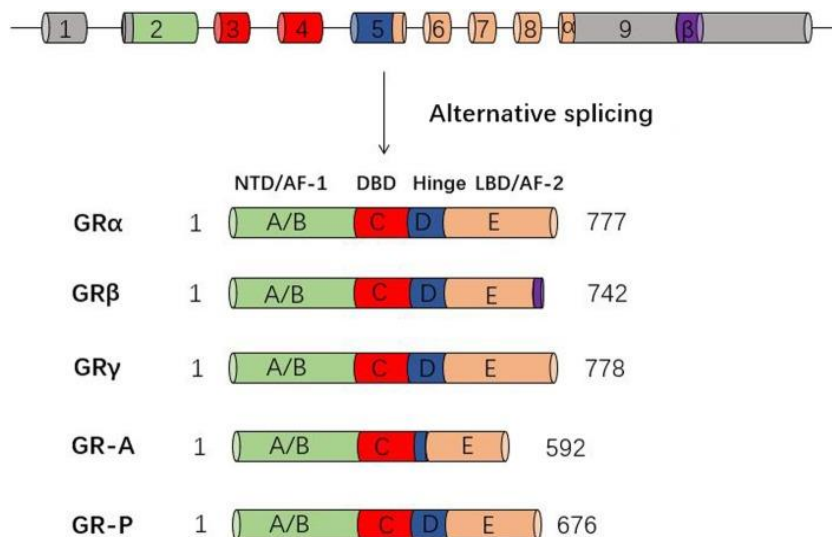
1.3.1 Ισομορφές λόγω εναλλακτικού ματίσματος

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών είναι αποκλειστικό προϊόν της μεταγραφής ενός μόνο γονιδίου, του NR3C1. Το ανθρώπινο γονίδιο του κωδικοποιεί τον υποδοχέα αποτελείται από 9 εξώνια (Εικόνα 3). Η αμινοτελική περιοχή NTD κωδικοποιείται κυρίως από το εξώνιο 2, η DBD κωδικοποιείται από τα εξώνια 3 και 4 και η LBD όπως και η ενδιάμεση περιοχή κωδικοποιούνται από τα εξώνια 5-9. Η σηματοδότηση που ακολουθεί την ενεργοποίηση του υποδοχέα μεταξύ άλλων επηρεάζεται από την ύπαρξη πολλών ισομορφών λόγω εναλλακτικού ματίσματος (Εικόνα 3). Η ύπαρξη τόσων διαφορετικών ισομορφών μπορεί εν μέρει να εξηγήσει πως από έναν μόνο υποδοχέα προκαλούνται τόσες φαρμακολογικές και κυτταρικές αποκρίσεις (Kino et al, 2009 - Han et al, 2019).

Το εναλλακτικό μάτισμα στο εξώνιο 9 του προϊόντος της μεταγραφής του γονιδίου οδηγεί στη δημιουργία δύο ισομορφών του GRα και του GRβ. Ο GRα προέρχεται από το μάτισμα του τέλους του εξωνίου 8 με την αρχή του εξωνίου 9, ενώ το GRβ προκύπτει από το μάτισμα του τέλους του εξωνίου 8 με αλληλουχίες που βρίσκονται προς το τέλος του εξωνίου 9. Από τις παραπάνω διαδικασίες προκύπτουν δυο πρωτεΐνες μήκους 777 και 742 αμινοξέων αντίστοιχα με τις αμινοξικές αλληλουχίες να είναι ίδιες μέχρι το αμινοξύ 727. Στην καρβοξυτελική αλληλουχία του GRβ υπάρχουν 15 μη ομόλογα αμινοξέα που προσδίδουν σε αυτή την μορφή του υποδοχέα πολλές διαφορετικές ιδιότητες (Kino et al, 2009).

Η ισομορφή GRβ είναι αρκετά διαδεδομένη σε αρκετούς κυτταρικούς τύπους αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα από την ισομορφή GRα (Oakley et al, 1996). Γενικά εμφανίζει αρκετές διαφορετικές ιδιότητες αφού εντοπίζεται διαρκώς στον πυρήνα των κυττάρων και δεν συνδέει αγωνιστές των γλυκοκορτικοειδών. Ταυτόχρονη παρουσία του GRα και του GRβ έχει ως αποτέλεσμα ο δεύτερος να λειτουργεί ως κυρίαρχος αναστολέας της δράσης του πρώτου και να ανταγωνίζεται τη δραστηριότητα του σε πολλά γονίδια στόχους. Μελέτες μικροσυστοιχιών σε κύτταρα που εκφράζουν επιλεκτικά το GRβ έχουν δείξει ότι ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων ανεξάρτητα από την αλληλεπίδραση του με τον GRα. Ο GRβ

φαίνεται ότι έχει την ικανότητα να στρατολογεί αποακετυλάσες των ιστονών και να τροποποιεί την τοπική οργάνωση της χρωματίνης με αποτέλεσμα να καταστέλλει ορισμένα γονίδια όπως η ιντερλευκίνη 5. Αυξημένα επίπεδα GRβ οδηγούν σε επιλεκτική αύξηση των προφλεγμονωδών κυτοκινών και άλλων πρωτεϊνών που ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό και σχετίζονται με εμφάνιση ανοχής σε φλεγμονώδεις διαταραχές όπως του άσθματος και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Lewis-Tuffin et al, 2007).



Han et al (2019), doi: 10.1186/s13287-019-1498-0.

Εικόνα 3: Ισομορφές του GR λόγω εναλλακτικού ματίσματος.

Μια επιπλέον ισομορφή του υποδοχέα, γνωστή ως GRγ, αποτελείται από 778 αμινοξέα και προκύπτει από το μάτισμα 3 βάσεων του εσωνίου που βρίσκεται μεταξύ του 3ου και 4ου εξωνίου, δηλαδή ενός αμινοξέος αργινίνης ανάμεσα στους 2 δακτυλίους ψευδαργύρου στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA του υποδοχέα. Τέλος, δύο επιπλέον ισομορφές είναι η GR-A και GR-P που αποτελούνται από 592 και 676 αμινοξέα αντίστοιχα. Στην περίπτωση της ισομορφής GR-A λείπουν τα ενδιάμεσα εξώνια 5-7 που κωδικοποιούν το μισό αμινοτελικό τμήμα της περιοχής που προσδέεται η ορμόνη και στη περίπτωση της ισομορφής GR-P λείπουν τα εξώνια 8-9 που κωδικοποιούν το μισό καρβοξυτελικό τμήμα της ίδιας περιοχής (Oakley and Cidlowski, 2011).

Οι τρεις λιγότερο καλά χαρακτηρισμένες ισομορφές του υποδοχέα, η GRγ, η GR-A και η GR-P έχουν ξεχωριστές ιδιότητες σηματοδότησης. Όσον αφορά την ισομορφή GRγ που εκφράζεται ευρέως στα κύτταρα, δεσμεύει τα γλυκοκορτικοειδή με παρόμοιο τρόπο με τον GRα όμως εμφανίζει διαφορετική μεταγραφική συμπεριφορά από τον GRα σε μια ομάδα γονιδίων που ρυθμίζονται από τα γλυκοκορτικοειδή. Οι αλλαγές στην περιοχή πρόσδεσης των ορμονών του υποδοχέα, στις ισομορφές GR-A και GR-P όπως ήταν αναμενόμενο αποτρέπουν τη δέσμευση των γλυκοκορτικοειδών στους υποδοχείς. Μέχρι σήμερα οι

γνώσεις μας σχετικά με τη δράση των παραπάνω ισομορφών του υποδοχέα είναι λίγες, ωστόσο για το GR-P έχει αποδειχθεί ότι τροποποιεί την μεταγραφική δραστηριότητα του GRα με ένα τρόπο εξαρτώμενο από τον κυτταρικό τύπο και επιπρόσθετα είναι η κύρια παραλλαγή του υποδοχέα που επικρατεί στα καρκινικά κύτταρα που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα γλυκοκορτικοειδή (Krett et al, 1995).

1.3.2 Ισομορφές λόγω εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης

Το μοναδικό mRNA που μεταγράφεται από το μοναδικό γονίδιο του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών έχει οκτώ διαφορετικά κωδικόνια έναρξης στο εξώνιο 2 με αποτέλεσμα κατά τη μετάφραση να δημιουργούνται οκτώ ισομορφές του GRα λόγω εναλλακτικής εκκίνησης της μετάφρασης όπως φαίνεται στην Εικόνα 4 (Oakley and Cidlowski, 2013). Πρόκειται για καλά διατηρημένες αμινοτελικές μεταγραφικές ισομορφές του GRα σε όλα τα είδη που διαφέρουν μεταξύ τους στην αμινοτελική αλληλουχία (NTD) η οποία σταδιακά γίνεται μικρότερη. Η ισομορφή GRα-A είναι ο πλήρους μήκους υποδοχέας που παράγεται όταν η μετάφραση ξεκινά από το πρώτο κωδικόνιο έναρξης. Η έναρξη της μετάφρασης από τα ενδιάμεσα κωδικόνια έναρξης οδηγεί στη δημιουργία των ισομορφών GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2 και GRα-D3. Οι ισομορφές του GRα λόγω εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης εμφανίζουν παρόμοια συγγένεια για τα γλυκοκορτικοειδή καθώς και παρόμοια ικανότητα αλληλεπίδρασης με τα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή έπειτα από την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Ωστόσο κάθε ισομορφή του GRα διαθέτει αξιοσημείωτες διαφορές σε άλλες ιδιότητες καθώς και ξεχωριστή ικανότητα ρύθμισης ενός μοναδικού συνόλου γονιδίων. Οι ισομορφές GRα-A, GRα-B και GRα-C, απουσία ορμόνης εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται στον πυρήνα μόνο μετά τη σύνδεση τους με τα γλυκοκορτικοειδή. Αντίθετα οι ισομορφές GRα-D εντοπίζονται μόνο στον πυρήνα των κυττάρων. Οι ισομορφές GRα-A και GRα-B είναι οι πιο άφθονες σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, ωστόσο υπάρχουν κάποιοι ιστοί που εκφράζουν κάποια άλλη ισομορφή σε μεγαλύτερη ποσότητα (π.χ. ανώριμα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν κυρίως την ισομορφή GRα-D). Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι η σύνθεση των ισομορφών GRα μπορεί να αλλάξει σε κάποιο ιστό ή σε κάποιο κύτταρο ως απόκριση σε διαφορετικές καταστάσεις. Παρόμοιες ισομορφές μπορούν να δημιουργηθούν και από τον GRβ (Gross et al, 2011 - Lu and Cidlowski, 2005).

1.4 Μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Καθεμία από τις εναλλακτικές μορφές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών που προκύπτουν από τη διαφορετική επεξεργασία του γονιδίου, υπόκειται σε μια ποικιλία μετα-

μεταφραστικών τροποποιήσεων που διαμορφώνουν περαιτέρω τη λειτουργία του, αυξάνουν σημαντικά την ποσότητα των ισομορφών του υποδοχέα που είναι διαθέσιμοι σε κάθε κύτταρο ελέγχοντας διαφορετικά το χρόνο ημιζωής τους και επηρεάζουν τη δραστηριότητα τους σε πολλά επίπεδα. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί δέκα τρεις διαφορετικές περιοχές μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Εικόνα 2).

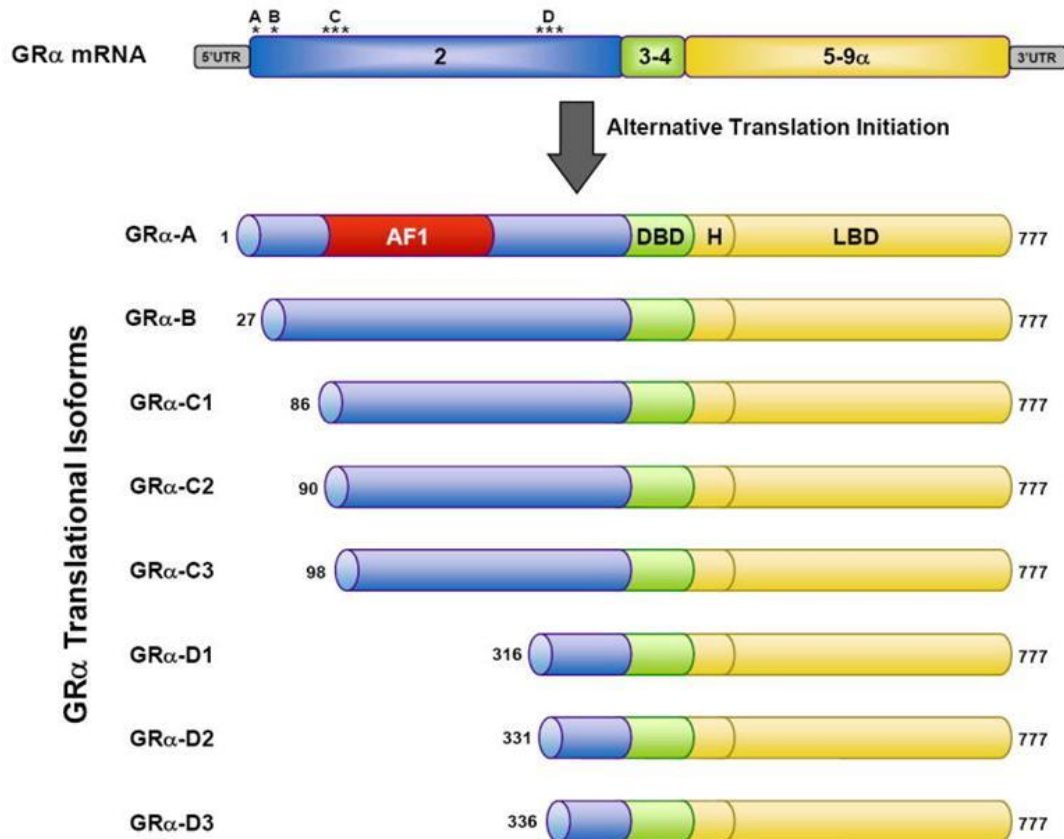
Η πρώτη και πιο εκτενώς μελετημένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση είναι η φωσφορυλίωση. Ο υποδοχέας GRα του ανθρώπου φωσφορυλιώνεται σε τουλάχιστον 7 κατάλοιπα σερίνης τα οποία βρίσκονται στο NTD του υποδοχέα από ποικίλες κινάσες μεταξύ των οποίων οι MAPK και οι GSK-3 (S113, S134, S141, S143, S203, S211, S226, and S404). Το επίπεδο φωσφορυλίωσης αυξάνεται μετά τη σύνδεση με τα γλυκοκορτικοειδή (Gallagher-Beckley, 2011).

Επιπρόσθετα η δομή του δεσμευόμενου γλυκοκορτικοειδούς επηρεάζει τόσο το είδος όσο και την έκταση της φωσφορυλίωσης. Εξαιρεση αποτελεί η φωσφορυλίωση της Ser-134 όπου γίνεται ανεξάρτητα από τα γλυκοκορτικοειδή. Ένα από τα σημαντικότερα αποτελέσματα της φωσφορυλίωσης του υποδοχέα GRα είναι ότι αλλάζει η μεταγραφική του δραστηριότητα κατά περίπτωση, με συνέπεια την επαγωγή ή την καταστολή της μεταγραφής γονιδίων. Επιπρόσθετα τροποποιείται η κυτταρική κατανομή του GRα μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος και ενισχύεται η αποικοδόμηση της πρωτεΐνης GRα στις φωσφορυλιωμένες μορφές του υποδοχέα μετά τη σύνδεση γλυκοκορτικοειδών (Blind and Garabedian, 2008).

Μια άλλη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που επηρεάζει τη λειτουργία του υποδοχέα είναι η ουβικουιλίνωση στη Lys-419 που οδηγεί στην πρωτεασωμική αποικοδόμηση του υποδοχέα. Δύο διαφορετικές αλλαγές (σουμοϋλίωση) που γίνονται από μικρούς τροποποιητές της ουβικιτίνης [small ubiquitin-related modifier (SUMO) proteins] στη περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής και μια στη περιοχή πρόσδεσης των ορμονών, απουσία πρόσδεσης των γλυκοκορτικοειδών καθώς επίσης και δύο διαφορετικές ακετυλίωσεις που συμβαίνουν σε αμινοξέα Lys εντός της περιοχής αλληλεπίδρασης με τα γλυκοκορτικοειδή τροποποιούν τη διαμόρφωση και τη δράση του υποδοχέα ενισχύοντας ή καταστέλλοντας τις αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένους συνρρυθμιστές (Deroo et al, 2002 – Wang and DeFranco, 2005).

Οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις του GRα που του επιτρέπουν να λειτουργεί ως μονομερές ή διμερές ή ετεροδιμερές μπορούν να ρυθμίσουν πολλές από τις λειτουργίες του, παρέχοντας στα κύτταρα μια επιπλέον ετερογένεια όσον αφορά τον έλεγχο της απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή. Η ύπαρξη πολλών ισομορφών του υποδοχέα καθώς και η παρουσία

πολλών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων συμβάλλουν στην ποικιλομορφία των γενομικών και μη γενομικών δράσεων του GR και εν μέρη εξηγούν τις πολλαπλές φυσιολογικές δραστηριότητες στις οποίες εμπλέκεται ο υποδοχέας (Davies et al, 2008 - Holmstorm et al, 2003 - Holmstorm et al, 2008).



Oakley and Cidlowski (2013), doi:10.1016/j.jaci.2013.09.007.

Εικόνα 4: Ισομορφές του GR λόγω εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης.

1.5 Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Ο GR ενεργοποιείται από τη πρόσδεση της αντίστοιχης ορμόνης (γλυκοκορτικοειδές) και ρυθμίζει τη μεταγραφή εκατοντάδων γονιδίων-στόχων. Απουσία ορμόνης ο GR βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και αλληλοεπιδρά με πρωτεΐνες-συνοδούς (hsp90 και p23) και πρωτεΐνες της οικογένειας των ανοσοφιλινών (FKBP51 και FKBP52). Στη μορφή αυτού του συμπλόκου ο GR μπορεί να συνδέσει ορμόνη με υψηλή χημική συγγένεια πρόσδεσης. Η σύνδεση της ορμόνης προκαλεί τη διάσπαση του συμπλόκου με αποτέλεσμα να αλλάξει η διαμόρφωσή του υποδοχέα και να ακολουθεί η μετατόπιση του στον πυρήνα (Alexis et al, 1992 - Pratt and Toft, 1997) όπου ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων με διαφορετικούς μηχανισμούς (Cruz-Torpete and Cidlowski, 2015) όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.

1.5.1 Άμεση σύνδεση υποδοχέα με στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή

Μέσα στον πυρήνα ο υποδοχέας μπορεί να συνδεθεί άμεσα με τις αλληλουχίες απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs) και να ρυθμίσει την έκφραση γονιδίων-στόχων του. Η βέλτιστη αλληλουχία των GRE είναι μία ανεστραμμένη παλίνδρομη αλληλουχία 6 ζευγών βάσεων που χωρίζεται από 3 ζεύγη βάσεων, το PuGNACANNNTGTNCPy, όπου κάθε μόριο GR δεσμεύεται σε κάθε παλίνδρομο, σχηματίζοντας ένα ομοδιμερές σε αυτή τη θέση δέσμευσης μέσω πολλαπλών επαφών μεταξύ των 2 μορίων του υποδοχέων (Εικόνα 6). Η απόσταση των 3 ζευγών βάσεων κρίνεται απαραίτητη για να μπορεί να γίνει ο διμερισμός του GR κατά τη σύνδεση του με την αλληλουχία έτσι ώστε κάθε μονομερές του υποδοχέα να καταλαμβάνει έξι βάσεις. Στην πραγματικότητα μόλις ένα μικρό τμήμα καταλαμβάνεται από τον υποδοχέα και οι ειδικές θέσεις δέσμευσης διαφέρουν μεταξύ διαφορετικών ιστών αφού οι διαφορές στην προσβασιμότητα της χρωματίνης δημιουργούν διαφορετικά σημεία έκθεσης της αλληλουχίας. Διαφορετικά γλυκοκορτικοειδή μπορούν να προκαλέσουν διαφορετικές διαμορφωτικές αλλαγές και διαφορετικό βαθμό ενεργοποίησης του υποδοχέα όσον αφορά την ικανότητα διμερισμού. Συνήθως η σύνδεση του υποδοχέα στις αλληλουχίες GRE οδηγούν στην ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων (Meijsing et al, 2009 - Nicolaidis et al, 2020).

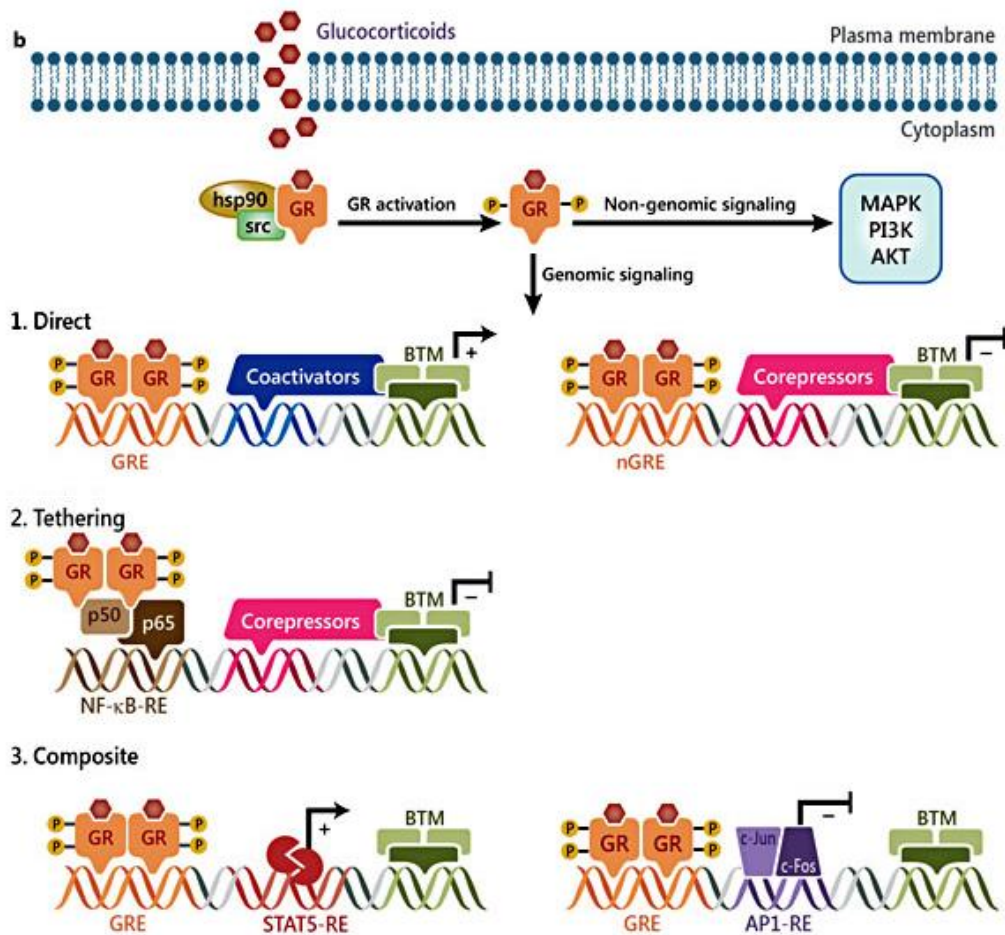
Ο υποδοχέας μπορεί να συνδεθεί απευθείας και σε αλληλουχίες αρνητικής απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (nGREs) που αφθονούν σε ολόκληρο το γονιδίωμα. Η αλληλουχία των nGREs είναι ένα ανεστραμμένο τετραμερές παλίνδρομο που χωρίζεται από 0-2 ζεύγη νουκλεοτιδίων (CTCC(N)0-2GGAGA) όπου δύο μόρια GR δεσμεύονται σε κάθε παλίνδρομο ως μονομερή με διαφορετική συγγένεια με τρόπο που δεν τους επιτρέπει να διμερίζονται (Εικόνα 6). Η σύνδεση του GR στα nGREs οδηγεί σε καταστολή της μεταγραφής γονιδίων-στόχων μέσω της συναρμολόγησης ενός συμπλόκου που προσελκύει τις ακετυλάσες των ιστονών (Surjit et al, 2011 - Hudson et al, 2013 - Nicolaidis et al, 2020).

Γονιδιωματικές μελέτες έδειξαν ότι στην πλειοψηφία τους οι περιοχές σύνδεσης του υποδοχέα στη χρωματίνη βρίσκονται αρκετά μακριά από τον υποκινητή των γονιδίων-στόχων του. Όταν ο υποδοχέας συνδέεται με τα στοιχεία απόκρισης, αλλάζει διαμόρφωση, προσελκύει σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και πρωτεΐνες ρυθμιστές, που επηρεάζουν τη δράση της RNA πολυμεράσης II και καθορίζουν το ρυθμό μεταγραφής των γονιδίων. Το είδος του γλυκοκορτικοειδούς καθώς και οι ειδικές αλληλουχίες θετικής ή αρνητικής απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή καθορίζουν την ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων του GR (Nicolaidis et al, 2020).

1.5.2 Φυσική αλληλεπίδραση υποδοχέα με μεταγραφικούς παράγοντες

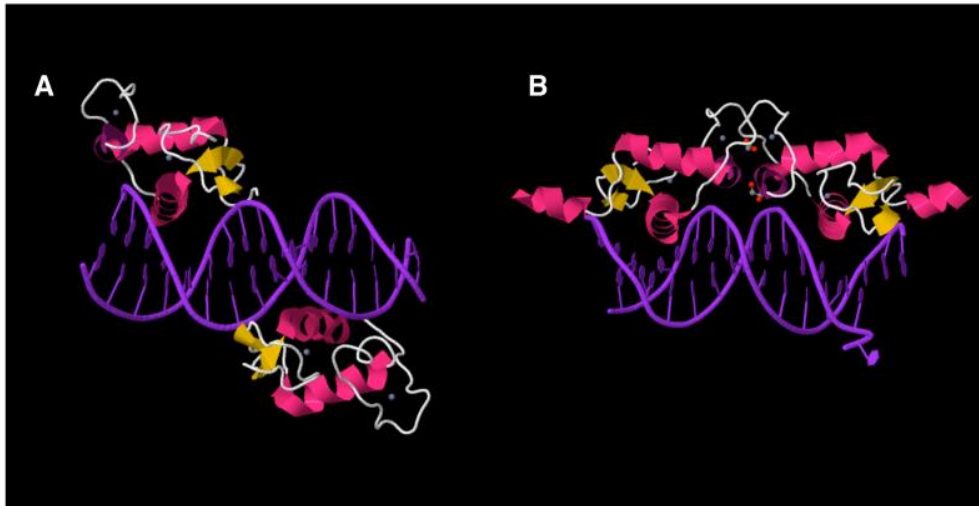
Ένας δεύτερος μηχανισμός δράσης του υποδοχέα είναι η ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων μέσω αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες. Ο υποδοχέας μπορεί να αλληλοεπιδρά άμεσα με τον ενεργοποιημένο και συνδεδεμένο στη χρωματίνη προφλεγμονώδη μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ και να αναστέλλει την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων-στόχων του NF-κΒ (Nissen and Yamamoto, 2000) (Εικόνα 5-2). Ο παραπάνω μοριακός μηχανισμός εμπλέκεται τουλάχιστον εν μέρει στην αντιφλεγμονώδη δράση του GR.

Εναλλακτικά ο GR μπορεί να ενεργοποιεί ή να καταστέλλει την έκφραση ορισμένων γονιδίων με ένα πιο σύνθετο τρόπο. Άμεση σύνδεση του υποδοχέα σε στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή και αλληλεπίδραση με παρακείμενα συνδεδεμένους στη χρωματίνη μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο AP1 οδηγεί σε καταστολή της δράσης τους. Παρόμοια αλληλεπίδραση του υποδοχέα με συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας STAT έχει βρεθεί ότι ενισχύει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους (Groeneweg et al, 2012) (Εικόνα 5-3).



Cruz-Topete and Cidlowski (2015), doi: 10.1159/000362724.

Εικόνα 5. Ενεργοποίηση του GR μετά από σύνδεση ορμόνης και μηχανισμοί δράσης του.



Nicolaides et al (2020), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279171/>

Εικόνα 6. Σύνδεση του GR σε GREs και nGREs. Κάθε μόριο GR συνδέεται ως μονομερές σε κάθε παλίνδρομη αλληλουχία των nGREs (A) σε αντίθεση με τη σύνδεσή του ως διμερές στα κλασικά GREs (B).

1.5.3 Μη γενωμική σηματοδότηση του υποδοχέα

Ένα σύνολο στοιχείων δείχνει ότι ο υποδοχέας μπορεί να λειτουργήσει και μέσω μη γονιδιωματικών μηχανισμών και να οδηγήσει σε άμεση κυτταρική απόκριση εντός λίγων δευτερόλεπτων ως και κάποιων λεπτών, τροποποιώντας την ενεργότητα διάφορων κινασών όπως της AKT, PI3K και MAPKs. Η διαδικασία γίνεται μέσω του υποδοχέα που είναι δεσμευμένος στην μεμβράνη ή μέσω του υποδοχέα που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και αλληλοεπιδρά με τις κινάσες τροποποιώντας τη μεταγωγή σήματος (Nissen and Yamamoto, 2000).

1.6 Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ

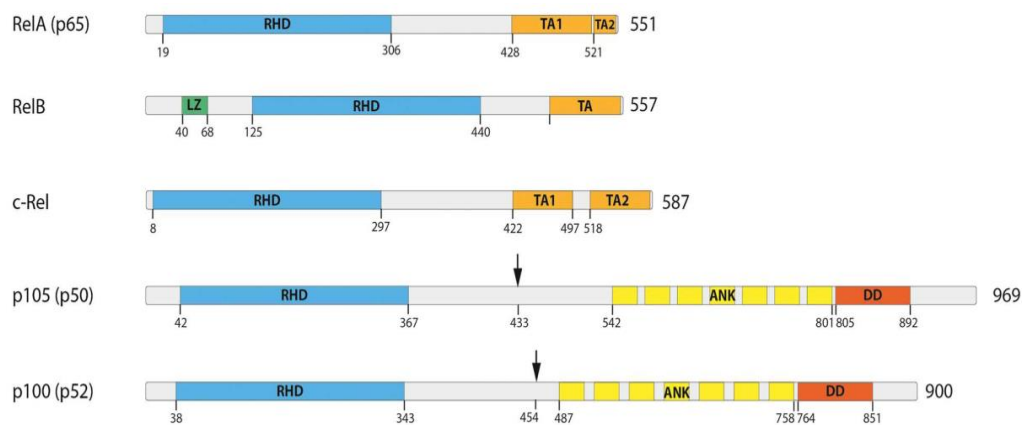
Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ ανακαλύφθηκε το 1986 από την ομάδα του David Baltimore. Πρόκειται για έναν μεταγραφικό παράγοντα που εκφράζεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα και εμπλέκεται σε πληθώρα διαδικασιών μεταξύ των οποίων η ανοσοαπόκριση, η αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η αναστολή της απόπτωσης, η κυτταρική μετανάστευση, η ανάπτυξη των δευτερογενών λεμφικών οργάνων, η κυτταρική διαφοροποίηση κ.α. (Samarasinghe et al, 2011). Η ενεργοποίηση του προκαλείται από βακτηριακές και ιογενείς λοιμώξεις, προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες, οξειδωτικό στρες και βλάβες στο DNA (Taniguchi and Karin, 2018). Αξιοσημείωτη είναι η ικανότητα του να τροποποιεί τη βιολογική «συμπεριφορά» των κυττάρων λόγω των εκατοντάδων γονιδίων-στόχων που ενεργοποιεί ή καταστέλλει, έτσι η μη αναμενόμενη ενεργοποίηση του σχετίζεται

με την εκδήλωση αυτοάνοσων νοσημάτων, νευροεκφυλιστικών ασθενειών, διαβήτη, καρκίνο και πολλά άλλα (Dorrington and Fraser, 2019).

Έρευνες 35 ετών αποδεικνύουν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ δεν είναι απλά μια πρωτεΐνη αλλά μια οικογένεια 15 πρωτεϊνικών ομοδιμερών ή ετεροδιμερών συμπλόκων από μόλις 5 μονομερή (RelA/p65, RelB, cRel, NF-κΒ1 p50 και NF-κΒ p52) (Εικόνα 7) και ότι αυτά μπορούν να επάγουν ή να καταστείλουν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων λόγω της αλληλεπίδρασης τόσο με το μοτίβο κΒ (πρόκειται για μια παλίνδρομη αλληλουχία βάσεων 5'GGGRNWWYCC3' όπου N, οποιαδήποτε βάση, R, μια πουρίνη, W, μια αδενίνη ή μια θυμίνη και Y, μια πυριμιδίνη) που βρίσκεται σε εκατοντάδες γονίδια όσο και με την οικογένεια των ανασταλτικών πρωτεϊνών ΙκΒ (Hayden and Ghosh, 2012 - Hoesel and Schmid, 2013). Ένας μεγάλος αριθμός στοιχείων θετικής ή αρνητικής ρύθμισης επηρεάζει την ενεργοποίηση του NF-κΒ. Στην ανενεργή μορφή τα διμερή του NF-κΒ βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα αλληλοεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες ΙκΒ (αναστολέας του NF-κΒ). Με την πρόκληση μιας φλεγμονώδους αντίδρασης ή κάποιου άλλου ερεθίσματος, ο ΙκΒ φωσφορυλιώνεται και αποδομείται ταχέως απελευθερώνοντας το διμερές του NF-κΒ που μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου συνδέεται με ειδικές αλληλουχίες του DNA και προάγει ή καταστέλλει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων συμπεριλαμβανομένων των προφλεγμονωδών κυτοκινών, των χημειοκινών κ.α. (Hoesel and Schmid 2013). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας του NF-κΒ σχηματίζουν μια σειρά από διαφορετικούς συνδυασμούς διμερών που μπορούν να αναγνωρίσουν ξεχωριστές περιοχές της αλληλουχίας κΒ με διαφορετική χημική συγγένεια πρόσδεσης και έτσι προκαλούν πληθώρα αποτελεσμάτων όσον αφορά τη γονιδιακή σηματοδότηση (Hayden and Ghosh, 2012). Αμέσως μόλις το ερέθισμα παύει να υπάρχει τότε το μονοπάτι επανέρχεται στην αρχική του μορφή με την απενεργοποίηση του συμπλόκου των ΙκΒ κινασών (IKK), την επανασύνθεση των ΙκΒ πρωτεϊνών και την μετατόπιση στο κυτταρόπλασμα των διμερών του NF-κΒ (Hayden and Ghosh, 2012).

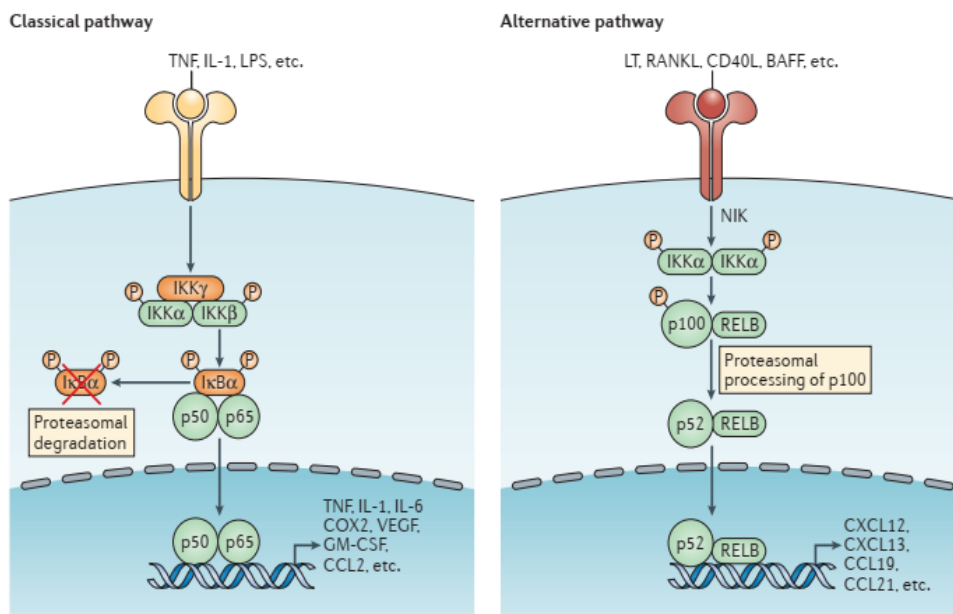
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η κύρια ρύθμιση των γεγονότων που συμβαίνουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκεται ο NF-κΒ γίνεται από την οικογένεια ανασταλτικών πρωτεϊνών, ΙκΒ. Η οικογένεια ΙκΒ περιλαμβάνει τους αναστολείς ΙκΒα, ΙκΒβ, ΙκΒε, BCL-3, ΙκΒζ, ΙκΒNS και τις πρόδρομες μορφές πρωτεϊνών p105 και p100. Απουσία των αναστολέων ΙκΒ επιτυγχάνεται η μετατόπιση των διμερών του NF-κΒ από το κυτταρόπλασμα στο πυρήνα και η έκφραση του γονιδίου στόχου παρέχοντας σε βιοχημικό επίπεδο στο κύτταρο ένα μοριακό διακόπτη που αποκρίνεται ταχύτατα σε διάφορα ερεθίσματα συμπεριλαμβανομένου αυτού της φλεγμονής. Η σηματοδότηση μέσω του NF-κΒ περιλαμβάνει εκτός από την ποικιλομορφία διμερισμών και δύο ξεχωριστές στρατηγικές ενεργοποίησης την κανονική και

την εναλλακτική ή μη κανονική (Taniguchi and Karin, 2018 - Hoesel and Schmid, 2013). Το πρώτο βήμα για την ενεργοποίηση είναι οι μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις των αναστολέων IκB. Η μη κανονική ενεργοποίηση είναι πιο αργή και μεγαλύτερης διάρκειας και σχετίζεται κυρίως με τις υπομονάδες p50-p65, ενώ αντίθετα η κανονική ενεργοποίηση γίνεται μέσω των p52-RELB, είναι γρηγορότερη και αυτό καθιστά το μονοπάτι σημαντικό για την ενεργοποίηση της ενεργητικής ανοσίας και ειδικότερα της πρώτης γραμμής άμυνας όπως τα μακροφάγα (Hayden and Ghosh, 2012) (Εικόνα 8). Τα τυπικά γονίδια στόχοι της κανονικής ενεργοποίησης είναι όσα κωδικοποιούν προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (TNF, IL6), χημειοκίνες (IL8), προφλεγμονώδη ένζυμα, πρωτεΐνες που αναστέλλουν την απόπτωση κ.α. (Dorrington and Fraser, 2019).



Hoesel and Schmid (2013). doi: 10.1186/1476-454598-12-86.

Εικόνα 7. Τα 5 μονομερή του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.



Taniguchi and Karin (2018). doi:10.1038/nri.2017.142.

Εικόνα 8. Κανονική και εναλλακτική (μη κανονική) ενεργοποίηση του NF-κB.

1.7 NF-κB και καρκίνος

Η ογκογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που χωρίζεται σε 3 στάδια, την έναρξη του όγκου (δηλαδή τη συσσώρευση μεταλλάξεων στα κύτταρα), την προαγωγή του όγκου και τέλος την εξέλιξή του (δηλαδή την απόκτηση περαιτέρω μεταλλάξεων). Ο NF-κB διαδραματίζει αξιολογούμενο ρόλο σε καθένα από τα παραπάνω βήματα. Η σημαντικότερη επίδραση του NF-κB στην έναρξη της ογκογένεσης σχετίζεται με την προαγωγή των καρκινικών κυττάρων ενισχύοντας τόσο το κυτταρικό πολλαπλασιασμό (προωθώντας την παραγωγή κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων) όσο και την επιβίωση τους (αναστέλλοντας την απόπτωση). Δύο από τις καλύτερα μελετημένες κυτοκίνες που εμπλέκονται με την καρκινογένεση είναι ο TNF και η ιντερλευκίνη 6 (IL6), η έκφραση των οποίων είναι αυξημένη σε πολλούς διαφορετικούς τύπους καρκινικών κυττάρων και σχετίζονται με κακή πρόγνωση. Ο πρώτος επιβεβαιωμένος στόχος του NF-κB που σχετίζεται με τη φλεγμονή και την ογκογένεση ήταν η IL6 που παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα. Η σηματοδότηση μέσω του TNF περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του NF-κB καθώς επίσης των MAPKs (κινασών που προάγουν τη μίτωση) και μπορεί είτε να προάγουν το κυτταρικό θάνατο είτε να αυξήσουν την κυτταρική επιβίωση ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον. Ο TNF παράγεται κυρίως από ενεργοποιημένα μακροφάγα και προκαλεί την παραγωγή άλλων προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL1, IL6) που επιταχύνουν την ογκογένεση. Εκτός από τις κυτοκίνες ο NF-κB επάγει την παραγωγή πολλών χημειοκινών σε κακοήθη κύτταρα, οι οποίες είναι σημαντικές τόσο για τη στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού στη περιοχή του όγκου όσο και για την ανάπτυξη, την αγγειογένεση και τη μετάσταση (Taniguchi and Karin, 2018).

1.8 Ο ρόλος του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στη φλεγμονή: προφλεγμονώδης και αντιφλεγμονώδης δράση

Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική για την θεραπεία φλεγμονωδών και αυτοάνοσων ασθενειών. Ο ρόλος του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στη φλεγμονή είναι διττός. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να προκαλέσουν ταυτόχρονα την ενεργοποίηση τόσο προφλεγμονωδών όσο και αντιφλεγμονωδών μονοπατιών (Cruz-Torpete and Cidlowski, 2015). Σε κυτταρικό επίπεδο, υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ της προφλεγμονώδους και της αντιφλεγμονώδους δράσης του GR, η οποία μπορεί να μετατοπίζεται εκατέρωθεν ανάλογα με το ερέθισμα. Καθοριστικός παράγοντας για τη μετατόπιση της ισορροπίας φαίνεται να είναι ο χρόνος της θεραπείας καθώς επίσης και η σειρά των ερεθισμάτων. Για παράδειγμα σε κύτταρο που προηγήθηκε η πρόκληση της φλεγμονής και

ακολούθησε η προσθήκη των γλυκοκορτικοειδών, τα γλυκοκορτικοειδή άσκησαν αντιφλεγμονώδη δράση.

Η αντιφλεγμονώδης δράση του GR και των γλυκοκορτικοειδών αποδίδεται κυρίως στην καταστολή των προφλεγμονωδών γονιδίων μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης του GR με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Τα προφλεγμονώδη μόρια που απελευθερώνονται κατά τη φλεγμονή εκκινούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που έχουν ως τελικό στόχο την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 και NF-κB. Οι μεταγραφικοί παράγοντες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τη σύνθεση προφλεγμονωδών μορίων, δημιουργώντας ένα βρόγχο θετικής ανάδρασης, με στόχο την ενίσχυση της φλεγμονής. Τα γλυκοκορτικοειδή, μπορούν να προάγουν την έκφραση πρωτεϊνών που ανταγωνίζονται τις προφλεγμονώδεις διεργασίες σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Σε κάποια κύτταρα τα γλυκοκορτικοειδή ενεργοποιούν την έκφραση του IκBα, αναστολέα του NF-κB. Κατά την φλεγμονώδη αντίδραση, μπορούν επίσης, άμεσα, να καταστέλλουν τη μεταγραφική δραστηριότητα άλλων προφλεγμονωδών μεταγραφικών παραγόντων. Με αυτό το τρόπο τα γλυκοκορτικοειδή διασφαλίζουν ότι δεν υπάρχει παρατεταμένη ή υπερβολική παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών επαναφέροντας τελικά την ομοιόσταση (Petta et al, 2016).

Η πολυπλοκότητα του ρόλου των γλυκοκορτικοειδών στις φλεγμονώδεις διεργασίες φαίνεται από το παράδειγμα της συμμετοχής των γλυκοκορτικοειδών και του υποδοχέα τους στη διαδικασία επούλωσης του τραύματος όπου συμμετέχουν σε κάθε μία από τις τρεις φάσεις της. Στη πρώτη φάση, φάση συναγερμού όπου πυροδοτείτε η απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών, τα γλυκοκορτικοειδή εξασθενούν πολλά μονοπάτια διαμεμβρανικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που λειτουργούν ως αισθητήρες κινδύνου και καταστέλλουν έτσι την παραγωγή των φλεγμονωδών μεσολαβητών. Στη δεύτερη φάση, φάση της κινητοποίησης, τα λευκοκύτταρα διεισδύουν στην περιοχή του τραύματος, τα γλυκοκορτικοειδή ρυθμίζουν την παραγωγή πολλών χημειοκινών (IL8, CCL2) περιορίζοντας την κυτταρική μετανάστευση των λευκοκυττάρων. Στη τρίτη και τελευταία φάση (φάση της <<επίλυσης>>), ο κυτταρικός ιστός καθαρίζεται από τα κυτταρικά υπολείμματα, τα γλυκοκορτικοειδή προάγουν τη φαγοκυττάρωση που μεσολαβείται από τα μακροφάγα τόσο των κυττάρων που οδηγούνται σε απόπτωση όσο και των κυτταρικών υπολειμμάτων της φλεγμονής. Τέλος τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν πολλές διαδικασίες επούλωσης πληγών όπως η εναπόθεση του κολλαγόνου και η αγγειογένεση. Η εξασθένιση της δράσης των γλυκοκορτικοειδών κρίνεται απαραίτητα για την μετάβαση από τη φλεγμονή στην επούλωση του τραύματος (Desmet and Bosscher, 2018).

1.9 Κλινική Χρήση των Γλυκοκορτικοειδών – Παρενέργειες

Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως για την θεραπεία φλεγμονωδών και αυτοάνοσων ασθενειών από τα τέλη της δεκαετίας του 1940. Όμως, η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή συχνά οδηγεί σε ένα μεγάλο εύρος δυσμενών παρενεργειών. Αναλυτικά, η μακροχρόνια χορήγηση γλυκοκορτικοειδών οδηγεί στις παρακάτω παρενέργειες (Merih et al, 2016).

1.9.1 Μυοσκελετικές παρενέργειες: Οστεοπόρωση-Οστεονέκρωση -Μυοπάθεια

Η καταστολή της λειτουργίας των οστεοβλαστών αποτελεί την κύρια παρενέργεια των γλυκοκορτικοειδών στον μεταβολισμό των οστών οδηγώντας σε οστεοπόρωση. Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν την κύρια αιτία μη τραυματικής οστεονέκρωσης και σχεδόν το 40% των ασθενών μπορεί να παρουσιάσουν Οστεονέκρωση μετά από μακράς διάρκειας θεραπείας με γλυκοκορτικοειδή. Η οστεοπόρωση και η Οστεονέκρωση συνδέονται με υψηλές δόσεις και εκτεταμένη θεραπεία, αλλά μπορεί επίσης να συμβεί μετά από βραχυπρόθεσμη έκθεση.

Η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στους μυς περιλαμβάνει μειωμένη σύνθεση πρωτεϊνών και αυξημένο ρυθμό καταβολισμού των πρωτεϊνών που οδηγεί σε μυϊκή ατροφία. Έχει δειχθεί ότι η μυοπάθεια που προκαλείται από τα γλυκοκορτικοειδή είναι πιο συνήθης με τη χρήση φθοριωμένων γλυκοκορτικοειδών όπως η δεξαμεθαζόνη και η βηταμεθαζόνη παρά με τη χρήση μη φθοριωμένων γλυκοκορτικοειδών όπως η πρεδνιζολόνη. Η δόση των γλυκοκορτικοειδών που σχετίζεται με την μυοπάθεια ποικίλει σημαντικά μεταξύ των ασθενών (Weinstein, 2012 - Schakman et al, 2008).

1.9.2 Ενδοκρινικές και μεταβολικές παρενέργειες:

1.9.2.1 Επίδραση στον μεταβολισμό της γλυκόζης

Έχει δειχθεί ότι η επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στο μεταβολισμό της γλυκόζης εξαρτάται από την δοσολογία και προκαλεί μέτρια αύξηση στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα σε συνθήκες νηστείας και μεγαλύτερη αύξηση σε συνθήκες χώνεψης σε ασθενείς που δεν προϋπήρχε σακχαρώδης διαβήτης. Η υπεργλυκαιμία που επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή είναι πολυπαραγοντική, και πιθανώς οφείλεται στην αύξηση της ηπατικής γλυκονεογένεσης, την καταστολή της κατανάλωσης γλυκόζης στο λιπώδη ιστό και στην διαφοροποίηση των λειτουργιών που σχετίζονται με τους υποδοχείς που επάγονται από τα γλυκοκορτικοειδή (Olefsky and Kimmerling, 1976).

1.9.2.2 Αύξηση βάρους και χαρακτηριστικά Cushingoid

Τα χαρακτηριστικά Cushingoid και η αύξηση βάρους είναι αρκετά ενοχλητικές παρενέργειες που σχετίζονται με τα γλυκοκορτικοειδή. Τα χαρακτηριστικά Cushingoid είναι αποτέλεσμα

της αναδιανομής του σωματικού λίπους μετά από μακράς διάρκειας θεραπείας με γλυκοκορτικοειδή (Da Silva et al, 2006).

1.9.2.3 Καταστολή της ανάπτυξης

Η καταστολή της ανάπτυξης είναι μια πολύ σημαντική και αρκετά χαρακτηρισμένη επιπλοκή της θεραπείας με γλυκοκορτικοειδή σε παιδιά. Ο μηχανισμός της καταστολής της ανάπτυξης περιλαμβάνει την επίδραση των γλυκοκορτικοειδών σε απαραίτητα στοιχεία του αναβολισμού και της ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού των οστών, κατακράτηση αζώτου και επίδραση στην διαμόρφωση του κολλαγόνου. Έχει επίσηςδειχθεί ότι τα γλυκοκορτικοειδή ακόμα και σε μέτριες δόσεις, οδηγούν σε καταστολή της απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης (Braith et al, 1988).

1.9.2.4 Καταστολή του φλοιού των επινεφριδίων

Χορήγηση εξωγενών γλυκοκορτικοειδών μπορεί να καταστείλει την λειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA) και έχειδειχθεί ότι μακράς διάρκειας χρήση γλυκοκορτικοειδών σχετίζεται με καταστολή του φλοιού των επινεφριδίων με σημαντική διαφορά στην απόκριση των διαφόρων ατόμων. Ασθενείς που κάνουν χρόνια χρήση των γλυκοκορτικοειδών μπορεί να υποφέρουν από υπόταση και κατάρρευση του καρδιαγγειακού συστήματος αν τα στεροειδή αποσυρθούν ξαφνικά ως αποτέλεσμα της καταστολής του φλοιού των επινεφριδίων (Aceto et al, 1996).

1.9.3 Γαστρεντερικές παρενέργειες

Τα γλυκοκορτικοειδή θεωρούνται ως ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για μία σειρά από γαστρεντερικές παρενέργειες συμπεριλαμβανομένων των γαστρίτιδα, δημιουργία έλκους, γαστρεντερική αιμορραγία κ.α. (Sadr-Azodi et al, 2013).

1.9.4 Καρδιοαγγειακές και Καρδιακές παρενέργειες

Ο κίνδυνος ανάπτυξης υπέρτασης αυξάνεται σχεδόν σε διπλάσιο βαθμό σε ασθενείς στους οποίους χορηγούνται κορτικοστεροειδή ανεξάρτητα από τη διάρκεια της θεραπείας. Ο κίνδυνος καρδιακής προσβολής, ισχαιμικού επεισοδίου, καρδιακής ανεπάρκειας ακόμα και του ξαφνικού θανάτου έχει αναφερθεί ότι αυξάνεται 2-4 φορές μετά από τη χρήση 7,5 mg ή περισσότερο πρεδνιζολόνης (Sato et al, 1995).

1.9.5 Δερματολογικές παρενέργειες

Τα κορτικοστεροειδή επηρεάζουν τα κερατινοκύτταρα και αποτρέπουν τον διαχωρισμό του κολλαγόνου και του ιαλουρονικού οξέος από τους ινοβλάστες στο δέρμα. Αυτό εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων με επακόλουθο το αδυνάτισμα του δέρματος στη χρόνια χρήση γλυκοκορτικοειδών. Η χρόνια ανεπάρκεια και ευθραυστότητα του δέρματος

ονομάζεται δερματοπόρωση, συγκρινόμενη με την οστεοπόρωση στους γηραιούς (Sadri-Azodi et al, 2013).

1.9.6 Νευροψυχιατρικές παρενέργειες

Νευροψυχιατρικά συμπτώματα όπως στοιχειώδης αλλαγές διάθεσης, κατάθλιψη, ευφορία, ευερεθιστότητα, αστάθεια διάθεσης, ακαθισία και άγχος, καθώς και διανοητικές αναπηρίες που επηρεάζουν την προσοχή, τη συγκέντρωση και τη μνήμη έχουν καταγραφεί μετά από θεραπεία με κορτικοστεροειδή (Fardet et al, 2007).

1.9.7 Οφθαλμολογικές παρενέργειες

Ο καταρράκτης(11-15%) και το γλαύκωμα (12,8%) αποτελούν δύο από τις πιο συνήθεις οφθαλμολογικές παρενέργειες των γλυκοκορτικοειδών. Ο κίνδυνος αυξάνεται όταν αυξάνεται η δοσολογία και η χρονική διάρκεια της θεραπείας.

Τα συστημικά γλυκοκορτικοειδή μπορούν να οδηγήσουν σε ενδοφθalmική πίεση σε 18-36% του πληθυσμού. Φαίνεται ότι μία γενετική προδιάθεση υπάρχει για την ανάπτυξη γλαυκώματος. Άλλες οφθαλμικές παρενέργειες, δευτερογενείς στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή περιλαμβάνουν πτώση βλέφαρου, μυδρίαση και σε υψηλές δόσεις κορτικοστεροειδών ευκαιριακές μολύνσεις όπως κερατίτιδα και αμφιβληστροειδίτιδα που προκαλείται από τον ιό έρπη (Fel et al, 2012).

1.9.8 Ανοσολογικές παρενέργειες

Η θεραπεία με μακροχρόνια χορήγηση συστημικών στεροειδών καταστέλλει την ανοσολογική λειτουργία και εκθέτει τους ασθενείς σε ενδοκυτταρικές μολύνσεις. Μεταβάλλει, επίσης, την λειτουργία των μονοκυττάρων, η οποία επανέρχεται ταχύτατα με το σταμάτημα της θεραπείας. Η επίδραση των κορτικοστεροειδών στο ανοσολογικό σύστημα εξαρτάται από το μέγεθος της δόσης και τη σύντομη ή επαναλαμβανόμενη θεραπεία, ενώ ο κίνδυνος μόλυνσης παραμένει ο ίδιος (Grossi and Genereau, 2013).

1.10 Επιλεκτικοί Αγωνιστές του Υποδοχέα Γλυκοκορτικοειδών

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1940 τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται ως ισχυρά αντιφλεγμονώδη φάρμακα για τη θεραπεία των φλεγμονωδών και αυτοάνοσων νοσημάτων. Παρά τις παρενέργειες η θεραπευτική χρήση των γλυκοκορτικοειδών ολοένα και αυξάνεται όμως υπάρχει ανάγκη για εύρεση νέων φαρμάκων που θα έχουν τα θεραπευτικά πλεονεκτήματα των γλυκοκορτικοειδών με όσο το δυνατό λιγότερες παρενέργειες. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η πλειοψηφία των παρενεργειών των γλυκοκορτικοειδών διαμεσολαβούνται από την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων του GR ενώ η αντιφλεγμονώδης δράση τους σε καταστολή της δράσης άλλων μεταγραφικών παραγόντων, κυρίως του NFκB.

Επομένως, ο διαχωρισμός της αντιφλεγμονώδους δράσης από τις παρενέργειες με ταυτοποίηση νέων αγωνιστών του GR που επιλεκτικά θα διαμεσολαβούν κυρίως την καταστολή γονιδίων-στόχων του NF-κΒ και λιγότερο ή καθόλου την επαγωγή γονιδίων-στόχων του GR που συνδέονται με τις παρενέργειες έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Τέτοιοι επιλεκτικοί αγωνιστές (Selective Glucocorticoid Receptor Agonists, SEGRA) θα μπορούσε να έχουν βελτιωμένο θεραπευτικό προφίλ κάτι που είναι ιδιαίτερα σημαντικό στις μακροχρόνιες θεραπείες με γλυκοκορτικοειδή.

Ένας μεγάλος αριθμός υποψηφίων επιλεκτικών αγωνιστών του GR έχει αναπτυχθεί με σημαντική συμβολή μεγάλων φαρμακευτικών εταιρειών όπως GlaxoSmithKline, Abbott, Bayer Schering Pharma, Bristol-Myers Squibb, Merck, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals κ.α. (Barker et al, 2006 - Biggadike et al, 2009 - De Bosscher et al, 2010 - Betageri et al, 2011 - Sundahl et al, 2015 - Moortel et al, 2020). Η ανάπτυξη νέων επιλεκτικών αγωνιστών του GR βασίζεται στην παρατήρηση ότι ο υποδοχέας διαθέτει μία εξαιρετικά εύπλαστη περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (ligand binding domain, LBD) και μπορεί να προσδέσει τόσο στεροειδή όσο και μη στεροειδή μόρια πολύ διαφορετικού τύπου και μεγέθους από τη δεξαμεθαζόνη (συνθετικό GC). Ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του LBD του GR συνδεδεμένου με δεακυλοκορτιβαζόλη (deacylcortivazol, DAC), ένα εξαιρετικά δραστικό φαινυλ-πυραζολο-γλυκοκορτικοειδές με μέγεθος μεγαλύτερο από αυτό της δεξαμεθαζόνης, έδειξε διπλασιασμό της περιοχής σύνδεσης του προσδέτη (Suino-Powell et al, 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι μια σειρά μη στεροειδών αγωνιστών του GR που φέρουν μια λειτουργική ομάδα αμινοπυραζόλης με εξαιρετική εκλεκτικότητα για τον GR έναντι άλλων υποδοχέων στεροειδών ορμονών, βρέθηκαν επίσης να μπορούν να προσδεθούν πολύ καλά στο διευρυμένο LBD (Biggadike et al, 2009). Η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής του LBD του GR συνδεδεμένου με διάφορα μη στεροειδή μόρια οδήγησε στο σχεδιασμό νέων λιγότερο ή περισσότερο επιλεκτικών αγωνιστών του GR (Betageri et al, 2011). Παρά το γεγονός ότι καμία από αυτές τις ενώσεις δεν έχει φτάσει ακόμα στην κλινική, οι μελέτες αυτές συνέβαλαν ουσιαστικά στην τρέχουσα γνώση σχετικά με τη δράση των επιλεκτικών αγωνιστών του GR, αλλά επίσης ανέδειξαν ορισμένους περιορισμούς. Η αποτίμηση της βιολογικής τους δράσης περιορίστηκε σε ένα μικρό αριθμό γονιδίων-στόχων και in vivo δοκιμασιών με αποτέλεσμα να μην είναι σαφές εάν πραγματικά στερούνται δυνατότητας ενεργοποίησης της μεταγραφής μέσω GRE και, συνακόλουθα, δυνατότητας πρόκλησης παρενεργειών. Αν και η ανάπτυξη ενός πλήρως επιλεκτικού αγωνιστή παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, η πολυπλοκότητα της σηματοδότησης από τα γλυκοκορτικοειδή και τον υποδοχέα τους σε επίπεδο γονιδίων, κυττάρων και ιστών αμφισβητεί τη δυνατότητα πλήρους διάκρισης των

θεραπευτικών δράσεων και των παρενεργειών τους. Επιπλέον, άλλες μελέτες υποδεικνύουν ότι η επαγωγή κάποιων αντιφλεγμονωδών γονιδίων-στόχων του GR είναι πιθανό να αποτελεί μέρος του μηχανισμού της αντιφλεγμονώδους δράσης των γλυκοκορτικοειδών (Clark and Belvisi, 2012 - Hübner et al, 2015). Οι μοριακοί μηχανισμοί που διέπουν τη δράση των επιλεκτικών αγωνιστών του GR παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι και η μελέτη τους απαιτεί περαιτέρω έρευνα.

AZD9567, ένας επιλεκτικός αγωνιστής του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

Η ταυτοποίηση γλυκοκορτικοειδών με στοχευμένες επιλεκτικές δράσεις είναι απαραίτητη για τη θεραπεία πολλών φλεγμονωδών ασθενειών. Η ένωση AZD9567 προκρίθηκε ως επιλεκτικός αγωνιστής του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών μέσα από μία σειρά δομικά διαφορετικών μερικών αγωνιστών που σχεδιάστηκαν στην προσπάθεια να βρεθούν ενώσεις που να διατηρούν την αντιφλεγμονώδη δράση των κλασικών γλυκοκορτικοειδών όπως η πρεδνιζολόνη αλλά να έχουν μειωμένες παρενέργειες. Η ένωση AZD9567 συνδέεται στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα, έχει την ίδια in vitro αντιφλεγμονώδη δράση με την πρεδνιζολόνη αλλά χαμηλότερο προφίλ παρενεργειών όσον αφορά τη γλυκονεογένεση. Χορήγηση της ένωσης από το στόμα έδειξε in vivo αποτελεσματικότητα ανάλογη με αυτή της πρεδνιζολόνης σε μοντέλο αρουραίου με φλεγμονή των αρθρώσεων (Ripa et al, 2018).

Σύγκριση δύο ανεξάρτητων φαρμακοκινητικών μοντέλων, που αναπτυχθήκαν για την εκτίμηση της σχέσης ισοδυναμίας μεταξύ της ένωσης AZD9567 και της πρεδνιζολόνης, έδειξε ότι 20 mg πρεδνιζολόνης ισοδυναμούν με 40 mg AZD9567 όσον αφορά τη δράση τους στην καταστολή του TNF-α (κοινά αποδεκτός βιοδείκτης για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της αντιφλεγμονώδους θεραπείας). Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν και για την καταστολή άλλων προφλεγμονωδών κυτοκινών (Almqvist et al, 2020). Επί του παρόντος η ένωση AZD9567 αξιολογείται με κλινικές δοκιμές.

2.0 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών οι οποίοι θα διαμεσολαβούν κυρίως την καταστολή της προφλεγμονώδη - προκαρκινικής δράσης του NF-κΒ και λιγότερο ή καθόλου την επαγωγή γονιδίων-στόχων του GR που συνδέονται με τις παρενέργειες των γλυκοκορτικοειδών. Οι επιλεκτικοί αγωνιστές αναμένεται να έχουν βελτιωμένο θεραπευτικό προφίλ κάτι που είναι ιδιαίτερα σημαντικό στις μακροχρόνιες θεραπείες με γλυκοκορτικοειδή. Συγκεκριμένα, οι στόχοι περιλαμβάνουν:

- ταυτοποίηση πρόδρομων μορίων που θα διαμεσολαβούν την επιθυμητή επιλεκτική δράση.
- βελτιστοποίηση των πρόδρομων μορίων με στόχο την ανάδειξη ένωσης-οδηγού
- αποτίμηση της αντικαρκινικής δράσης των επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών
- μελέτη των μηχανισμών της δράσης των επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.0 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Υλικά

1.1.1. Αντιδραστήρια και άλλα υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάστηκαν από τις παρακάτω εταιρείες:

- Τα κοινά χημικά αντιδραστήρια από: Sigma-Aldrich (Germany), Serva (Germany) και BDH Chemicals Ltd (Analar Grade).
- Το προϊόν απομόνωσης RNA TRIZOL από την Invitrogen (USA).
- Αναστολέας ριβονουκλεασών από ανθρώπινο πλακούντα (Rnasin) από την Promega Corporation (USA).
- Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (μέγεθος πόρων 0,45 μm) από τη Schleicher & Schuell (USA).
- Τα φιλμ ακτινών X για αυτοραδιογραφία (τύπου Fuji- RX-AIF) από τη Fujifilm Europe GmbH (Germany).
- Τα υλικά της καλλιέργειας των κυττάρων (alpha MEM, MEM, MEM κατά Dulbecco, L-γλουταμίνη, πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, πυροσταφυλικό νάτριο, τρυψίνη, όξινο ανθρακικό νάτριο) από την Sigma-Aldrich (Germany).
- Ο ορός εμβρύου βοός (FBS) και το ρυθμιστικό διάλυμα PBS από την Gibco (Invitrogen, USA).
- Ο ορός εμβρύου βοός (FBS) με πολύ χαμηλά επίπεδα ενδοτοξινών από την Biosera (Invitrogen, USA).
- Τα πλαστικά είδη της κυτταροκαλλιέργειας (φιάλες 75 cm² και 25 cm², τρυβλία διαμέτρου 100 mm, 60 mm πλάκες μικροκαλλιέργειας 12, 24 και 96 θέσεων) από την Greiner (Denmark).
- Το κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) από την Sigma-Aldrich (Germany).
- Τα διαλύματα TRIZOL και φαινόλης – χλωροφόρμιου - ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) από την Invitrogen (USA).
- Οι εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης από Invitrogen (USA).
- Τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) από την Invitrogen (USA).
- Η DNA πολυμεράση Taq από την Promega.
- Το IQ SYBR Green Supermix (2x) από την Biorad (United Kingdom).
- Το ένζυμο αντίστροφης μεταγραφάσης MMLV-RT και οι εκκινητές όλιγο-dT από την Promega Corporation (USA).
- Το κιτ λουσιφεράσης από την Promega (USA).
- Ο πρωτεΐνης αναφοράς γνωστού μοριακού βάρους (Precision Plus Protein™

Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards) από την BIO-RAD (USA)

- Το ακρυλαμίδιο και το bis-ακρυλαμίδιο
- Η υδροκορτιζόνη (hydrocortisone, HC), η δεξαμεθαζόνη (dexamethasone, DEX), το RU486 και ο TNF από τη Sigma-Aldrich
- Οι ενώσεις που επιλέχθηκαν από την εικονική σάρωση από το φαρμακοφόρο μοντέλο από τη βιβλιοθήκη της Ambinter
- Η ένωση AZD9567 από την MedChemExpress
- Το LPS από την SIGMA
- Το κιτ πολωσιμετρίας φθορισμού PolarScreen Glucocorticoid Receptor Competitor Assay (Invitrogen)

1.1.2 Κυτταρικές σειρές

- HeLa: ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (ATCC)
- HeLa B2: είναι κύτταρα HeLa τα οποία διαμολύνθηκαν μόνιμα με πλασμίδιο αναφοράς το οποίο περιέχει το γονίδιο της λουσιφεράσης κάτω από τον έλεγχο του GR (Rao et al., 2011)
- HeLa B2 GR_KD: είναι κύτταρα HeLa B2 στα οποία έχει απαλειφθεί η έκφραση του GR (Rao et al., 2011)
- Hep G2: ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (ATCC)
- MCF-7: Ανθρώπινα κύτταρα αδenoκαρκινώματος μαστού (ATCC, American Tissue Culture Collection)
- MCF-7/LCC1 και MCF-7/LCC9 είναι κύτταρα MCF-7 που έχουν μερική και πλήρη ανθεκτικότητα στο αντιοιστρογόνο 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνη αντίστοιχα, λόγω υπερενεργοποίησης του NF-κB (Nehra et al., 2010)
- RAW 264.7: μακροφάγα κύτταρα ποντικού (ATCC)

1.1.3 Αποστείρωση

Η καλλιέργεια των κυττάρων και τα πειράματα που περιλαμβάνουν DNA και RNA απαιτούν αποστειρωμένα υλικά. Τα γυάλινα και τα πλαστικά σκεύη πολλαπλών χρήσεων αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 120 °C για 30 min (υγρή αποστείρωση). Τα διαλύματα αποστειρώθηκαν με τον ίδιο τρόπο αλλά για 15 min. Στην περίπτωση θερμοευαίσθητων διαλυμάτων η αποστείρωση έγινε με φίλτρα Sartorius (μέγεθος πόρων 0,22 μm) όταν αυτά επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν για καλλιέργεια κυττάρων, ενώ για χρήση σε πειράματα που περιλάμβαναν DNA και RNA η παρασκευή τους έγινε σε αποστειρωμένα σκεύη, με

αποστειρωμένο διπλά απεσταγμένο H₂O και χημικά τύπου καθαρότητας Molecular Biology (Sigma Chemical Company) τα οποία είναι ελεύθερα δεοξυριβονουκλεασών και ριβονουκλεασών.

1.1.4 Αντισώματα

1.1.4.1 Αντισώματα έναντι συγκεκριμένων πρωτεϊνών

- 2F8, μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ανθρώπινου GR (Siriani et al, 2003)
- Ab10-26, πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι των αμινοξέων 10-26 του ανθρώπινου GR (Siriani et al, 2003)
- ακτίνη (Chemicon, #MAB1501): Μονοκλωνικό αντίσωμα IgG_{1κ} από ποντικό. Χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:10.000.

1.1.4.2 Δευτερογενή αντισώματα

- Ανοσοσφαιρίνες κουνελιού συνδεδεμένες με υπεροξειδάση έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού: χρησιμοποιήθηκε σαν δεύτερο αντίσωμα στην ανοσοσύτωση κατά Western, σε αραιώση 1:1000, όταν το πρώτο αντίσωμα είναι μονοκλωνικό σε ποντίκι (Dako).
- Ανοσοσφαιρίνες κασίτσας, έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού, συνδεδεμένες με το χρωμοφόρο Alexa Fluor® 555 (Cell Signaling, #4413)

1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

1.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Όλες οι διαδικασίες καλλιέργειας των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες, ενώ στείρα ήταν επίσης και όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν. Η καλλιέργεια των κυττάρων HeLa, HeLa B2, HeLa GR_KD και HepG2 έγινε με υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) με κόκκινο της φαινόλης στο οποίο προστέθηκε γλουταμίνη (20 mM), στρεπτομυκίνη (50 mg/l), πενικιλίνη (50.000 IU/l), πυροσταφυλικό νάτριο (1 mM), NaHCO₃ (2 g/l) και 10% κ.ό. ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS).

Τα κύτταρα MCF-7, MCF-7/LCC1 και MCF-7/LCC9 καλλιεργήθηκαν σε υλικό MEM χωρίς κόκκινο της φαινόλης παρουσία 10% FBS, 1 mg/l ινσουλίνης και 0,1 nM οιστραδιόλης (E2), (πλήρες υλικό καλλιέργειας). Οι πειραματικές διαδικασίες έγιναν σε υλικό RPMI παρουσία 10% FBS, 1 mg/l ινσουλίνης και 0,1 nM οιστραδιόλης (E2).

Τα κύτταρα RAW 264.7 καλλιεργήθηκαν σε υλικό αMEM χωρίς κόκκινο της φαινόλης παρουσία 10% FBS με χαμηλά επίπεδα ενδοτοξινών, στο οποίο προστέθηκε στρεπτομυκίνη (50 mg/l) και πενικιλίνη (50.000 IU/l).

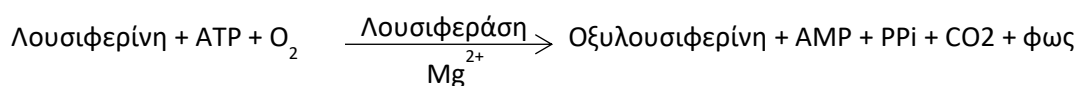
Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας εμβαδού 75 cm², με 10 ml πλήρους υλικού, στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Όταν τα κύτταρα πλησίαζαν στο να καλύψουν όλη την επιφάνεια της φιάλης, αραιώνονταν με θρυψινοποίηση. Αρχικά, η φιάλη εκπλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS (14,7 mM KH₂PO₄/80,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,5, 2,68 mM KCl, 136,7 mM NaCl). Κατόπιν, προστέθηκε 1 ml διαλύματος θρυψίνης (0,25 % κ.ο. σε PBS) ή θρυψίνης-EDTA (0,05 % κ.ο. τρυψίνη και 0,002% κ.ο. EDTA σε 10x PBS), (ανάλογα με την κυτταρική σειρά) και ακολούθησε επώαση μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα (ανάλογα με την κυτταρική σειρά, απαιτείται και διαφορετικός χρόνος επώασης, από 2-10 min). Τα κύτταρα παρελήφθησαν με πλήρες υλικό καλλιέργειας, οπότε η τρυψίνη απενεργοποιήθηκε από τον ορό του υλικού, και μοιράστηκαν σε νέες φιάλες για να συνεχιστεί η καλλιέργεια. Εξάιρεση αποτελούν τα κύτταρα RAW 264.7 τα οποία αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια της φιάλης με ξύσιμο. Με ανάλογο τρόπο παρελήφθησαν τα κύτταρα προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για κάποιο πείραμα με μόνη διαφορά τη χρήση ορού ελεύθερου στεροειδών στο υλικό καλλιέργειας. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων, τα κύτταρα μεγάλωναν για 48 ώρες παρουσία ορού ελεύθερου στεροειδών προκειμένου να μεταβολιστούν τα ελεύθερα στεροειδή και στη συνέχεια ακολουθούσαν οι κατεργασίες του κάθε πειράματος. Στο τέλος κάποιων πειραμάτων τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά την θρυψινοποίηση τους, φυγοκεντρήθηκαν στα 400 g για 10 min, εκλύθηκαν μια φορά με PBS και το ίζημά τους φυλάχθηκε σε υγρό άζωτο.

Ο ελεύθερος στεροειδών ορός προέκυψε μετά από κατεργασία με ενεργό άνθρακα (Dextran Coated Charcoal-FBS, DCC-FBS) προκειμένου να απομακρυνθούν τα στεροειδή που περιέχει. Συγκεκριμένα, ο ορός επώαστηκε με το ίζημα διαλύματος ενεργού άνθρακα (2,5% κ.β. ενεργός άνθρακας και 0,25% κ.β. δεξτράνη σε 10 mM Tris-HCl pH 7,4) ίσου με το 1/5 του όγκου του ορού για 30 min στους 56 °C υπό ανάδευση και το εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 10000 g για 10 min. Το υπερκείμενο υποβλήθηκε ξανά η ίδια διαδικασία και μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρωσης αποστειρώθηκε με φίλτρο αποστείρωσης Sartorius, μεγέθους πόρων 0,22 μm. Ο ελεύθερος στεροειδών ορός προστέθηκε στα κύτταρα 48-72 h πριν την έναρξη των πειραμάτων, ώστε να προλάβουν να μεταβολίσουν τυχόν παρόντα στεροειδή.

1.2.2. Προσδιορισμός της ενεργότητας της λουσιφεράσης

Για τα πειράματα προσδιορισμού της επαγωγής της λουσιφεράσης, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με τις υπό εξέταση ενώσεις σε μικροπλάκες 96 θέσεων (8000 κύτταρα/θέση) για 20 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης τα κύτταρα εκλύθηκαν 1 φορά με PBS και

επώαστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των κυττάρων για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια μετρήθηκε η ενεργότητα της λουσιφεράσης με χρήση του κιτ της Promega (Steady-glo luciferase assay system). Συγκεκριμένα, τα λυμένα κύτταρα επώαστηκαν με λουσιφερίνη (υπόστρωμα της λουσιφεράσης) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε μέτρηση σε πολυμετρητή Safire II (TECAN) των φωτονίων που προκύπτουν από την παρακάτω αντίδραση:



Σημειώνεται ότι σε όλα τα πειράματα προσδιορισμού της ενεργότητας της λουσιφεράσης προσδιορίστηκε και η επίδραση των υπό έλεγχο των ενώσεων στον πολλαπλασιασμό και την βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα κύτταρα επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες και υπολογίστηκε ο σχετικός αριθμός των κυττάρων με τη χρήση της δοκιμασίας crystal violet (παρακάτω στο 1.2.3). Ο σχετικός αριθμός των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της επαγωγής της λουσιφεράσης.

1.2.3. Προσδιορισμός σχετικού αριθμού κυττάρων με χρήση crystal violet

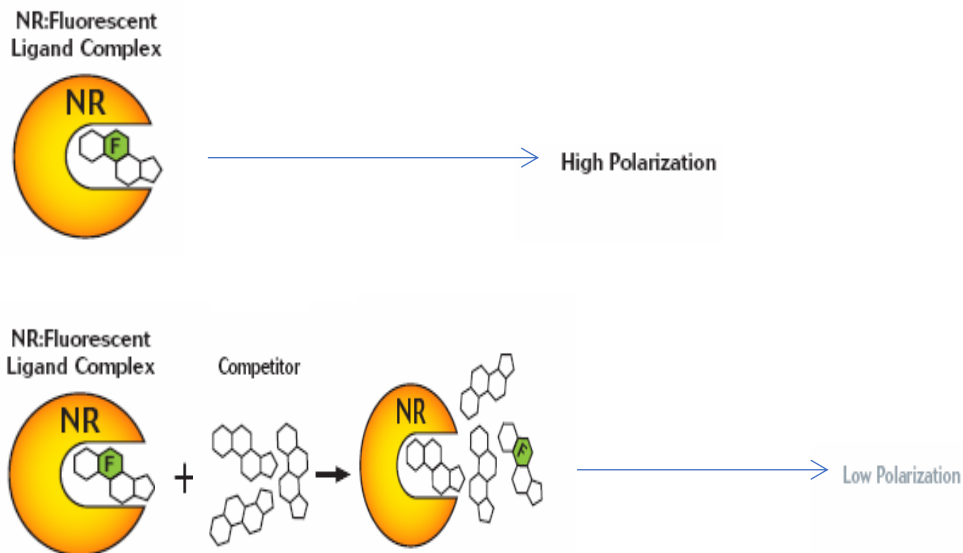
Ο προσδιορισμός του σχετικού αριθμού των κυττάρων έγινε με χρώση με την χρωστική Crystal violet. Η χρωστική δεν εισέρχεται μέσα στο κύτταρο, αλλά παραμένει στο εξωτερικό χρωματίζοντας την κυτταρική μεμβράνη. Η λύση των κυττάρων δίνει ένα έγχρωμο προϊόν και η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του αριθμού των κυττάρων.

Για την μελέτη της επίδρασης των υποψήφιων επιλεκτικών αγωνιστών του GR στον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων οι ενώσεις αυτές διαλύονται αρχικά σε έκδοχο (DMSO) σε συγκέντρωση 10^{-2}M και στη συνέχεια αραιώνονται διαδοχικά με για την παρασκευή ενδιάμεσων αραιώσεων των ενώσεων σε συγκέντρωση 1000 φορές μεγαλύτερη αυτής που επιδιώκεται να ελεγχθεί. Η τελική αραιώση προκύπτει με την προσθήκη 1μl της ενδιάμεσης αραιώσης σε έκδοχο σε 1 ml υλικού καλλιέργειας, διασφαλίζοντας ότι η συγκέντρωση του εκδόχου στην οποία εκτίθενται τα κύτταρα δεν ξεπερνά το 0,1%. Τα κύτταρα που δεν έχουν υποστεί επώαση με τις υπό εξέταση ενώσεις αλλά μόνο με το έκδοχο αποτελούν το δείγμα αναφοράς. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις υπό έλεγχο ενώσεις μόνες τους ή παρουσία υδροκορτιζόνης όπως και στη διαδικασία προσδιορισμού της ενεργότητας της λουσιφεράσης (1.2.2). Στα πειράματα προσδιορισμού του αριθμού κυττάρων MCF-7, MCF-7/LCC1 και MCF-7/LCC9 χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο διάρκειας 7 ημέρων στο οποίο 2000

κύτταρα (ανά θέση μικροπλάκας) καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν για 6 ημέρες με προσθήκη και ανανέωση των υπό έλεγχο ενώσεων την 2^η και την 5^η μέρα. Μετά το πέρας της καλλιέργειας των κυττάρων επωάζονται με κρύα μεθανόλη (100μl ανά θέση) για 5min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επιτευχθεί η μονιμοποίηση τους. Στη συνέχεια, ακολουθεί επώαση με 0.2% crystal violet (50μl ανά θέση) για 10min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Μετά το τέλος της επώασης γίνονται 3 πλύσεις με νερό (100μl ανά θέση), προσθήκη 33% οξικού οξέος (100μl ανά θέση) για 30min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για διαλυτοποίηση της χρωστικής και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 565nm με τη χρήση του μετρητή πλακών μικροκαλλιέργειας (plate reader) Safire II (TECAN). Τέλος προσδιορίστηκε η διαφορά της οπτικής πυκνότητας μεταξύ των μηκών κύματος 595nm και 690nm για να μετρηθεί ο πραγματικός αριθμός των κυττάρων και εκφράστηκε σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων που είχαν επωαστεί μόνο με το έκδοχο.

1.2.4 Μέτρηση της σχετικής χημικής συγγένειας πρόσδεσης ενώσεων σε καθαρό ανασυνδυασμένο ανθρώπινο υποδοχέα GR

Για να μελετηθεί η ικανότητα των ενώσεων να προσδέονται στον GR χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα πολωσιμετρίας φθορισμού με χρήση του kit PolarScreen Glucocorticoid Receptor Competitor Assay (Invitrogen). Η μέτρηση της σχετικής χημικής συγγένειας πρόσδεσης (ΣΧΣΠ) των υπό εξέταση ενώσεων στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών βασίζεται στην ικανότητα των δεσμευμένων στον υποδοχέα ενώσεων να εκτοπίζουν ένα φθορίζον γλυκοκορτικοειδές και επομένως να μειώνεται η πόλωση. Η παρεμπόδιση της δράσης της υδροκορτιζόνης από μια ένωση δηλώνει την πιθανή πρόσδεση της ένωσης αυτής στον GR. Οι ενώσεις ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να συνδέονται στον GR. Οι ενώσεις δοκιμάστηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (10 μM, 3 μM και 1 μM) ως προς την ικανότητά τους να εκτοπίζουν φθορίζον γλυκοκορτικοειδές συνδεδεμένο με καθαρό ανασυνδυασμένο GR. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η δεξαμεθαζόνη, συνθετικό γλυκοκορτικοειδές. Οι ενώσεις επωάστηκαν με καθαρό GR παρουσία της φθορίζουσας ορμόνης για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα μετρήθηκε η πόλωση φθορισμού στον πολυμετρητή Safire II (TECAN).



1.2.5 Προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων με χρήση του trypan blue

Για τη βιωσιμότητα των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χρώσης με trypan blue. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία παρόμοια με αυτή του προσδιορισμού της ενεργότητας της λουσιφεράσης που περιγράφεται στην ενότητα 2.2.2 και χρωματίστηκαν με διάλυμα 0.08% trypan blue σε PBS για 2 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS 1X και λήφθηκαν εικόνες των κυττάρων χρησιμοποιώντας ανεστραμμένο μικροσκόπιο Nikon Eclipse TE2000.

1.2.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών παρουσία SDS (SDS/PAGE)

Τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν στην ηλεκτροφόρηση αναμιγνύονται με 0,25 όγκους διαλύματος διαλυτοποίησης δειγμάτων και β-μερκαπτοαιθανόλη σε συγκέντρωση 290mM και επάζονται για 10 min στους 99°C. Ακολουθεί προσθήκη 0,1 όγκων γλυκερόλης και 0,005% κ.β. χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε κάθετο πήκτωμα διαστάσεων 8×7,3×0,1 cm, το οποίο αποτελείται από πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) κάτω από ένα πήκτωμα συμπύκνωσης (stacking gel). Η σύσταση των πηκτωμάτων είναι η ακόλουθη:

Πήκτωμα διαχωρισμού: 375mM Tris pH 8,8, 0,15% κ.β. SDS, 0,05% κ.ο. TEMED, 0,08% κ.β. υπερθεικό αμμώνιο και ακρυλαμίδιο και δις-ακρυλαμίδιο στη αναφερόμενη κατά περίπτωση συγκέντρωση, η οποία συνήθως κυμαίνεται από 8 μέχρι 10% κ.β. ακρυλαμίδιο

Πήκτωμα συμπύκνωσης: 125mM Tris pH 6,8, 0,1% κ.β. SDS, 0,3% κ.ο. TEMED, 0,16% κ.β. υπερθεικό αμμώνιο, 4% κ.β. ακρυλαμίδιο και 0,106% κ.β. δις-ακρυλαμίδιο.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε διάλυμα 25mM Tris, 192mM γλυκίνη και 0,1% κ.β. SDS (Running buffer) και με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 80V για τον απαιτούμενο κάθε φορά χρόνο. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Μαζί με τα δείγματα ηλεκτροφορείται και ένα μίγμα καθαρών πρωτεϊνών αναφοράς οι οποίες είναι συνδεδεμένες με μία μπλε χρωστική ώστε να είναι ορατές στο πήκτωμα και οι οποίες διαχωρίζονται σε οκτώ ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι: MBP-β-γαλακτοσιδάση (MB: 175kDa), MBP-παραμυοσίνη (MB: 80kDa), MBP-CBD (MB: 58kDa), CBD-Mxe Intein-2CBD (MB: 46kDa), CBD-Mxe Intein (MB: 30kDa), CBD-BmFKBP13 (MB: 25kDa), λυσοζύμη (MB: 17kDa) και απροτινίνη (MB: 7kDa) σε συγκέντρωση 0,1mg/ml έως 0,2mg/ml. Οι πρωτεΐνες αυτές χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών των υπό εξέταση δειγμάτων.

1.2.7 Ανοσοχημική ανάλυση πρωτεϊνών κατά Western

1.2.7.1. Μεταφορά πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη

Η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, γίνεται ηλεκτροφορητικά, βάσει της μεθόδου που περιγράφεται από τους Towbin και συνεργάτες (1979). Συγκεκριμένα, μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα του πολυακρυλαμιδίου επωάζεται για 15min με παγωμένο διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer: 25mM Tris, 191mM γλυκίνη, 0,01% κ.β. SDS, 20% κ.ο. μεθανόλη) και στη συνέχεια τοποθετείται σε ειδική συσκευή (Bio-rad) σε επαφή με μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται παρουσία διαλύματος μεταφοράς με εφαρμογή ρεύματος σταθερής εντάσεως 300mA, για 90min στους 4°C. Οι πρωτεΐνες που έχουν μεταφερθεί στη νιτροκυτταρίνη, βάζονται προσωρινά με εμβάπτιση σε χρωστική Ponceau S (0,2% κ.β. χρωστική, 3% κ.ο. TCA) για τον έλεγχο της ποιότητας της ηλεκτροφόρησης και αμέσως μετά αποχρωματίζεται σε διπλά απεσταγμένο νερό. Το τμήμα της νιτροκυτταρίνης που περιέχει τα δείγματα, χρησιμοποιείται για ανοσοχημική ανάλυση των πρωτεϊνών, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

1.2.7.2 Ανοσοχημική ανάλυση των πρωτεϊνών

Η προς ανοσοχημική ανάλυση μεμβράνη νιτροκυτταρίνης υποβάλλεται στην παρακάτω διαδικασία:

Πλύσιμο με διάλυμα TBS (10 mM Tris-HCl, pH: 7,6, 154 mM NaCl), για 5min, σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση.

Επώαση σε TBS, 5% άπαχο γάλα και 0.1% Tween-20 για 1h σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση. Η επώαση αυτή γίνεται προκειμένου να καλυφθούν οι ελεύθερες θέσεις της νιτροκυτταρίνης και να εμποδιστεί έτσι η μη ειδική σύνδεση των αντισωμάτων.

Επώαση με το πρώτο αντίσωμα σε συγκεκριμένη αραιώση σε TBS, 5% άπαχο γάλα και 0,1% Tween-20. Η επώαση αυτή γίνεται στους 4°C, για 16h υπό συνεχή ανάδευση.

Πλυσίματα σε θερμοκρασία δωματίου, διάρκειας 10min το καθένα, υπό συνεχή ανάδευση:

- μία φορά με διάλυμα TBS
- δύο φορές με διάλυμα TBS που περιέχει 0,05% κ.ο Tween-20 και 0,05% NP-40
- μία φορά με διάλυμα TBS

Επώαση με δεύτερο αντίσωμα έναντι του πρώτου αντισώματος συνδεδεμένο με υπεροξειδάση, σε συγκεκριμένη αραιώση σε TBS, 5% άπαχο γάλα, 0,1% κ.ό. Tween-20 (όλα να αλλάξουν ανάλογα). Η επώαση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου για 2h, υπό συνεχή ανάδευση.

Πλυσίματα σε θερμοκρασία δωματίου, διάρκειας 10min το καθένα, υπό συνεχή ανάδευση:

- μία φορά με διάλυμα TBS
- δύο φορές με διάλυμα TBS που περιέχει 0,05% κ.ο Tween-20 και 0,05% NP-40
- μία φορά με διάλυμα TBS
- μια φορά με διάλυμα PBS

Η αντίδραση της υπεροξειδάσης πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας το σύστημα εμφάνισης σήματος ECL () και φιλμ ακτινών X (Fuji). Στο σύστημα HRP/υπεροξειδίου του υδρογόνου καταλύεται η οξειδωση της λουμινόλης σε αλκαλικές συνθήκες. Αμέσως μετά την οξειδωση η λουμινόλη είναι σε μια διεγερμένη κατάσταση από την οποία στη συνέχεια μεταπίπτει σε μια βασική κατάσταση μέσω εκπομπής φωτός. Η χημειοφωταύγεια είναι η παραγωγή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας φωτός από την απελευθερωμένη ενέργεια που προκύπτει από μια χημική αντίδραση. Η ενισχυμένη χημειοφωταύγεια επιτυγχάνεται όταν η οξειδωση της λουμινόλης από το HRP γίνεται στην παρουσία χημικών ενισχυτών, όπως οι φαινόλες. Το φως που παράγεται από την αντίδραση αυτή κορυφώνεται μετά από 5-20min και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά με χρόνο ζωής περίπου 60min. Η μέγιστη εκπομπή φωτός γίνεται στα 428nm και μπορεί να αποτυπωθεί μετά από σύντομη έκθεση σε φιλμ ακτινών X.

1.2.8 Ανοσοκυτταροχημική ανάλυση με έμμεσο ανοσοφθορισμό

Για την ανοσοκυτταροχημική ανάλυση τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν πάνω σε καλυπτρίδες, σε υλικό DMEM με 5% ελεύθερο-στεροειδών FBS για 48 ώρες και επώαστηκαν με τις υπό έλεγχο

ενώσεις για 2 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με παγωμένο διάλυμα μεθανόλης-ακετόνης (1:1) και επώαστηκαν με 0.25% Triton X-100 σε PBS (PBST) σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνουν διαπερατά. Ακολούθησε κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με επώαση με 3% BSA σε PBST σε θερμοκρασία δωματίου και επώαση O/N στους 4 °C με πρωτογενές αντίσωμα για τον ανθρώπινο υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών του ανθρώπου (Ab10-26, αραιώση 1:500). Ακολούθησε επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με το χρωμοφόρο Alexa Fluor® 555 για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και μία τελική επώαση με 0.5μg/ml από τη χρωστική Hoechst για 1 λεπτό ώστε να γίνει χρώση των πυρήνων. Για τις φωτογραφίες ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5.

1.2.9 Απομόνωση RNA από κύτταρα

Η απομόνωση RNA από κύτταρα έγινε με χρήση του αντιδραστηρίου TRIZOL, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Η μέθοδος αυτή είναι σύντομη και παρέχει τη δυνατότητα απομόνωσης RNA ακόμη και από μικρό αριθμό κυττάρων. Επιπλέον, η απόδοση είναι υψηλή και το RNA που απομονώνεται είναι ελεύθερο DNA και πρωτεϊνών και παραλαμβάνει το σύνολο των μορίων RNA (συμπεριλαμβανομένων και των μικρών 4-5 S RNA).

Η αρχή της μεθόδου περιγράφεται από τους Chomczynski and Sacchi (1987), πρέπει δε να σημειωθεί ότι όλα τα χρησιμοποιούμενα υλικά και διαλύματα είναι αποστειρωμένα για να αποφευχθεί η παρουσία ριβονουκλεασών. Συγκεκριμένα, το ίζημα των κυττάρων διαλύθηκε σε αντιδραστήριο TRIZOL σε θερμοκρασία δωματίου, σε αναλογία 1 ml αντιδραστηρίου για 10^7 κύτταρα. Μετά την ομογενοποίηση, προστέθηκαν 200 μl χλωροφορμίου και ακολούθησε έντονη ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 13000 g, στους 4 °C, για 15 min, συλλέχθηκε η υδατική φάση και καταβυθίστηκε με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπανόλης για 30 min στους 4 °C. Μετά την επώαση στους 4 °C ακολούθησε φυγοκέντρηση, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε διπλά απεσταγμένο H₂O και καταβυθίστηκε με προσθήκη 0,3 M CH₃COONa και 2,5 όγκων απόλυτης αιθανόλης, για 16-20 h στους -20 °C. Ακολούθησε φυγοκέντρηση, απόχυση του υπερκειμένου, προσθήκη αιθανόλης 75% κ.ο. και δεύτερη φυγοκέντρηση. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε διπλά απεσταγμένο H₂O. Όλες οι φυγοκεντρήσεις που αναφέρονται έγιναν σε 13000 g, στους 4 °C για 15 min. Το RNA φυλάχθηκε στους -70 °C παρουσία 0,3 M CH₃COONa και 75% κ.ο. αιθανόλης. Για να χρησιμοποιηθεί φυγοκεντρήθηκε, το ίζημα ξηράνθηκε και διαλυτοποιήθηκε σε διπλά απεσταγμένο H₂O. Στη συνέχεια 1-5 μl από αυτό αραιώθηκαν σε 1 ml διπλά απεσταγμένο H₂O και σαρώθηκαν φωτομετρικά στην περιοχή

300-240 nm. Απουσία προσμείξεων (DNA, πρωτεΐνες) το φάσμα εμφανίστηκε μέγιστο στα 260 nm και ο λόγος της OA στα 260 και 280nm είναι $OA_{260} / OA_{280} = \sim 2$. Μία μονάδα οπτικής πυκνότητας στα 260 nm, αντιστοιχεί σε 40 µg RNA στο 1 ml του αραιωμένου δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για τη φωτομέτρηση.

Για τον παραπέρα καθαρισμό του RNA χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες του RNeasy Mini Kit της Qiagen. Αρχικά ρυθμίστηκε ο τελικός όγκος του που περιέχει το RNA σε 100µl με την προσθήκη απαιτούμενου όγκου νερού απαλλαγμένου από RNase. Ακολούθησε προσθήκη 350µl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (RLT) με καλή ανάδευση. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 250µl αιθανόλης (96-100%) και ανάδευση με πιπέτα. Ο όγκος των 700µl μεταφέρεται στην ειδική στήλη φυγοκέντρησης, κάτω από την οποία έχει τοποθετηθεί σωλήνας συλλογής 2ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και απόρριψη του περιεχόμενου του σωλήνα και επανάληψη του προηγούμενου βήματος. Έπειτα έγινε προσθήκη 350µl του διαλύματος πλύσης (RW1) στη στήλη και φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε ένα διάλυμα που περιέχει 10µl DNase I και 70µl του διαλύματος RDD, ακολούθησε ήπια ανακάτεμα και προσθήκη των 80µl στη μεμβράνη της στήλης φυγοκέντρησης, αφήνοντας για 5min σε θερμοκρασία 20-30°C. Τέλος έγινε προσθήκη 350µl του ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (RW1) και φυγοκέντρηση. Οι φυγοκεντρήσεις στα παραπάνω στάδια έγιναν για 15sec σε 8.000g. Μετά τη τρίτη φυγοκέντρηση γίνεται προσθήκη εντός της στήλης, 500µl διαλύματος έκλουσης (RPE), για τη πλύση της μεμβράνης της στήλης και εκ νέου φυγοκέντρηση, για 2min σε 8.000g, ώστε να πλυθεί η μεμβράνη της στήλης και να στεγνώσει από τα υπολείμματα της αιθανόλης. Τέλος η στήλη φυγοκέντρησης τοποθετείται σε νέο σωλήνα συλλογής και προστίθενται 30-50µl νερού χωρίς RNase, και έπειτα από φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 8.000g, γίνεται η έκλουση του RNA.

1.2.10 Αντίστροφη μεταγραφή: σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής μια αλληλουχία RNA μεταγράφεται στο συμπληρωματικό της DNA (cDNA) με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Το RNA που απομονώθηκε όπως περιεγράφηκε νωρίτερα χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση cDNA. Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 20µl. Η σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA έγινε με χρήση 2 µg RNA τα οποία αναμείχθηκαν με 1 µl από 10mM δεοξυτριφωσφορικά νουκλεοτίδια (dNTPs), 1 µl από 25 pmol εκκινητών όλιγο-dT και ddH₂O σε τελικό όγκο 9 µl. Το μείγμα θερμάνθηκε στους 65 °C για 5 min, φυγοκεντρήθηκε σύντομα στους 4 °C και επωάστηκε στον πάγο για 1-2 min . Ακολούθησε προσθήκη 4 µl από το 5X διάλυμα

αντίδρασης της πρώτης αλυσίδας (First strand reaction buffer), 2 μl από 0,1M DTT και 20 μονάδων (1μl) του αναστολέα ριβονουκλεασών RNasin. Το μείγμα αναδεύτηκε ελαφρά και έγινε επώαση στους 37 °C για 2 min. Ακολούθησε προσθήκη 200 μονάδων (1 μl) αντίστροφης μεταγραφάσης (MMLV-RT) και επώαση στους 37 °C για 50 min και στους 70 °C για 15 min. Το cDNA φυλάχθηκε στους -20 °C και χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την ενίσχυσή του με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR).

1.2.11 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR) ή ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (qPCR) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση του επιθυμητού DNA (στην συγκεκριμένη εργασία του cDNA). Για την κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 12,5 μl από το βασικό 2xμείγμα (IQ SYBR Green Supermix), κατάλληλη ποσότητα cDNA η οποία προσδιορίστηκε με δοκιμή διαφορετικών αραιώσεων του αρχικού cDNA και 25 pmol από τον κάθε εκκινητή σε τελικό όγκο 25 μl . Το βασικό 2x μείγμα περιέχει 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,4, 0,4 mM από κάθε dNTP (dATP, dCTP, dGTP και dTTP), iTaq DNA πολυμεράση, 50 U/ml, 6 mM MgCl₂, SYBR Green I, 20 nM φλουρεσκεΐνη και σταθεροποιητές. Η χρωστική SYBR green I, η οποία δένεται στη διπλή έλικα του DNA αλλά όχι στη μονή, χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της σύνθεσης του DNA. Καθώς το cDNA συντίθεται, περισσότερο SYBR green I ενσωματώνεται και ο φθορισμός αυξάνεται. Οι αντιδράσεις έγιναν σε πλάκες 96 θέσεων στο Icyler IQ real time PCR της εταιρείας BioRad. Το μηχάνημα περιέχει μια ευαίσθητη κάμερα η οποία καταγράφει το φθορισμό σε κάθε θέση της πλάκας κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Το όργανο είναι συνδεδεμένο με έναν υπολογιστή με λογισμικό κατάλληλο για να καταγραφεί η αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για το Real-time PCR είναι το εξής:

Φάση 1. (1X) Βήμα 1: 95,0 °C για 5 min

Φάση 2. (40X) Βήμα 1: 95,0 °C για 15 sec

Βήμα 2: 60,0 °C για 1 min. Καταγραφή των δεδομένων της αντίδρασης.

Φάση 3. (80X) Βήμα 1: 55,0 °C για 10 sec. Μετά τον δεύτερο κύκλο η θερμοκρασία αυξάνεται κατά 0,5 °C για τον προσδιορισμό της καμπύλης τήξης από τη σταδιακή μείωση του φθορισμού του SYBR green I λόγω της μετουσίωσης του DNA με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Είναι πολύ σημαντικό να εξετάζεται η αντίδραση όταν αυτή βρίσκεται στη γραμμική της φάση, δηλαδή στο πολύ αρχικό μέρος της καμπύλης παραγωγής του cDNA. Για να υπολογιστεί τελικά η διαφορά στην ποσότητα του αρχικού cDNA (άρα και του mRNA του δείγματος) χρησιμοποιείται η παρακάτω εξίσωση: *Λόγος αύξησης: $2^{\Delta Ct}$ του υπό εξέταση γονιδίου / $2^{\Delta Ct}$ του γονιδίου αναφοράς*. Το ΔCt είναι η διαφορά στον αριθμό των κύκλων Ct μεταξύ δύο δειγμάτων. Ως Ct (οριακός κύκλος, threshold cycle, Ct) ορίζεται ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται για την ανίχνευση σήματος φθορισμού μεγαλύτερου από το σήμα του υπόβαθρου. Ο κύκλος Ct προσδιορίζεται από την αύξηση του φθορισμού του μείγματος της αντίδρασης πάνω από ένα συγκεκριμένο επίπεδο, γνωστό ως «threshold». Εάν η διαφορά στην ποσότητα του mRNA είναι 2 φορές τότε υπάρχει διαφορά ενός κύκλου (αφού $2^1=2$). Οπότε για n κύκλους, η διαφορά στην ποσότητα του mRNA είναι 2^n . Για να ελέγξουμε ότι όντως έχει σχηματιστεί το σωστό προϊόν, υπολογίζεται το σημείο τήξης του προϊόντος μέσα από την καμπύλη τήξης (melting curve). να Όλα τα προϊόντα του PCR για το ίδιο ζευγάρι εκκινητών πρέπει να έχουν το ίδιο σημείο τήξης, αλλιώς σημαίνει ότι υπάρχουν προσμείξεις, διμερισμός των εκκινητών ή υβριδισμός σε λάθος σημείο του cDNA.

Για να βεβαιωθούμε ότι οι εκκινητές (primers) που επιλέξαμε μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ποσοτικοποίηση των δειγμάτων, τους εξετάσαμε ως εξής: Το cDNA αραιώθηκε κατά 10 φορές με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Αντιδράσεις οι οποίες διαφέρουν κατά 2 φορές στην ποσότητα του αρχικού cDNA διαφέρουν κατά 1 κύκλο οπότε τα δείγματα που έχουν αραιωθεί κατά 10 φορές περιμένουμε να διαφέρουν κατά 3,3 κύκλους. Μπορούμε να σχηματίσουμε διάγραμμα με τον αριθμό των κύκλων σε συνάρτηση με την ποσότητα του αρχικού cDNA. Από την κλίση της ευθείας και χρησιμοποιώντας της εξίσωση $10^{(-1/κλίση)}$ μπορεί να υπολογιστεί η απόδοση των εκκινητών. Οι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν μόνο εφόσον το αποτέλεσμα της εξίσωσης είναι περίπου 2 που σημαίνει απόδοση της μεθόδου περίπου 100%.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Gene name	Forward primer (5'—3')	Reverse primer (5'—3')
Human (h)		
hDUSP1	ACCATCTGCCTTGCTTACCT	GCCTCTGCTTCACAAACTCA
hFKBP5	AGAAGTTTGCAGAGCAGGATG	GCCCTCAGGTTTCTCTTCTTC
hIL6	AGTGAGGAACAAGCCAGAGC	GTTGGGTCAGGGGTGGTTAT
hGAPDH	CATTGCCCTCAACGACCAC	GGTGGTCCAGGGGTCTTACTC
hKLF15	CTGCAGCAAGATGTACACCAA	TCGTCAGAGCGCGAGAAC
hCCL2	GAATCACCAGCAGCAAGTGT	CATGGAATCCTGAACCCACT

hIL8	GATGGAAGAGAGCTCTGTCTGG	CTGGCATCTTCACTGATTCTTG
hTAT	GGGACCCTACTGTGTTTGGGA	TAGCTTCTAGGGGTGCCTCA
hPDK4	TCAGGATATGGAACAGATGCTA	CATCAGCCTCAGAGCTCATCT
hPDK4	TCAGGATATGGAACAGATGCTA	CATCAGCCTCAGAGCTCATCT
hTNF	TGTAGCCCATGTTGTAGCAAAC	GCTGGTTATCTCTCAGCTCCAC

Gene name	Forward primer (5'—3')	Reverse primer (5'—3')
Mouse (m)		
mBTG2	GGTTTCCTCTCCAGTCTCCTG	CAGTGGTGTGTTGTAATGATCGGT
mCCL3	CCTCGATGTGGCTACTTGGCAGC	CCTGAGAGTCTTGGAGGCAGCGA
mDUSP1	TTTGTGTAGGTCCGGTGGTCTGCCTT	TGGCTTTGTCTGTCACTGCCGAAAG
mDUSP4	CAGTACAAGTGCATCCCCGT	AGTCCTTTACTGCGTCGATGT
mGAPDH	CATGGCCTTCCGTGTTCTTA	CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT
mHTR2A	AACCCCATTCACCATAGCCG	GATTGGCATGGATATACTACGGA
mIL10	CTTTGCTATGGTGTCTTTCA	AAGACCCATGAGTTTCTTCAC
mIL1a	GGAAGTGCTGACAGTCTGTATGTAC	GTGGCTCCACTAGGGTTTGCTC
mIL1b	GGGCTGCTTCCAAACCTTTGACC	GTAGCTGCCACAGCTTCTCCACAGCC
mKLF4	CCTTGGTGTAGCTGAGATTG	GAACAGGGAGGGAGAGAGAAA
mKLF9	CCCACTGTGTGAGAAGAGATTCAT	TCTTGATCATGCTGGGATGGAAC
mNFKBID	ACCATTCTGCACTTGGCTGT	TGTTGCCATGGGCCTTCATA
mPER1	TGGACTCTGATATCCAGGAGCTCC	GGGGACATCAGAGGGCCAACCTCA
mSGK1	AAGACCTCACAAGCTCATTGAG	AGCTGACAGAACATTTTAAAAGA
mTNF	TCTCATTCTGCTTGTGGCA	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
mTNFAIP3	AAGCTCGTGGCTCTGAAAAC	TTCTCAGGACCAGGTCAGT
mTSC22D3	ACCACCTGATGTACGCTGTG	TCTGCTCCTTTAGGACCTCCA
mZFP36	TCTGCCATCTACGAGAGCCT	ACGGGATGGAGTCCGAGTTT

1.2.12 Ανάλυση του συνολικού μεταγραφομικού προφίλ (RNA-sequencing)

Για την ανάλυση του συνολικού μεταγραφομικού προφίλ, κύτταρα RAW264.7 καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε υλικό alpha MEM εμπλουτισμένο με 10% ορό ελεύθερο στεροειδών και επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), δεξαμεθαζόνη (Dex, 1 μ M) ή AZD9567 (1 μ M) παρουσία ή απουσία LPS (10 ng/ml) για 1 ώρα. Ακολούθησε απομόνωση RNA η αλληλούχιση του οποίου (RNA-seq) έγινε από την εταιρεία BGI-Europe (Copenhagen, Denmark) στην πλατφόρμα αλληλούχισης DNbseq-G400, με τη μέθοδο των ζευγαρωτών άκρων (paired-end) και μεγέθους ανάγνωσης 100 βάσεων. Τα πρωτογενή δεδομένα ήταν σε

μορφή αρχείων FastQ και η ανάλυση τους έγινε σε περιβάλλον προγραμματισμού της γλώσσας R (R v3.6.2). Ο ποιοτικός έλεγχος των πρωτογενών δεδομένων και η απομάκρυνση των αλληλουχιών των προσαρμογέων (adapters) έγινε με το εργαλείο fastp v0.20.0 (Chen et al, 2018). Το εργαλείο STAR v2.7.3a (Dobin et al, 2013) χρησιμοποιήθηκε για τη στοίχιση στο γονιδίωμα αναφοράς ποντικού (*Mus musculus*): GRCm38. Οι στοιχισμένες αλληλουχίες συνοψίστηκαν σε μετρήσεις (counts) και συνδέθηκαν με συγκεκριμένα γονίδια μέσω του αλγόριθμου featureCounts (R package Rsubread/ Bioconductor) (Liao, 2014). Μετά το στάδιο της ποσοτικοποίησης, τα δεδομένα φιλτραρίστηκαν ώστε να απομακρυνθούν γονίδια με τιμές μετρήσεων ανά εκατομμύριο (CPM, counts per million) μικρότερες της μονάδας, σε τουλάχιστον δύο δείγματα. Η κανονικοποίηση και η ανάλυση διαφορικής γονιδιακής έκφρασης έγινε με το υπολογιστικό εργαλείο edgeR (Robinson et al, 2010). Για την επιλογή των στατιστικά σημαντικά διαφοροποιημένων γονιδίων, χρησιμοποιήθηκαν ως κριτήρια, η μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης στη λογαριθμική κλίμακα με βάση το 2 (logFC, log2 Fold Change) να είναι μεγαλύτερη κατά απόλυτη τιμή του 0.5 και το διορθωμένο βάσει False Discovery Rate (FDR) p-value να είναι μικρότερο από 0.1. Για την ταυτοποίηση των γονιδίων με βάση το gene Symbol, χρησιμοποιήθηκαν οι R λειτουργίες mapIds και org.Mm.eg.db, ενώ μη ταυτοποιήσιμα Ensembl IDs απομακρύνθηκαν από τις τελικές λίστες. Η λειτουργική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στην πλατφόρμα BioInfoMiner (Koutsandreas et al, 2016), η οποία εφαρμόζει αλγόριθμους στατιστικής και δικτύων για τον προσδιορισμό και την κατάταξη μονοπατιών και των σχετιζόμενων με αυτά γονιδίων, που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές, θέτοντας ως κατώφλι το 5% για το υπεργεωμετρικό p-value. Τα δεδομένα του RNA-sequencing που παρουσιάζονται σε αυτή τη μελέτη έχουν κατατεθεί στο ArrayExpress με αριθμό πρόσβασης E-MTAB-12816.

1.2.13 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε χρησιμοποιώντας το πακέτο SPSS 23.0 για Windows. Οι συγκρίσεις μεταξύ δύο μέσων τιμών πραγματοποιήθηκαν με *t*-test για ανεξάρτητα δείγματα. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για τιμές του *p* που ήταν μικρότερες από 0,05.

2.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

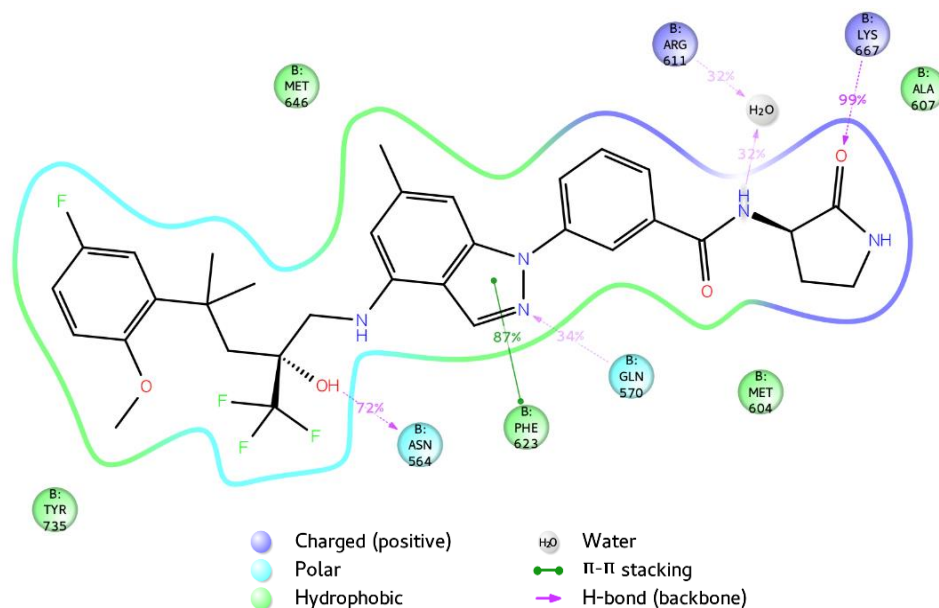
2.1 Ταυτοποίηση μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με χρήση φαρμακοφόρων μοντέλων

2.1.1 Ταυτοποίηση μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με χρήση φαρμακοφόρου μοντέλου που αναπτύχθηκε με βάση την πρόσδεση ενός αμιδίου της πυρρολιδινόνης στο διευρυμένο τμήμα πρόσδεσης ορμόνης του GR.

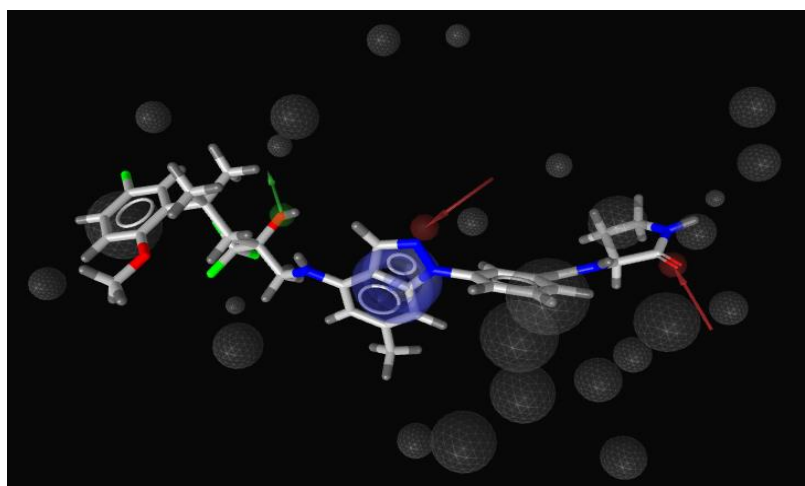
Προκειμένου να ταυτοποιηθούν επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών η ομάδα Μοριακής Ανάλυσης του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας (IXB) ξεκίνησε εικονική σάρωση μιας βιβλιοθήκης 7,8 εκ. ενώσεων (Ambinter) με χρήση φαρμακοφόρου μοντέλου ακολουθούμενη από μελέτες *in silico* μοριακής πρόσδεσης και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (molecular dynamics, MD). Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε ένα φαρμακοφόρο μοντέλο με βάση τη σύνδεση ενός ανάλογου του αμινοπυραζολίου που φέρει ένα τερματικό τμήμα αμιδίου πυρρολιδινόνης στο διευρυμένο τμήμα πρόσδεσης ορμόνης (LBD, ligand binding domain) του GR. Η ένωση αυτή έχει προφίλ επιλεκτικού αγωνιστή του GR (ένωση 12 στη δημοσίευση Biggadike et al, 2009). Η επιλεγμένη ένωση μπορεί να προσδεθεί στην διευρυμένη κοιλότητα δέσμευσης ορμόνης στο LBD του GR που εκτείνεται πέρα από την τυπική περιοχή του στεροειδούς A δακτυλίου. Λόγω της έλλειψης της αντίστοιχης κρυσταλλικής δομής, η κρυσταλλική δομή του LBD του GR με ένα άλλο ανάλογο αμινοπυραζόλης που φέρει ένα τερματικό τμήμα D-προλιναμιδίου (ένωση 11 στη δημοσίευση Biggadike et al, 2009 pdb: 3K23) χρησιμοποιήθηκε ως αρχικό πρότυπο για τη σύνδεση του αμιδίου πυρρολιδινόνης. Τα βασικά χαρακτηριστικά του φαρμακοφόρου καθορίστηκαν με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Εικόνα 1). Το φαρμακοφόρο μοντέλο βελτιστοποιήθηκε και επικυρώθηκε με τη χρήση ενώσεων που διαθέτουν το επιθυμητό προφίλ (Εικόνα 2).

Στην Εικόνα 3 φαίνονται τα στάδια της εικονικής σάρωσης της βάσης Ambinter (7,8 εκατομμύρια χημικές δομές). Συγκεκριμένα, μετά από ένα αρχικό φιλτράρισμα με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες γνωστών επιλεκτικών αγωνιστών του GR, έγινε σάρωση με το βελτιστοποιημένο φαρμακοφόρο μοντέλο). Οι καλύτερα προσαρμοσμένες στο μοντέλο ενώσεις αξιολογήθηκαν ως προς το δυνατότητα πρόσδεσής τους στο LBD του GR με μελέτες *in silico* σύνδεσης και με την εφαρμογή αλγορίθμων αυξανόμενης ακρίβειας. Βασική προϋπόθεση ήταν η παρουσία αλληλεπιδράσεων με τα κρίσιμα αμινοξέα της θήκης πρόσδεσης (N564, Q570, F623, R611) όσο και με αυτά του πρόσθετου χώρου του διευρυμένου ενεργού κέντρου (W577, K667). Από τις ενώσεις που προκρίθηκαν, επιλέχθηκαν

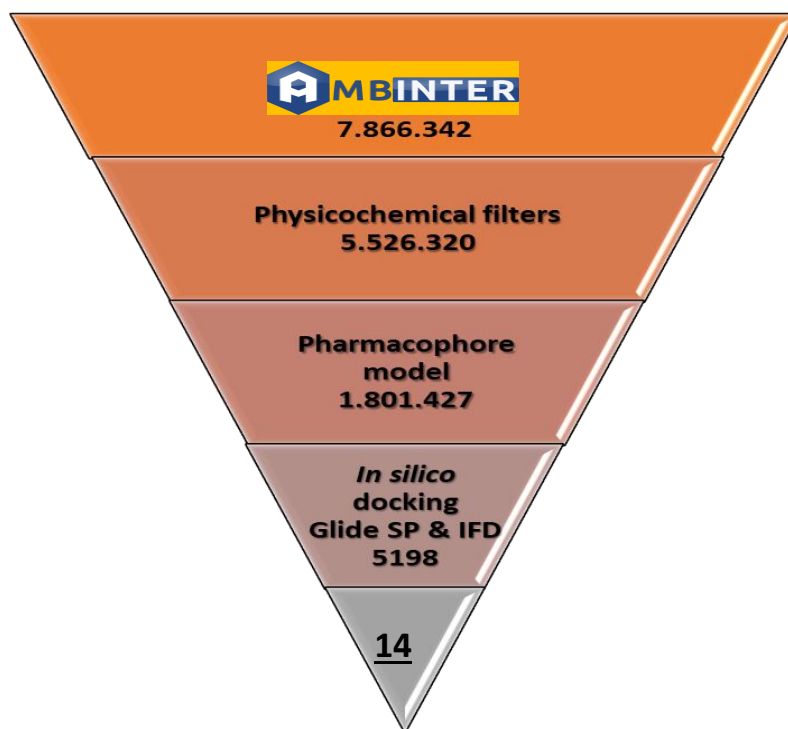
14 ενώσεις λαμβάνοντας υπόψη την ποικιλία νέων δομικών σκελετών (scaffolds) και το προβλεπόμενο προφίλ ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion – απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός και απέκκριση). Η αξιολόγηση της δράσης των ενώσεων αυτών περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.



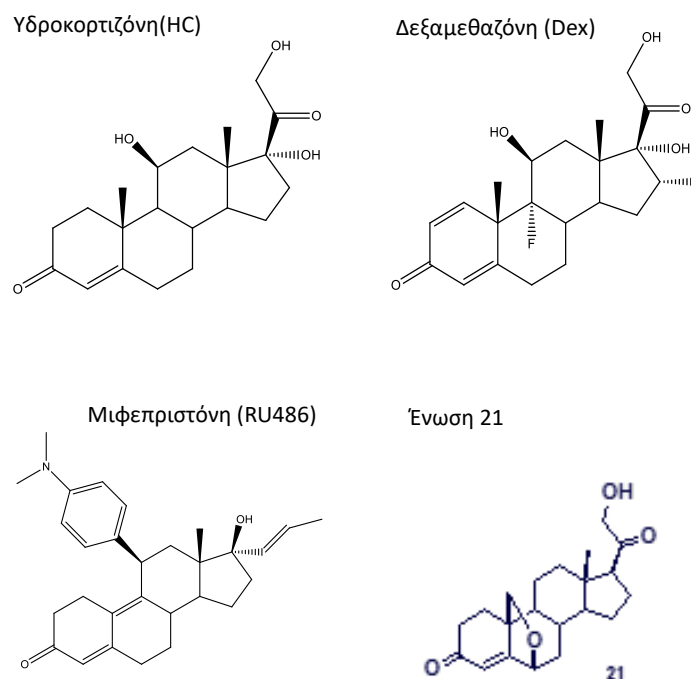
Εικόνα 1. Αλληλεπιδράσεις ανάλογου του αμιδίου της πυρρολιδινόνης με τα κρίσιμα αμινοξέα στη διευρυμένη θέση πρόσδεσης ορμόνης (LDB) του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών όπως προκύπτει από προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Οι αλληλεπιδράσεις που απεικονίζονται συμβαίνουν για περισσότερο από το 30% του χρόνου προσομοίωσης.



Εικόνα 2. Προσαρμογή του ανάλογου του αμιδίου της πυρρολιδινόνης στο βελτιστοποιημένο φαρμακοφόρο μοντέλο. Με μπλε χρώμα φαίνεται ο χαρακτηριστικός αρωματικός δακτύλιος, με κόκκινα βέλη οι δέκτες δεσμού υδρογόνου, με πράσινα βέλη οι δότες δεσμού υδρογόνου και με γκρι χρώμα περιοχές αποκλεισμού.



Εικόνα 3. Εικονική σάρωση των ενώσεων της βιβλιοθήκης Ambinter με χρήση του φαρμακοφόρου μοντέλου του υποδοχέα GR.



Σχήμα 1. Χημικές δομές των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν ως ενώσεις αναφοράς. Δομή των κλασικών αγωνιστών του GR υδροκορτιζόνη (HC, φυσική ορμόνη) και δεξαμεθαζόνη (DEX, συνθετική ορμόνη με υψηλή χημική συγγένεια πρόσδεσης στον GR), του κλασικού ανταγωνιστή του GR μιφεπριστόνη (RU486) και της ένωσης 21 (επιλεκτικός στεροειδής αγωνιστής του GR).

Για την βιολογική αποτίμηση της δράσης των υποψήφιων επιλεκτικών αγωνιστών του GR χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ενώσεις αναφοράς (Σχήμα 1):

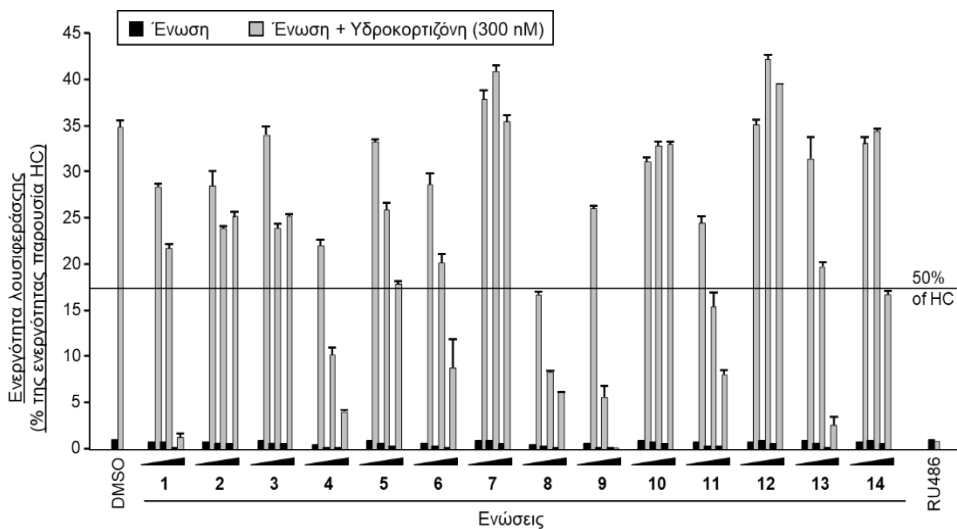
1. δεξαμεθαζόνη (DEX), συνθετικό γλυκοκορτικοειδές με υψηλή χημική συγγένεια πρόσδεσης για τον GR
2. υδροκορτιζόνη (HC), φυσικό γλυκοκορτικοειδές στον άνθρωπο
3. μιφεπριστόνη (RU486), γνωστός ανταγωνιστής του GR
4. 21OH-6,19OP (21υδροξυ-6,19οξειδο-4πρεγκενeno-3,20-διόνη, ένωση 21) που έχει προφίλ στεροειδούς επιλεκτικού αγωνιστή του GR (Pecci et al, 2017). Η ένωση 21 συντέθηκε από την ομάδα Φαρμακευτικής Χημείας του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας.

2.1.1.1 Αξιολόγηση των επιλεγμένων υποψήφιων επιλεκτικών αγωνιστών του GR ως προς την ικανότητα τους να επάγουν την μεταγραφή μέσω των στοιχείων απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η βιολογική δράση των 14 επιλεγμένων μη στεροειδών ενώσεων (1-14, Πίνακας 1), αρχικά ελέγχθηκε η ικανότητα τους να επάγουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω των στοιχείων απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid responsive elements, GRE). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HeLa τα οποία διαμολύνθηκαν μόνιμα με πλασμίδιο αναφοράς που περιέχει το γονίδιο της λουσιφεράσης κάτω από τον έλεγχο του GR (κύτταρα HeLa B2). Τα κύτταρα HeLa B2 επώαστηκαν με 0,3 μM υδροκορτιζόνης, που προκάλεσε επαγωγή της λουσιφεράσης κατά 35 φορές. Η συγκέντρωση 0,3 μM υδροκορτιζόνης επιλέχθηκε γιατί είναι η μέση τιμή των φυσιολογικών επιπέδων HC στην κυκλοφορία στον άνθρωπο και επίσης έδειξε καλή επαγωγή της έκφρασης της λουσιφεράσης σε πείραμα δοσοαπόκρισης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της. Καμία από τις 14 ενώσεις, σε συγκέντρωση έως 100 μM, δεν προκάλεσε επαγωγή του γονιδίου αναφοράς, δείχνοντας ότι καμία ένωση δεν δρα ως αγωνιστής του υποδοχέα GR στην μεταγραφή του γονιδίου της λουσιφεράσης μέσω των GREs (Εικόνα 4). Επιπλέον, ελέγχθηκε η ικανότητα των ενώσεων να παρεμποδίζουν την ενεργότητα της υδροκορτιζόνης να επάγει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων του GR. Όπως φαίνεται από την Εικόνα 4, 9 από τις ενώσεις (1, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13 και 14) μπορούν να αναστείλουν περισσότερο από 50% την επαγωγή της λουσιφεράσης από την υδροκορτιζόνη πιθανά λόγω σύνδεσής τους στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών. Τέλος, όπως ήταν αναμενόμενο, το RU486 κατέστειλε πλήρως την έκφραση της λουσιφεράσης που επάγεται παρουσία της υδροκορτιζόνης.

Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται η ανταγωνιστική δράση των υπό έλεγχο ενώσεων. Από τα αποτελέσματα φαίνονται ότι οι ενώσεις 1, 9 και 13 εμφανίζουν την υψηλότερη καταστολή

επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης μέσω της υδροκορτιζόνης. Από τον έλεγχο της βιωσιμότητας των κυττάρων παρουσία των ενώσεων φάνηκε ότι η ένωση 9 μείωσε σημαντικά τον αριθμό των κυττάρων σε συγκέντρωση 100 μM ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις δεν επηρέασαν τη κυτταρική βιωσιμότητα (Εικόνες 5-7).



Εικόνα 4. Επίδραση των επιλεγμένων ενώσεων στην επαγόμενη από την υδροκορτιζόνη μεταγραφή γονιδίων μέσω GRE. Κύτταρα HeLa B2 καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό υλικό παρουσία 5% ορού ελεύθερου στεροειδών (ορός από τον οποίο έχουν αφαιρεθεί τα στεροειδή με θέρμανση στους 56 °C και κατεργασία με ενεργό άνθρακα) και στη συνέχεια επώαστηκαν με το έκδοχο (DMSO) ή τις προς έλεγχο ενώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (10, 30 και 100 μM) απουσία ή παρουσία υδροκορτιζόνης (HC, 300 nM) για 20 ώρες. Επιπλέον τα κύτταρα επώαστηκαν με DMSO (0,1%) και με RU486 (0,1 μM). Ακολούθησε μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης με χρήση του Steady-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega), κανονικοποίηση με βάση τον σχετικό αριθμό κυττάρων και έκφρασή της σε σχέση με την ενεργότητα παρουσία της υδροκορτιζόνης (τέθηκε ως 100). Το 50% της έκφρασης της λουσιφεράσης παρουσία υδροκορτιζόνης εμφανίζεται με ευθεία γραμμή. Οι τιμές (μέσος όρος \pm SEM) προέρχονται από ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις.

Πίνακας 1. Χημικές δομές των 14 μη στεροειδών ενώσεων που προκρίθηκαν από το φαρμακοφόρο μοντέλο.

Εικονική σάρωση ενώσεων		Docking Score	Εικονική σάρωση ενώσεων		Docking Score
1		-11,66	9		-11.57
2		-13,37	10		-11.74
3		-12,84	11		-11.90
4		-13,52	12		-12.74
5		-12,37	13		-12.43
6		-13,64	14		-13.65
7		-13,53			-16,52
8		-14.40		pyrrolidinone amide analog (compound 12, Biggadike et al, 2009)	

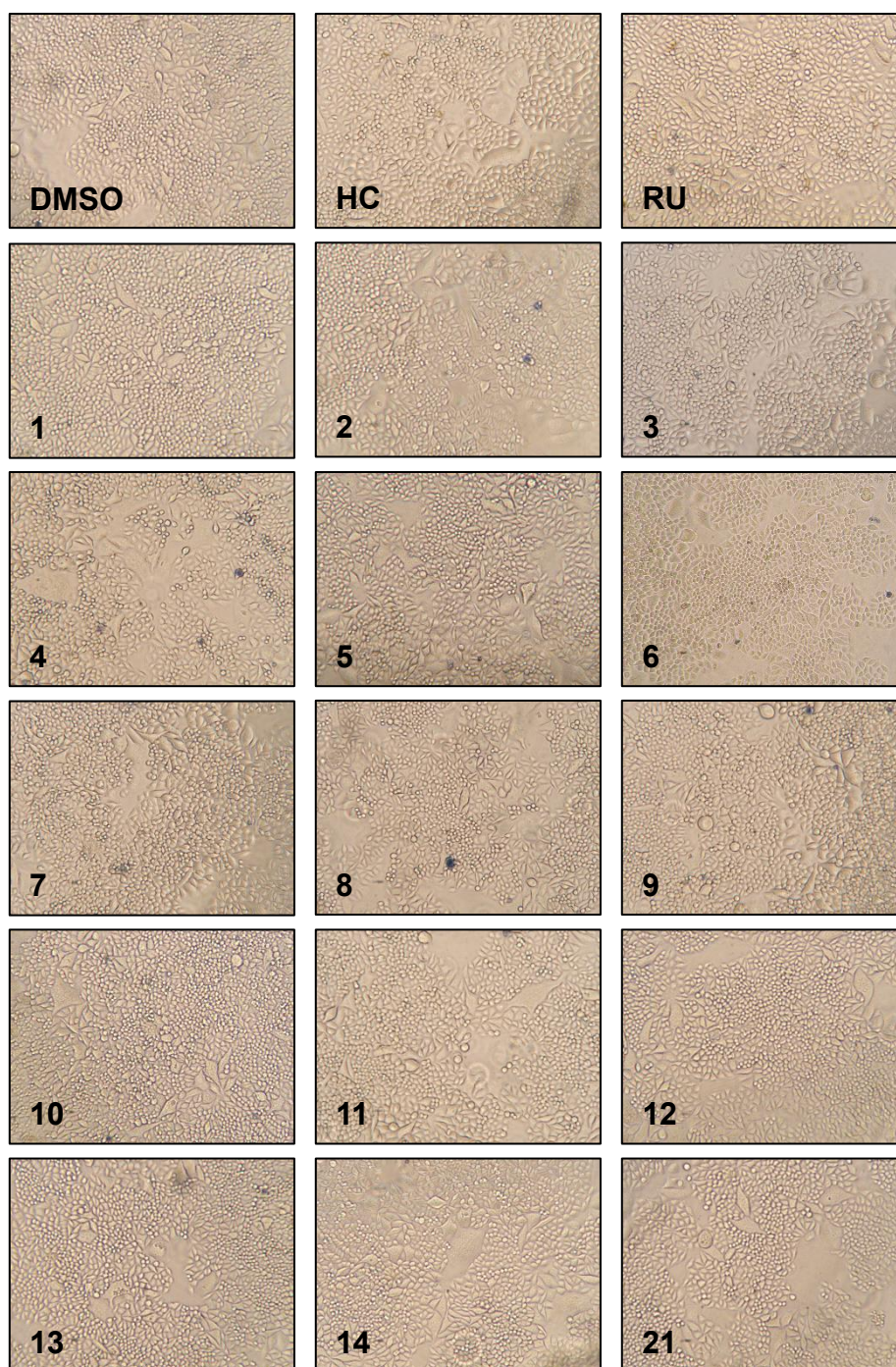
Πίνακας 2. Ανταγωνιστική δράση των υπό έλεγχο ενώσεων. Κύτταρα HeLa B2 επωάστηκαν για 20 ώρες, με DMSO (0,1%), RU486 (0,1 μΜ) ή τις υπό έλεγχο ενώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (10 μΜ, 30 μΜ και 100 μΜ), είτε μόνες τους είτε παρουσία 300 nM υδροκορτιζόνης. Η ανταγωνιστική δράση των υπό έλεγχο ενώσεων στην Αγωνιστική Δράση της υδροκορτιζόνης (ΑΔHC) υπολογίστηκε ως % ανταγωνισμός της υδροκορτιζόνης σε σχέση με τον ανταγωνισμό παρουσία του RU486 σύμφωνα με το τύπο $[ΑΔHC_{(εκδόχου)} - ΑΔHC_{(ένωσης)}] \times 100 / [ΑΔHC_{(εκδόχου)} - ΑΔHC_{(RU486)}]$. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SEM τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε 3 επαναλήψεις. Παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές τιμές αυξημένου ανταγωνισμού της ΑΔHC σε σχέση με την ΑΔHC παρουσία του εκδόχου (DMSO) ($p < 0.05$, *t*-test). Τιμές >66 αντιστοιχούν σε πλήρη ανταγωνισμό, τιμές μεταξύ 33-66 αντιστοιχούν σε μερικό ανταγωνισμό και τιμές <33 σε ασθενικό ανταγωνισμό.

Ανταγωνισμός (% σε σχέση με τον ανταγωνισμό του RU486)			
Ένωση	10 μΜ	30 μΜ	100 μΜ
1	ns	28 \pm 5	97 \pm 2
2	ns	ns	ns
3	ns	ns	ns
4	ns	62 \pm 5	81 \pm 6
5	ns	ns	39 \pm 6
6	12 \pm 3	34 \pm 5	63 \pm 7
7	ns	ns	ns
8	ns	78 \pm 3	82 \pm 4
9	ns	68 \pm 10	103 \pm 1
10	ns	ns	ns
11	ns	70 \pm 7	71 \pm 12
12	ns	ns	ns
13	20 \pm 6	64 \pm 4	98 \pm 1
14	ns	ns	65 \pm 7

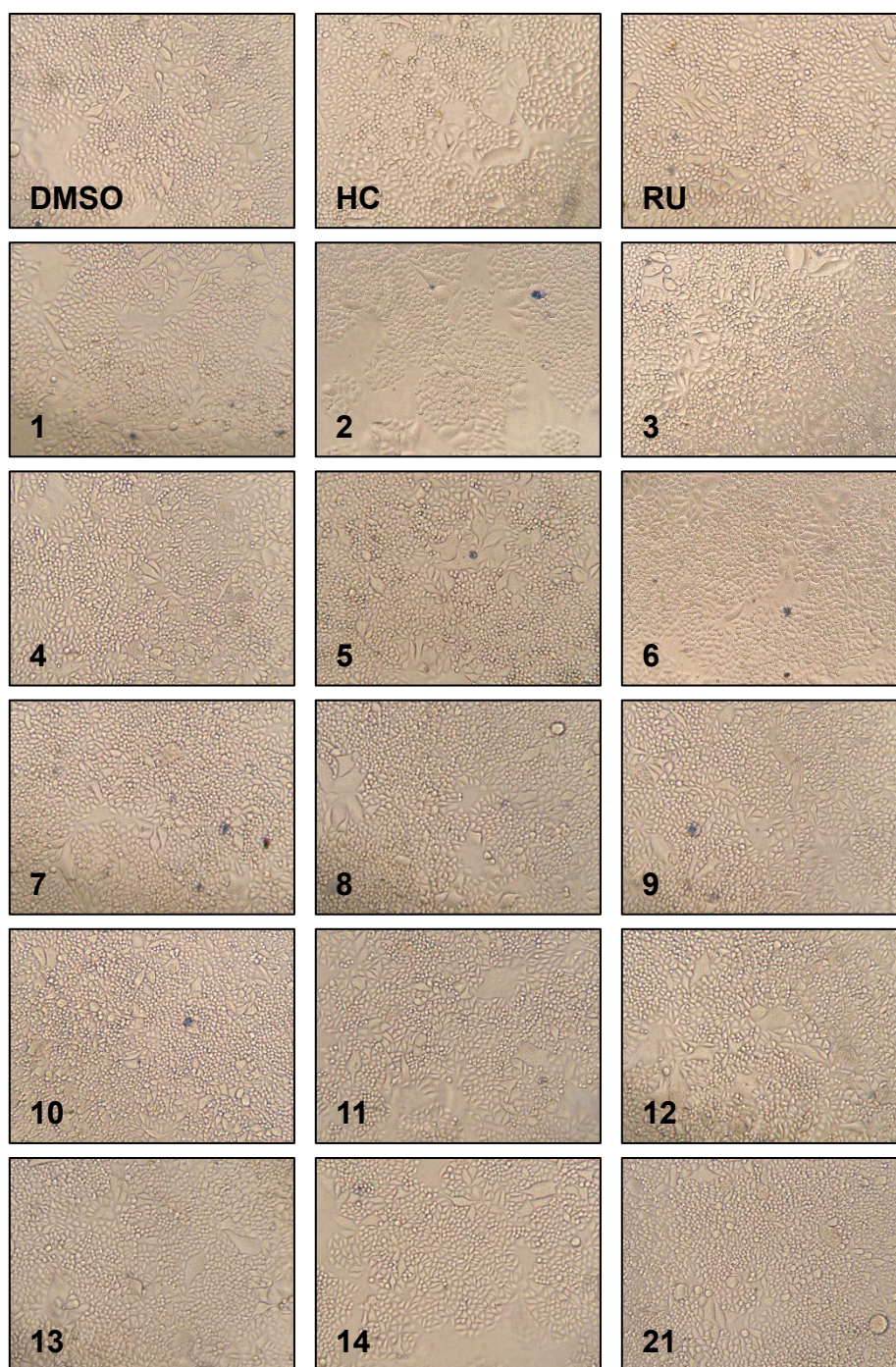
Στη συνέχεια, οι 9 ενώσεις που προκρίθηκαν παραπάνω ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να συνδέονται στον υποδοχέα GR με χρήση πολωσιμετρίας φθορισμού. Οι ενώσεις μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να εκτοπίζουν το φθορίζον γλυκοκορτικοειδές που είναι συνδεδεμένο σε καθαρό ανασυνδυασμένο GR. Η Εικόνα 8 δείχνει ότι η δεξαμεθαζόνη εκτοπίζει πλήρως το φθορίζον γλυκοκορτικοειδές ενώ η στεροειδής ένωση **21** παρουσίασε μερική εκτόπιση. Από τις 9 ενώσεις που ελέγχθηκαν, οι ενώσεις **1** και **13** οδήγησαν σε ασθενή και μερική αναστολή, αντίστοιχα της δέσμευσης της φθορίζουσας ορμόνης. Τα παραπάνω

δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι ενώσεις **1** και **13** συνδέονται με τον υποδοχέα GR με μικρότερη χημική συγγένεια σε σχέση με της δεξαμεθαζόνης (Εικόνα 8). Αν και δεν αποκλείεται η σύνδεση και των άλλων ενώσεων με τον υποδοχέα GR σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, από τα παραπάνω προκρίνονται για παραπέρα μελέτη οι ενώσεις **1** και **13** που συνδέονται με τον υποδοχέα GR σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

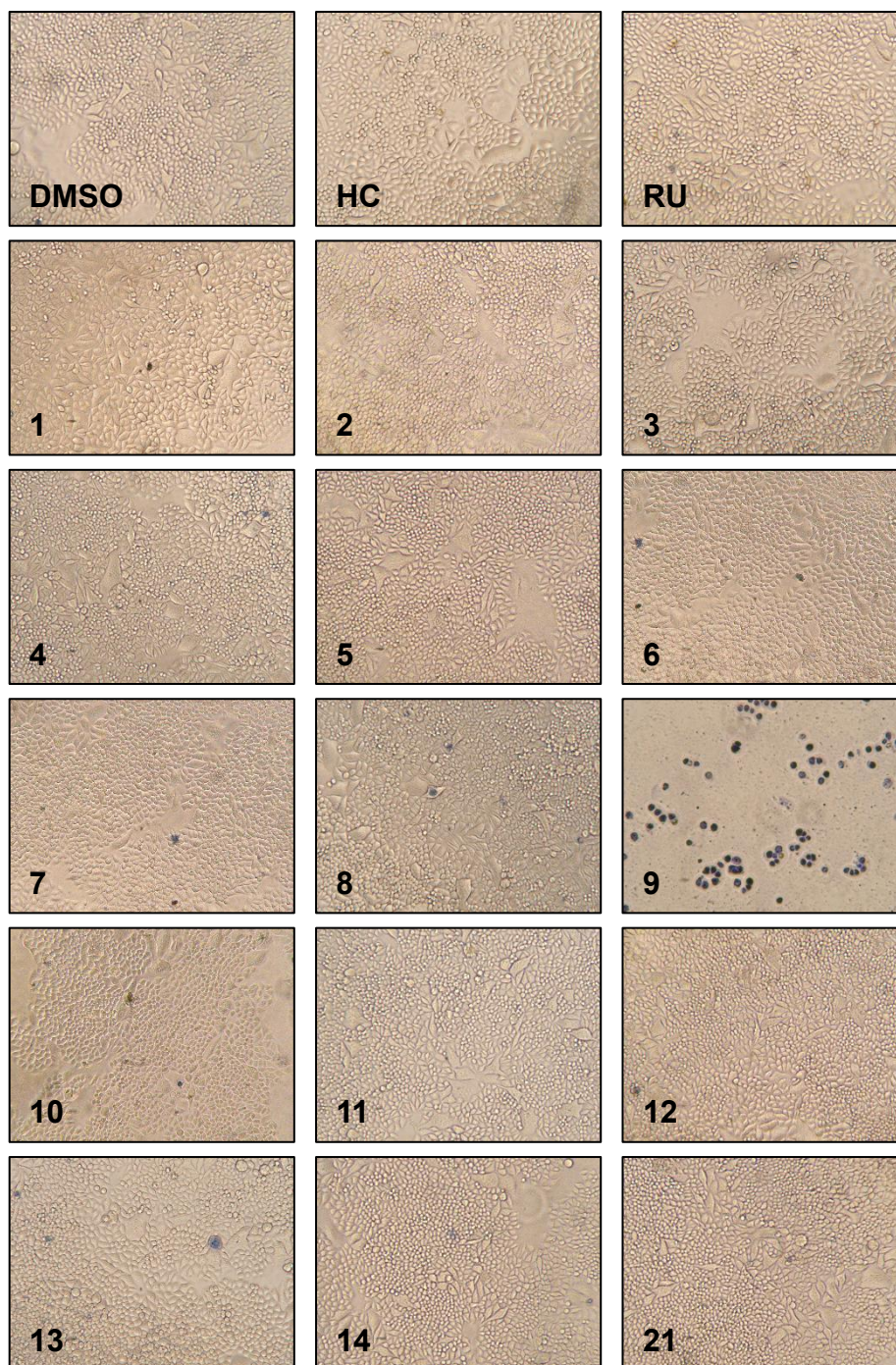
Οι ενώσεις **1**, **13** και **21** αξιολογήθηκαν επιπρόσθετα ως προς την ικανότητα τους να καταστέλλουν την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της υδροκορτιζόνης παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων. Και οι τρεις ενώσεις καταστέλλουν πλήρως την επαγωγή της λουσιφεράσης από την HC με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Εικόνα 9). Ο Πίνακας 3 περιγράφει λεπτομερώς την ανταγωνιστική επίδραση των αυξανόμενων συγκεντρώσεων των τριών ενώσεων. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες οι ενώσεις **1**, **13** και **21** εμφάνισαν 50% καταστολή της έκφρασης της λουσιφεράσης (IC_{50}) ήταν $59 \pm 4 \mu\text{M}$, $26 \pm 1 \mu\text{M}$ και $34 \pm 2 \mu\text{M}$, αντίστοιχα. Οι ενώσεις **13** και **21** εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα στην καταστολή σε σύγκριση με την ένωση **1**, γεγονός που δηλώνει ότι οι ενώσεις **13** και **21** έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για τον υποδοχέα GR, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της Εικόνας 8.



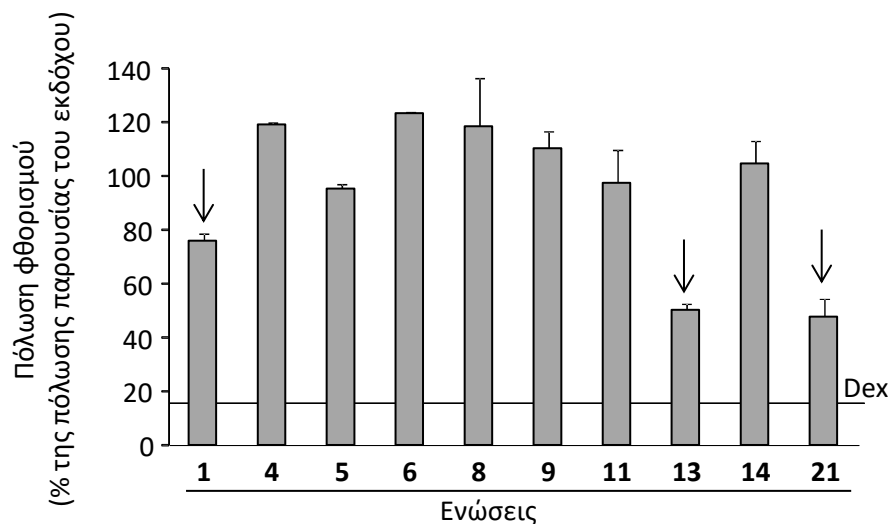
Εικόνα 5. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας παρουσία του εκδόχου (0,1% DMSO), της υδροκορτιζόνης (HC, 0,3 μ M), του RU486 (0,1 μ M), και των υπό έλεγχο ενώσεων **1-14** και **21** (10 μ M).



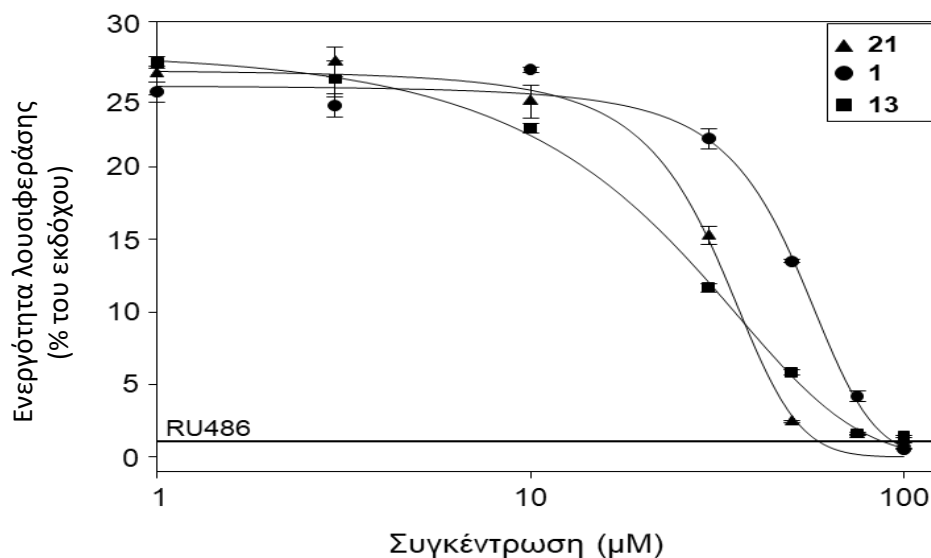
Εικόνα 6. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας παρουσία του εκδόχου (0,1% DMSO), της υδροκορτιζόνης (HC, 0,3 μ M), του RU486 (0,1 μ M), και των υπό έλεγχο ενώσεων **1-14** και **21** (30 μ M).



Εικόνα 7. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας παρουσία του εκδόχου (0,1% DMSO), της υδροκορτιζόνης (HC, 0,3 μ M), του RU486 (0,1 μ M), και των υπό έλεγχο ενώσεων **1-14** και **21** (100 μ M). Η ένωση **9** μειώνει σημαντικά τη κυτταρική βιωσιμότητα.



Εικόνα 8. Καθαρός GR επώαστηκε με φθορίζον γλυκοκορτικοειδές παρουσία του εκδόχου (0.1% DMSO), δεξαμεθαζόνης (Dex, 1 μ M), ή των υπό έλεγχο ενώσεων (10 μ M) για 2 ώρες. Η πόλωση του φωτός εκφράστηκε σε σχέση με την πόλωση παρουσία του εκδόχου (100%). Σύνδεση μιας ένωσης στον GR οδηγεί σε αντικατάσταση του φθορίζοντος γλυκοκορτικοειδούς και επομένως μείωση της πόλωσης. Η πόλωση φθορισμού παρουσία της DEX εμφανίζεται με ευθεία γραμμή. Τα βέλη στις ενώσεις **1**, **13** και **21** δείχνουν τη εκτόπιση της φθορίζουσας ορμόνης από τον υποδοχέα GR. Οι τιμές (μέσος όρος \pm SEM) προέρχονται από δύο ανεξάρτητα πειράματα.



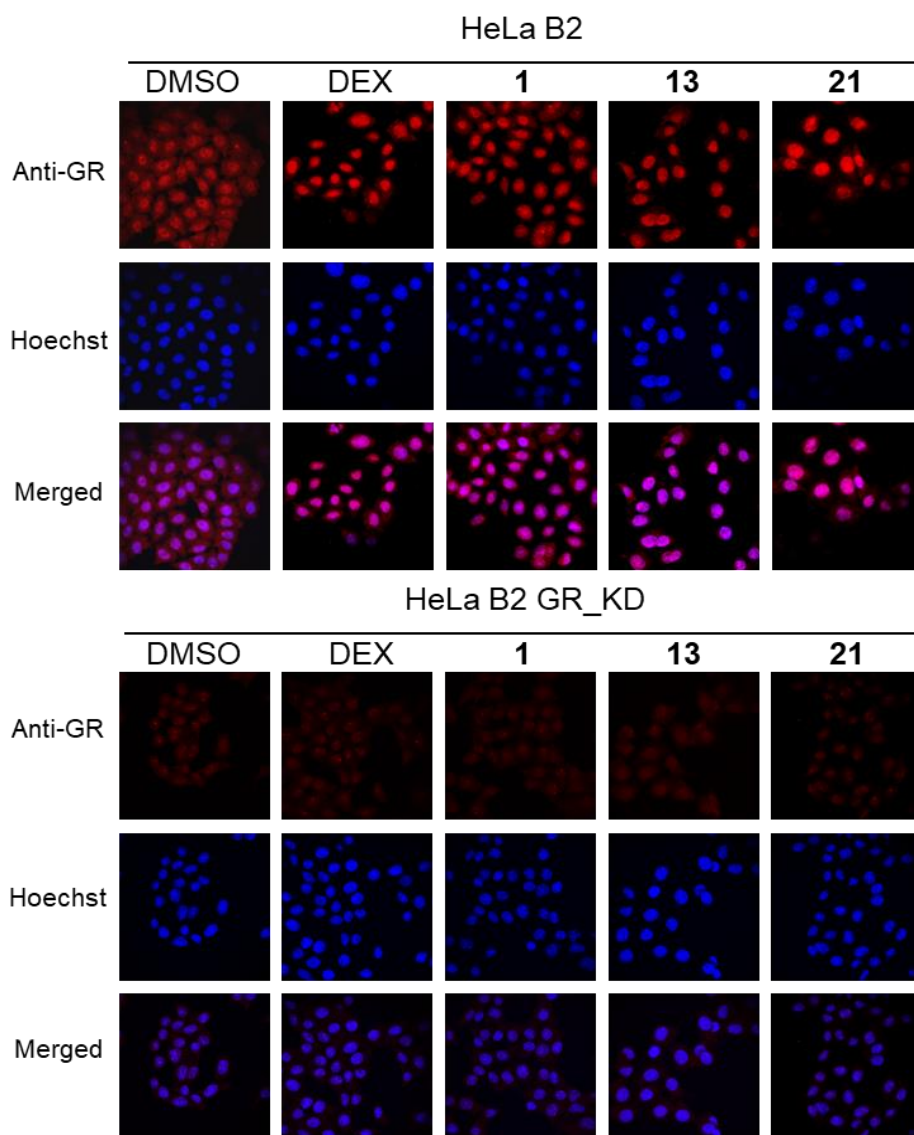
Εικόνα 9. Καμπύλες δοσοαπόκρισης της καταστολής της δράσης της υδροκορτιζόνης από τις επιλεγμένες ενώσεις. Κύτταρα HeLa B2 επώαστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τις προς έλεγχο ενώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ή το RU486 (0,1 μ M), απουσία ή παρουσία υδροκορτιζόνης (HC, 0,3 μ M) για 20 ώρες. Ακολούθησε μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης και έκφρασή της όπως στην Εικόνα 4. Η ευθεία γραμμή δηλώνει την έκφραση της λουσιφεράσης παρουσία RU486. Οι τιμές (μέσος

όρος \pm SEM) προέρχονται από ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις.

Πίνακας 3. Κύτταρα HeLa B2 επώαστηκαν για 20 ώρες, με DMSO (0,1%), RU486 (0,1 μ M) ή τις υπό έλεγχο ενώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, είτε μόνες τους είτε παρουσία 0,3 μ M υδροκορτιζόνης. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι \pm SEM τουλάχιστον 3 ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε 3 επαναλήψεις. Παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές τιμές ($p < 0.05$ σε σχέση με τον ανταγωνισμό της δράση της HC παρουσία του DMSO, t -test). Τιμές >66 αντιστοιχούν σε πλήρη ανταγωνισμό, τιμές μεταξύ 33-66 αντιστοιχούν σε μερικό ανταγωνισμό και τιμές <33 σε ασθενικό ανταγωνισμό.

Ανταγωνισμός (% σε σχέση με τον ανταγωνισμό του RU486)			
Ένωση (μM)	21	1	13
0	ns	ns	ns
1	ns	ns	ns
3	ns	ns	ns
10	27 \pm 8	ns	20 \pm 6
30	37 \pm 3	28 \pm 5	64 \pm 4
50	71 \pm 13	38 \pm 3	85 \pm 3
75	86 \pm 7	73 \pm 8	96 \pm 3
100	87 \pm 6	97 \pm 2	98 \pm 1

Για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα ελέγχθηκε η ικανότητα των ενώσεων **1** και **13** να επάγουν την πυρηνική μετατόπιση του GR. Στην Εικόνα 10 φαίνεται ότι στα κύτταρα HeLa B2, ο υποδοχέας GR εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα όπως είναι αναμενόμενο. Η παρουσία της DEX οδήγησε σε σχεδόν πλήρη μετατόπιση του GR στον πυρήνα. Οι ενώσεις **13** και **21** παρουσίασαν παρόμοια πυρηνική μετατόπιση με αυτή που παρατηρήθηκε παρουσία DEX. Αντίθετα, η ένωση **1** οδήγησε σε πυρηνική μετατόπιση του GR, σε μικρότερο βαθμό. Στα κύτταρα HeLa B2 GR_KD, δηλαδή σε κύτταρα που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα GR, δεν παρατηρήθηκε ούτε πυρηνική ούτε κυτταροπλασματική χρώση του GR, όπως ήταν αναμενόμενο. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα από την πολωσιμετρία φθορισμού και ενισχύουν περαιτέρω την ικανότητα σύνδεσης των ενώσεων **1**, **13** και **21** στον GR.



Εικόνα 10. Οι ενώσεις **1** και **13** προκαλούν πυρηνική μετατόπιση του GR. Κύτταρα HeLa B2 και HeLa GR_KD επωάστηκαν με το έκδοχο (0.1% DMSO), τις προς έλεγχο ενώσεις (10 μ M των ενώσεων **1**, **13** ή **21**) ή δεξαμεθαζόνη (1 μ M DEX). Ακολούθησε ανάλυση με έμμεσο ανοσοφθορισμό με χρήση του αντισώματος 10-26 έναντι του ανθρώπινου GR (Ab10-26), δευτερογενούς αντισώματος σημασμένου με Alexa Fluor® 555 και τελικά με τη χρωστική Hoechst 33346. Μεγέθυνση: x400.

2.1.1.2. Αξιολόγηση των ενώσεων **1** και **13** ως προς την ικανότητά τους να επιδρούν στην έκφραση των γονιδίων στόχων του GR και του NF- κ B.

Στη συνέχεια αποτιμήθηκε η ικανότητα των ενώσεων **1** και **13** να επιδρούν στην ενεργότητα του NF- κ B και συγκεκριμένα στην επαγωγή της έκφρασης γονιδίων με (προ)φλεγμονώδη δράση από τον TNF (προφλεγμονώδης κυτοκίνη που ενεργοποιεί τον NF κ B). Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η επίδραση των ενώσεων **1** και **13** στην έκφραση τεσσάρων γονιδίων στόχων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με διαφορετικούς ρόλους στην φλεγμονή. Πιο

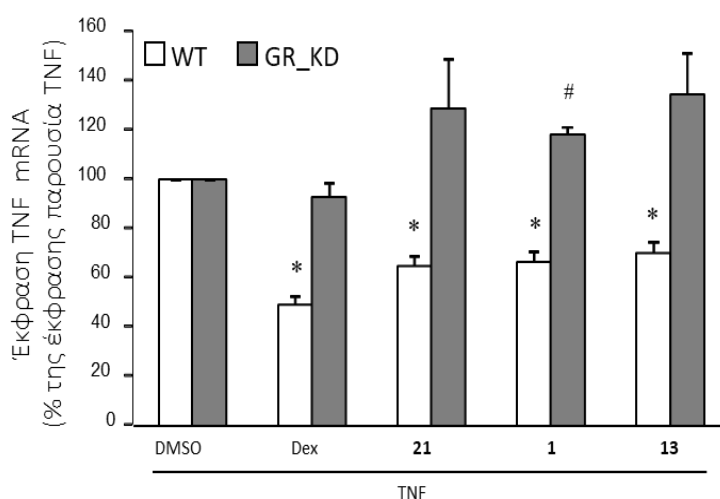
συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση στην έκφραση της προ-φλεγμονώδους κυτοκίνης TNF (tumor necrosis factor), της κυτοκίνης IL6 (ιντερλευκίνη 6) που έχει κύτταρο-εξαρτώμενες προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και των χημειοκινών IL8 (ιντερλευκίνη 8) και CCL2 (C-C motif ligand 2) που παρουσιάζουν προφλεγμονώδεις και χημειοτακτικές λειτουργίες (Turner et al, 2014).

Η επίδραση του TNF στα κύτταρα HeLa B2 προκάλεσε σημαντική επαγωγή του γονιδίου hTNF (>120 φορές), της hIL6 (34 ± 3 φορές), της hIL8 (>100 φορές) και του hCCL2 (14 ± 3 φορές). Αντίθετα η έκφραση των παραπάνω γονιδίων δεν επηρεάστηκαν κατά την επώαση των κυττάρων με δεξαμεθαζόνη ή τις υπό έλεγχο ενώσεις (**1**, **13** και **21**). Σε συμφωνία με τη γνωστή αντιφλεγμονώδη δράση των γλυκοκορτικοειδών μέσω της καταστολής των γονιδίων στόχων του NF-κΒ (Rao et al, 2011) η ταυτόχρονη επώαση με δεξαμεθαζόνη και TNF οδήγησε σε σημαντική καταστολή της ενεργοποίησης και των 4 γονιδίων στόχων (Εικόνα 11). Οι ενώσεις **1**, **13** και **21** κατέστειλαν σημαντικά την ενεργοποίηση του γονιδίου hTNF με παρόμοιο τρόπο όπως η δεξαμεθαζόνη. Για να εξασφαλίσουμε ότι η παραπάνω καταστολή διαμεσολαβείται μέσω του υποδοχέα GR χρησιμοποιήθηκαν και κύτταρα HeLa GR_KD (τα οποία δεν εκφράζουν τον υποδοχέα GR), στα οποία ούτε η δεξαμεθαζόνη ούτε οι υπό έλεγχο ενώσεις καταστέλλουν την ενεργοποίηση του hTNF και της hIL8 (Εικόνα 11A και 11B), επιβεβαιώνοντας την αρχική υπόθεση. Αντίθετα οι ενώσεις δεν επηρέασαν την ενεργοποίηση του hIL6 σε αντίθεση με τη δεξαμεθαζόνη (Εικόνα 11Γ). Τέλος οι ενώσεις **1** και **13** ήταν αναποτελεσματικές στην καταστολή του γονιδίου hCCL2 που επάγεται από τον TNF σε αντίθεση τόσο με τη δεξαμεθαζόνη όσο και με την ένωση **21** όπως φαίνεται στην Εικόνα 11Δ. Η τάση και των τριών ενώσεων, απουσία του GR, να ενισχύουν την έκφραση των παραπάνω γονιδίων στόχων που προκαλείται από την παρουσία του TNF αντανάκλα μια επίδραση εκτός των στόχων αυτών των ενώσεων. Εν κατακλείδι, οι ενώσεις **1** και **13** καταστέλλουν ένα υποσύνολο γονιδίων στόχων του NF-κΒ με τρόπο που εξαρτάται από τον GR όμως με διαφορετικό τρόπο από τη δεξαμεθαζόνη και σε κάποιο βαθμό από την ένωση **21**.

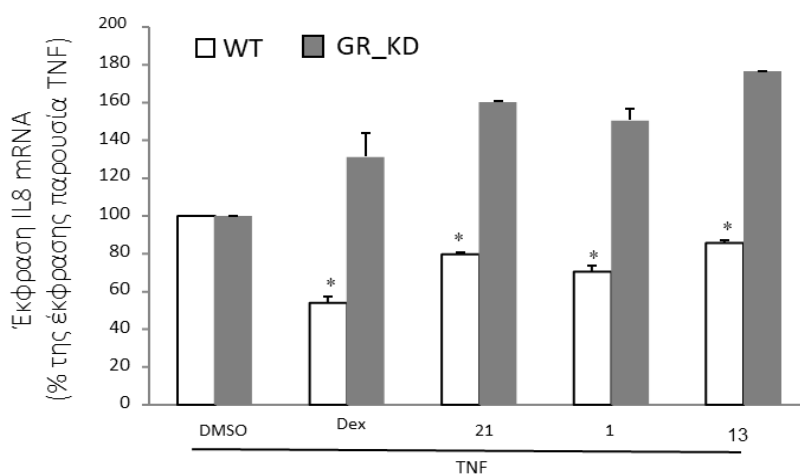
Τέλος, προκειμένου να διασφαλίσουμε ότι οι **1** και το **13** δεν μεσολαβούν GRE-εξαρτώμενη ενεργοποίηση ενδογενών γονιδίων, αξιολογήσαμε την επίδρασή τους στην έκφραση του γονιδίου FKBP5. Το γονίδιο hFKBP5 είναι άμεσος στόχος του υποδοχέα GR και η έκφρασή του επάγεται μέσω GRE (Hubler and Scammell, 2004). Η Εικόνα 12 δείχνει ότι μόνο η δεξαμεθαζόνη ενεργοποιεί σημαντικά την έκφραση του hFKBP5 παρουσία TNF ενώ οι ενώσεις **1**, **13** και **21** δεν έδειξαν καμία επίδραση επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της Εικόνας 4.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι οι ενώσεις **1** και **13** έχουν προφίλ μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του GR αφού i) συνδέονται στον GR και προκαλούν την μετατόπιση του στον πυρήνα, ii) δεν επάγουν από μόνες τους την GRE-εξαρτώμενη μεταγραφή και iii) καταστέλλουν την έκφραση κάποιων προφλεγμονωδών γονιδίων-στόχων του NF-κΒ, με τρόπο που εξαρτάται από τον GR. Οι ενώσεις **1** και **13** ρυθμίζουν ένα υποσύνολο γονιδίων στόχων του NF-κΒ που είναι διαφορετικό από το σύνολο των γονιδίων που ρυθμίζονται από τα κλασικά γλυκοκορτικοειδή ή τους στεροειδείς επιλεκτικούς αγωνιστές του GR. Οι ενώσεις αυτές είναι πρόδρομες ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραπέρα βελτιστοποίηση προκειμένου να αναπτυχθούν ενώσεις οδηγού με επιλεκτική δράση.

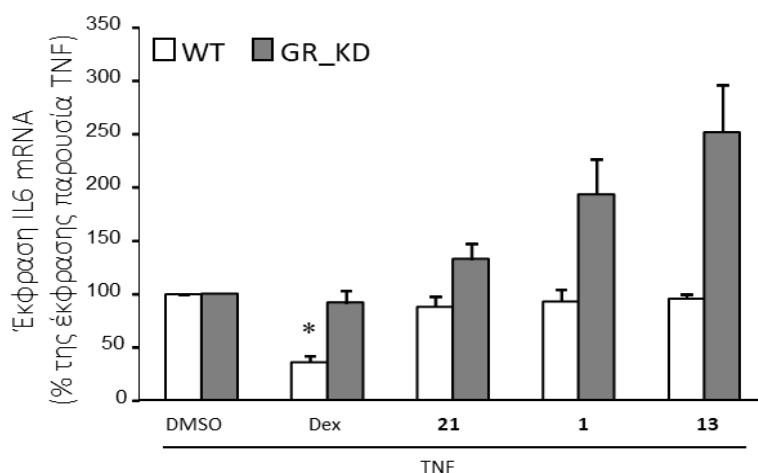
A.



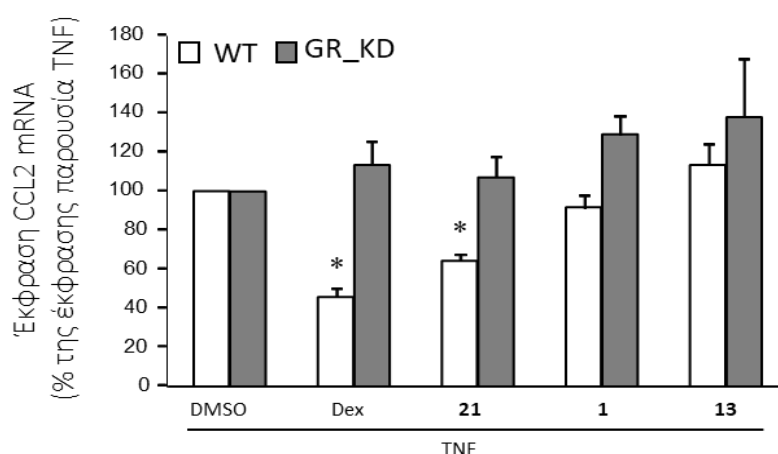
B.



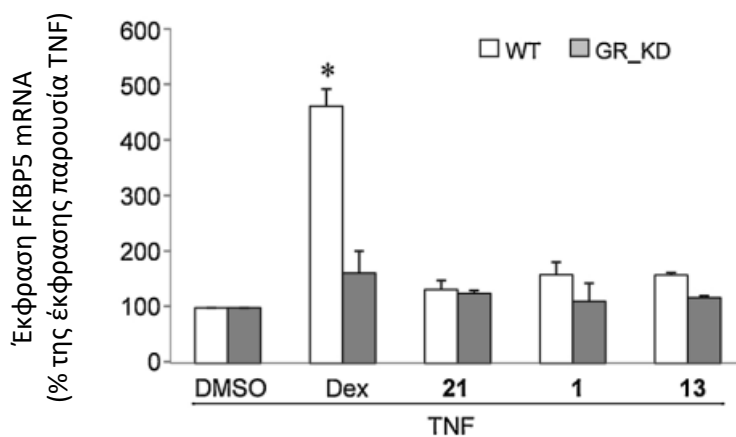
Γ.



Δ.



Εικόνα 11 Α-Δ. Οι ενώσεις **1**, **13** και **21** οδηγούν σε μερική καταστολή της επαγόμενης από τον TNF ενεργοποίησης προφλεγμονωδών γονιδίων-στόχων του NF-κΒ. Κύτταρα HeLa B2 καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες παρουσία ορού ελεύθερου στεροειδών και στη συνέχεια επώαστηκαν με δεξαμεθαζόνη (Dex, 1 μΜ), τις υπό έλεγχο ενώσεις (10 μΜ) ή με το έκδοχο (DMSO) για 3 ώρες και ακολούθησε επώαση για 1 επιπλέον ώρα παρουσία 10ng/ml TNF. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με Trizol και ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης RNA, σύνθεση cDNA (reverse transcription) και real-time PCR για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων που δηλώνονται. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της GAPDH και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης κάθε γονιδίου παρουσία TNF. * $p < 0.05$ σε σχέση με την επίδραση μόνο του TNF. Οι ενώσεις **1** και **13** καταστέλλουν ένα υποσύνολο γονιδίων στόχων του NF-κΒ με τρόπο που εξαρτάται από τον GR αλλά με διαφορετικό τρόπο από τη δεξαμεθαζόνη και από την ένωση **21**.



Εικόνα 12. Οι ενώσεις **1**, **13** και **21** δεν προκαλούν ενεργοποίηση της μεταγραφής του GRE-εξαρτώμενου γονιδίου FKBP5. Κύτταρα HeLa B2 καλλιιεργήθηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 11 και επώαστηκαν με δεξαμεθαζόνη (Dex, 1 μ M), τις υπό έλεγχο ενώσεις (10 μ M) ή με το έκδοχο (DMSO) για 3 ώρες και ακολούθησε επώαση για 1 επιπλέον ώρα παρουσία 10 ng/ml TNF. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου FKBP5 προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 11, κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της GAPDH και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης παρουσία του TNF. * $p < 0.05$ σε σχέση με την επίδραση μόνο του TNF.

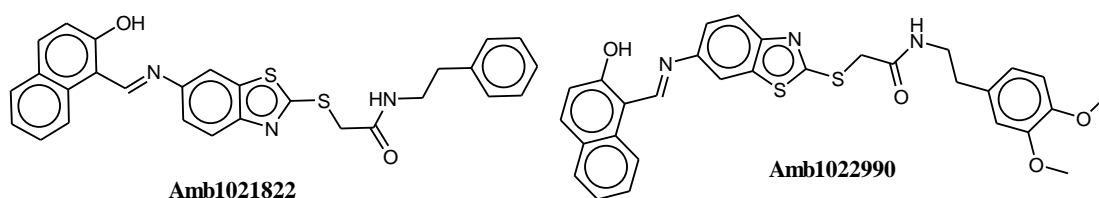
2.1.2 Βελτιστοποίηση των πρόδρομων μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

Για βελτιστοποίηση της δράσης των πρόδρομων ενώσεων Amb1023635 και Amb1021822 που ταυτοποιήθηκαν στην προηγούμενη ενότητα χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω προσεγγίσεις:

A) Επιλογή ενώσεων από εικονική σάρωση εμπορικά διαθέσιμων βιβλιοθηκών με βάση:

α) τον σχεδιασμό δομών ανάλογων των πρόδρομων ενώσεων Amb1023635 και Amb1021822 που ταυτοποιήθηκαν στην 2.1.1.

Χρησιμοποιώντας τη βιβλιοθήκη ενώσεων Ambinter πραγματοποιήθηκε αναζήτηση ενώσεων δομικά όμοιων (similarity search) με την πιο δραστική από τις δύο πρόδρομες ενώσεις, την Amb1021822. Οι ενώσεις που προέκυψαν από την αναζήτηση μελετήθηκαν περαιτέρω μέσω πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης. Από την αξιολόγηση των *in silico* αποτελεσμάτων προέκυψε ότι η ένωση Amb1022990 (Σχήμα 2) αλληλοεπιδρά με τα κρίσιμα για την πρόσδεση αμινοξέα του GR-LBD (ligand-binding domain του GR) με ικανοποιητικές ενεργειακές τιμές και επιλέχθηκε για τη βιολογική αποτίμηση της δράσης της.



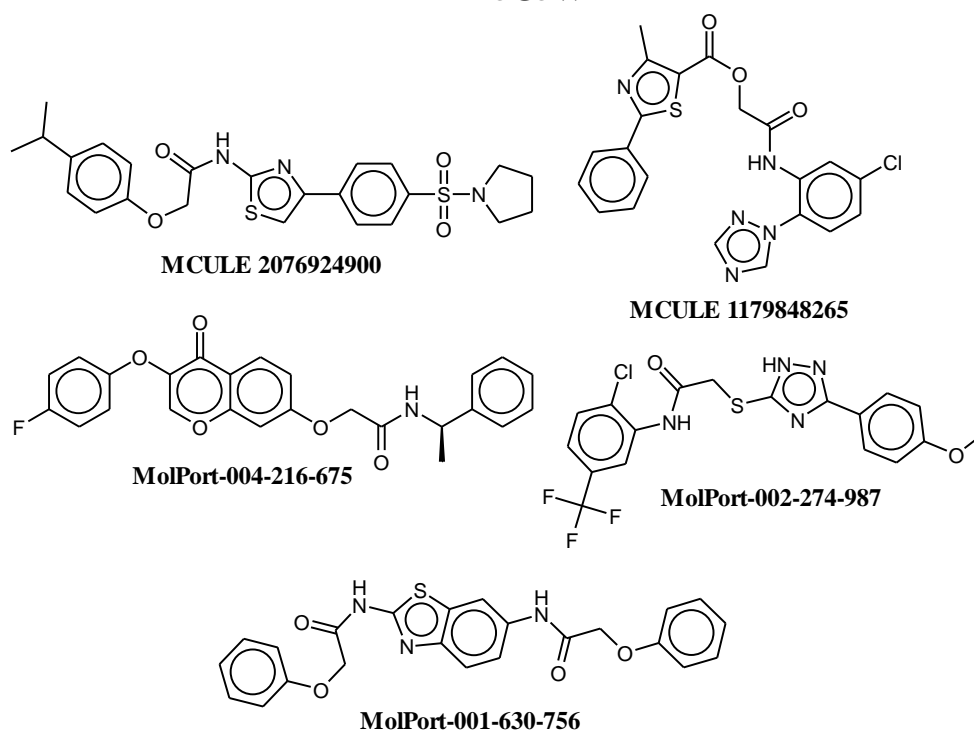
Σχήμα 2. Οι χημικές δομές της πρόδρομης ένωσης Amb1021822 και της Amb1022990, όπως προέκυψε έπειτα από τη δομική αναζήτηση της βιβλιοθήκης ενώσεων Ambinter.

β) την ανάπτυξη βελτιστοποιημένου φαρμακοφόρου μοντέλου κατευθυνόμενου από τη δομή των επιλεκτικών μη στεροειδών αγωνιστών του GR (ligand-based pharmacophore model).

Για τη δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου επιλέχθηκαν 21 μη στεροειδή διαφορετικού μεγέθους βιοδραστικά μόρια με προφίλ επιλεκτικού αγωνιστή του GR. Η τελική επιλογή των 6 ενώσεων που προκρίθηκαν για βιολογική αποτίμηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με: i) τις τιμές πρόσδεσης (Glide Gscore), ii) την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων με κρίσιμα αμινοξέα (N564, Q642, Q570, F623, R611), iii) τις κατάλληλες τιμές προβλεπόμενων ιδιοτήτων ADME (ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στις τιμές της λιποφιλικότητας *clogP* εξαιτίας της λιπόφιλης θήκης

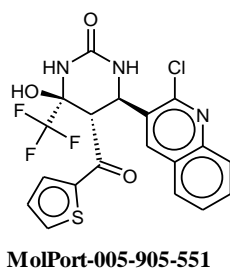
πρόσδεσης) και iv) την ποικιλία νέων δομικών σκελετών (scaffolds). Πραγματοποιήθηκαν *in silico* μελέτες Μοριακής Πρόσδεσης στη βιβλιοθήκη ενώσεων Zinc με χρήση δύο κρυσταλλικών δομών (Κωδικοί PDB:5G5W και 5G3J). Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων προέκυψαν 5 ενώσεις για τον κρύσταλλο 5G5W (Σχήμα 3) και 1 ένωση για τον κρύσταλλο 5G3J (Σχήμα 4) που αλληλοεπιδρούν με τα κρίσιμα για την πρόσδεση αμινοξέα του GR-LBD με ικανοποιητικές ενεργειακές τιμές. Οι ενώσεις αυτές επιλέχθηκαν για βιολογική αποτίμηση της δράσης τους.

Κρυσταλλικό Σύμπλοκο 5G5W



Σχήμα 3. Οι χημικές δομές των 5 προτεινόμενων ενώσεων, όπως προέκυψαν από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων Μοριακής Πρόσδεσης στο κρυσταλλικό σύμπλοκο 5G5W.

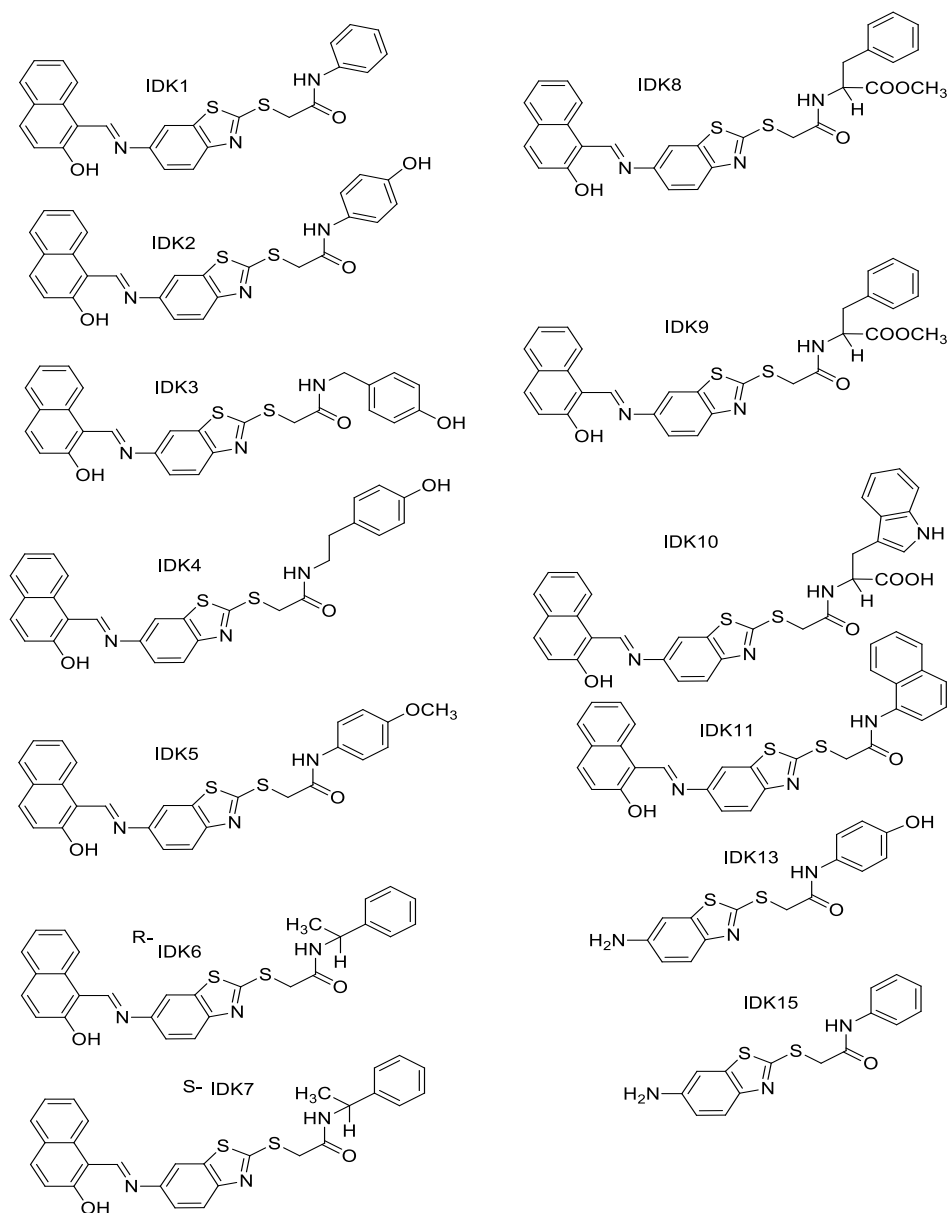
Κρυσταλλικό Σύμπλοκο 5G3J



Σχήμα 4. Η χημική δομή της προτεινόμενης ένωσης, όπως προέκυψε από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων Μοριακής Πρόσδεσης στο κρυσταλλικό σύμπλοκο 5G3J.

B) Επιπρόσθετα, η ομάδα Οργανικής και Οργανομεταλλικής Χημείας (IXB/ΕΙΕ) προχώρησε στη σύνθεση τροποποιημένων παραγώγων των πρόδρομων ενώσεων (ιμινοβενζοθειαζολυλο-2-θειο ακεταμιδικές ενώσεις) (Σχήμα 5), που επίσης αποτιμήθηκε η βιολογική τους δράση.

Για τη βιολογική αποτίμηση της δράσης των νέων υποψηφίων SEGRA χρησιμοποιήθηκαν ως ενώσεις αναφοράς η (δεξαμεθαζόνη (Dex), η υδροκορτιζόνη (HC) και η μifeπριστόνη (RU486) που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα 2.1.1.



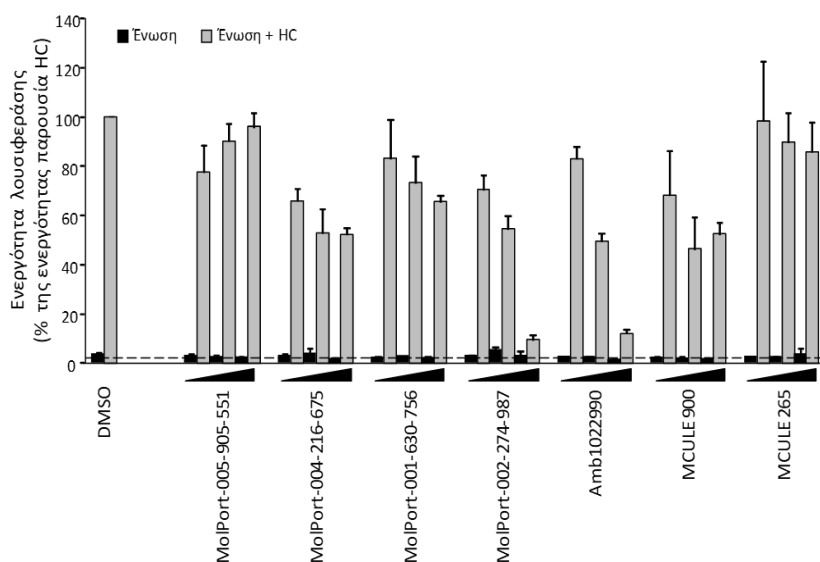
Σχήμα 5. Οι χημικές δομές των τροποποιημένων παραγώγων της πρόδρομης ένωσης Amb1021822 (IDKs, ιμινοβενζοθειαζολυλο-2-θειο ακεταμιδικές ενώσεις).

2.1.2.1. Επίδραση των υπό εξέταση ενώσεων στην ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω GRE

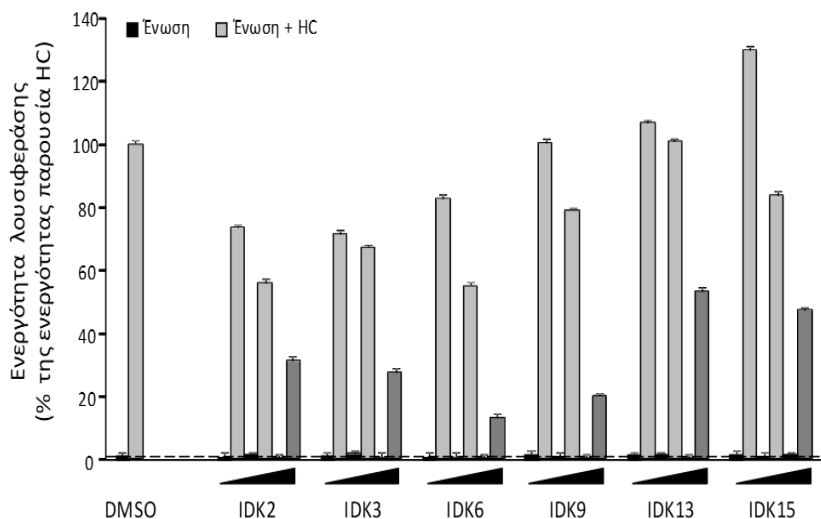
Η μελέτη της δράσης των νέων ενώσεων στην ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω GRE έγινε όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.1.1.1. Ειδικότερα, κύτταρα HeLa B2 επώαστηκαν με το έκδοχο (DMSO) και τις υπό έλεγχο ενώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις όπως παρακάτω:

- Amb1022990, MolPort-002-274-987, MolPort-005-905-551, MolPort-004-216-675, MolPort-001-630-756, MCULE 900 και MCULE 265: 10 μ M, 30 μ M και 100 μ M
- IDK2, IDK3, IDK6, IDK9, IDK13 και IDK15: 10 μ M, 30 μ M και 100 μ M
- IDK1, IDK4, IDK5, IDK7, IDK8, IDK10 και IDK11: 1 μ M, 3 μ M και 10 μ M (λόγω χαμηλής διαλυτότητας)

Οι Εικόνες 13, 14 και 15 δείχνουν ότι καμία από τις υπό έλεγχο ενώσεις δεν οδήγησε σε ενεργοποίηση του γονιδίου της λουσιφεράσης, ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (10-100 μ M), και επομένως δεν έχουν δράση κλασικών γλυκοκορτικοειδών στην επαγωγή GRE-εξαρτώμενων γονιδίων.



Εικόνα 13. Επίδραση των επιλεγμένων ενώσεων στην επαγόμενη από την υδροκορτιζόνη μεταγραφή γονιδίων μέσω GRE. Κύτταρα HeLa B2 καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφεται στην εικόνα 4 και επώαστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τις προς έλεγχο ενώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (10, 30, 100 μ M), απουσία ή παρουσία υδροκορτιζόνης όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4 Η διακεκομμένη γραμμή δηλώνει την έκφραση της λουσιφεράσης παρουσία του RU486. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης προσδιορίστηκε και εκφράστηκε όπως στην Εικόνα 4. Οι τιμές (μέσος όρος \pm SEM) είναι από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα έγινε εις τριπλούν.

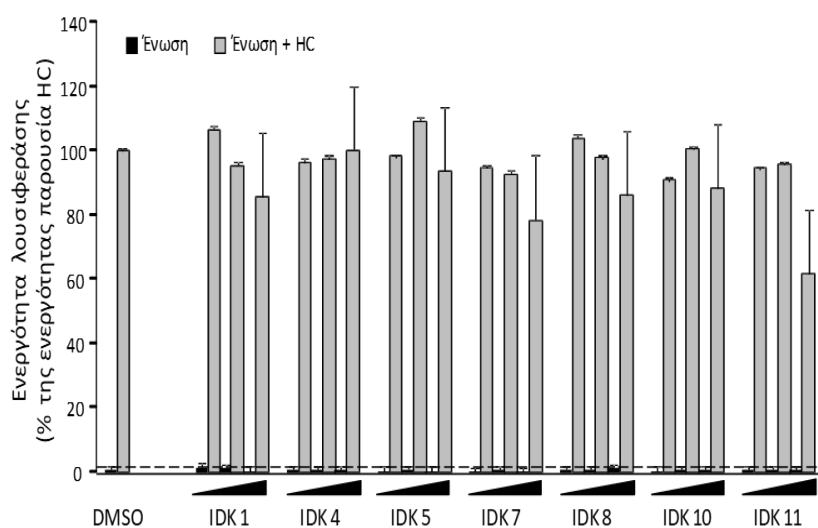


Εικόνα 14. Επίδραση των επιλεγμένων ενώσεων στην επαγόμενη από την υδροκορτιζόνη μεταγραφή γονιδίων μέσω GRE. Κύτταρα HeLa B2 καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφεται στην εικόνα 4 και επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τις προς έλεγχο ενώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (10, 30, 100μΜ), απουσία ή παρουσία υδροκορτιζόνης όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης προσδιορίστηκε και εκφράστηκε όπως στην Εικόνα 4. Η διακεκομμένη γραμμή δηλώνει την έκφραση της λουσιφεράσης παρουσία του RU486. Οι τιμές (μέσος όρος ± SEM) είναι από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα έγινε εις τριπλούν.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η ικανότητα των ενώσεων να παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση από τη φυσική ορμόνη υδροκορτιζόνη (HC) της έκφρασης γονιδίων στόχων του GR, μέσω GRE. Τα κύτταρα HeLa B2 επωάστηκαν με το έκδοχο, τις υπό έλεγχο ενώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ή την ένωση RU486 παρουσία HC σε συγκέντρωση 0,3 μΜ. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι:

1. Οι ενώσεις Amb1022990 και MolPort-002-274-987 οδήγησαν σε παρεμπόδιση της επαγωγής της ενεργότητας της λουσιφεράσης από την υδροκορτιζόνη η οποία ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης της ένωσης και παρουσίασαν πλήρη καταστολή της δράσης της υδροκορτιζόνης στη συγκέντρωση των 100 μΜ (Εικόνα 13).
2. Οι ενώσεις IDK2, IDK3, IDK6, IDK9 στα 100 μΜ και η IDK11 στα 10 μΜ οδήγησαν σε παρεμπόδιση της επαγωγής της ενεργότητας της λουσιφεράσης από την υδροκορτιζόνη η οποία ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης της ένωσης (Εικόνες 14 και 15). Από αυτές, η ένωση IDK6 παρουσίασε τη μεγαλύτερη καταστολή της δράσης της υδροκορτιζόνης στη συγκέντρωση των 100 μΜ και η IDK11 κάποια καταστολή στα 10 μΜ. Η χαμηλή διαλυτότητα όμως της IDK11 δεν επέτρεψε τον παραπέρα χαρακτηρισμό της.

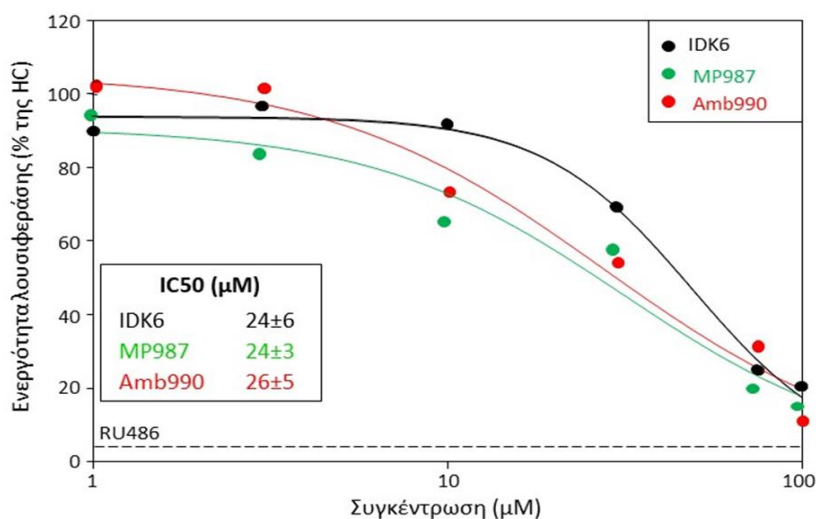
Η βιολογική αποτίμηση ανέδειξε τις ενώσεις Amb1022990, MolPort-002-274-987 και IDK6 ως τους 3 καλύτερους υποψήφιους μη στεροειδείς επιλεκτικούς αγωνιστές του GR αφού δεν δρουν ως γλυκοκορτικοειδή όσον αφορά την επαγωγή του GRE-εξαρτώμενου γονιδίου αναφοράς αλλά ανταγωνίζονται την επαγόμενη από την υδροκορτιζόνη έκφρασή του, δυνητικά μέσω πρόσδεσής τους στον GR. Οι ενώσεις αυτές μελετήθηκαν παραπέρα σε πειράματα δοσοαπόκρισης όπου ελέγχθηκε η ικανότητα ανταγωνισμού της δράσης της υδροκορτιζόνης παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων τους. Η Εικόνα 16 δείχνει ότι οι ενώσεις Amb1022990 (Amb990), MolPort-002-274-987 (MolPort-987) και IDK6 είναι οι πιο δραστικές και οδηγούν σταδιακά σε σχεδόν πλήρη παρεμπόδιση της δράσης της υδροκορτιζόνης στη συγκέντρωση των 100 μM . Οι συγκεντρώσεις στις οποίες οδήγησαν σε 50% καταστολή της δράσης της υδροκορτιζόνης (IC_{50}) ήταν $26 \pm 5 \mu\text{M}$, $24 \pm 3 \mu\text{M}$ και $24 \pm 6 \mu\text{M}$, αντίστοιχα, δηλώνοντας παρόμοια δραστικότητα η οποία όμως δεν ήταν καλύτερη από αυτή της πρόδρομης ένωσης Amb1021822.



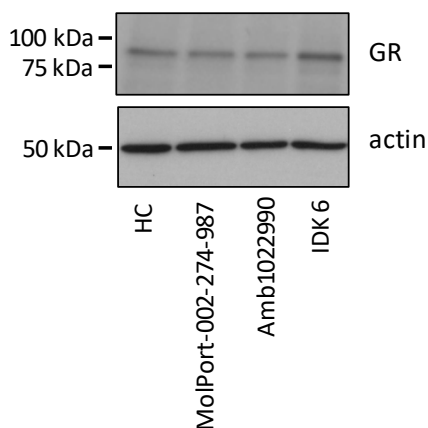
Εικόνα 15. Επίδραση των επιλεγμένων ενώσεων στην επαγόμενη από την υδροκορτιζόνη μεταγραφή γονιδίων μέσω GRE. Κύτταρα HeLa B2 καλλιιεργήθηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4 και επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τις προς έλεγχο ενώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (1, 3 και 10 μM), απουσία ή παρουσία υδροκορτιζόνης όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4. Η ενεργότητα της λουσιφεράσης προσδιορίστηκε και εκφράστηκε όπως στην Εικόνα 1. Η διακεκομμένη γραμμή δηλώνει την έκφραση της λουσιφεράσης παρουσία του RU486. Οι τιμές (μέσος όρος \pm SEM) είναι από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα έγινε εις τριπλούν.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η επίδραση των ενώσεων Amb1022990, MolPort-002-274-987 και IDK6 στα επίπεδα της πρωτεΐνης του GR. Ανοσοχημική ανάλυση (Western blotting) έδειξε ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης του GR μετά από επίδραση των ενώσεων Amb1022990 και

MolPort-002-274-987 ήταν παρόμοια με αυτά που ανιχνεύθηκαν μετά την επίδραση της HC ενώ η κατεργασία με την IDK6 οδήγησε σε λίγο αυξημένα επίπεδα GR (Εικόνα 17). Επομένως η επίδραση των υπό έλεγχο ενώσεων στη δράση της υδροκορτιζόνης δεν οφείλεται σε μειωμένα επίπεδα GR.



Εικόνα 16. Καμπύλες δόσοαπόκρισης της καταστολής της δράσης της υδροκορτιζόνης από τις επιλεγμένες ενώσεις. Κύτταρα HeLa B2 καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4 και επωάστηκαν με το έκδοχο (DMSO), τις προς έλεγχο ενώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ή το RU486 (0,1 μM), απουσία ή παρουσία υδροκορτιζόνης (HC, 0,3 μM), για 20 ώρες. Ακολούθησε μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης και έκφρασή της όπως στην Εικόνα 4. Η διακεκομμένη γραμμή δηλώνει την έκφραση της λουσιφεράσης παρουσία RU486. Οι τιμές της δόσοαπόκρισης είναι από ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα και οι τιμές IC₅₀ (mean±SEM) προέρχονται από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα.

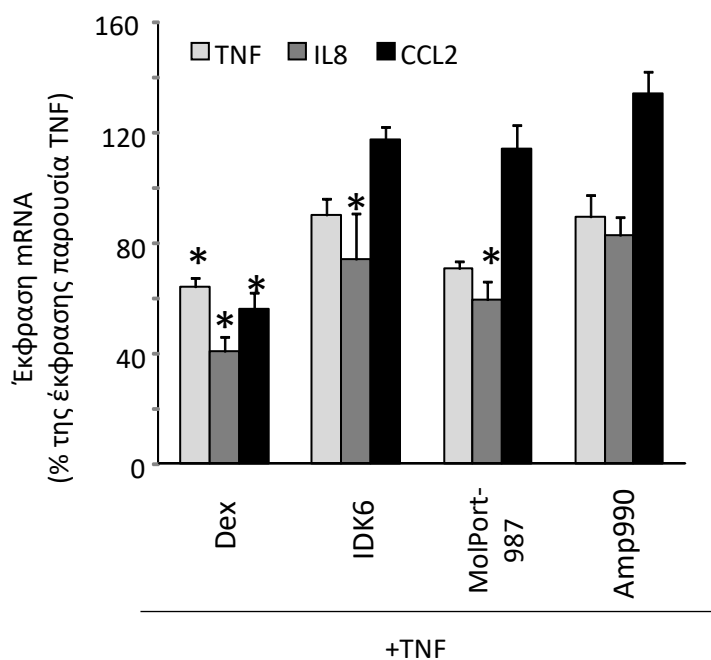


Εικόνα 17. Η επίδραση των υπό έλεγχο ενώσεων δεν επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης του GR. Κύτταρα HeLa B2 καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4 και επωάστηκαν με υδροκορτιζόνη (HC, 300 nM) ή τις υπό έλεγχο ενώσεις (100 μM) για 20 ώρες. 2x10⁵ κύτταρα

αναλύθηκαν με ανοσοσύτρωση κατά Western με χρήση του αντισώματος 2F8 έναντι του GR. Η πρωτεΐνη ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της ανάλυσης ίσων ποσοτήτων συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε διαδρομή.

2.1.2.2. Επίδραση των υπό εξέταση ενώσεων στην έκφραση γονιδίων-στόχων του GR και του NF-κΒ

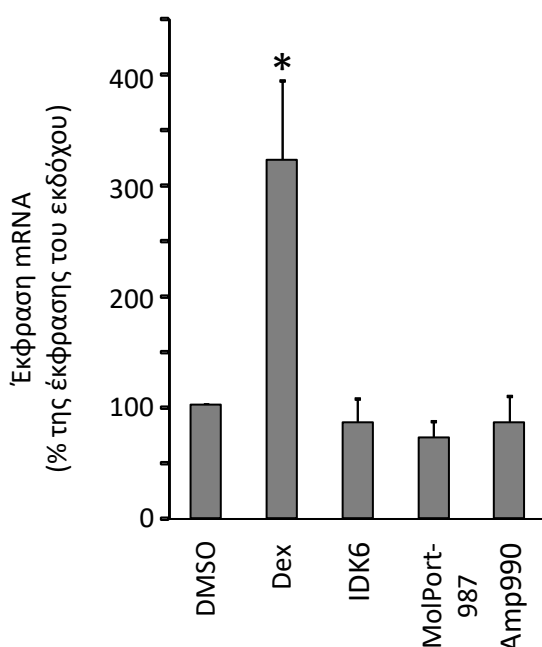
Στη συνέχεια διερευνήθηκε η πιθανή δράση των ενώσεων Amb1022990, MolPort-002-274-987 και IDK6 στην καταστολή της ενεργότητας του NF-κΒ και συγκεκριμένα στην καταστολή της επαγωγής από τον TNF της έκφρασης γονιδίων με (προ)φλεγμονώδη δράση. Η έκφραση των γονιδίων hTNF, hIL8 και hCCL2 προσδιορίστηκε μετά από επώαση των κυττάρων HeLa B2 με τις υπό έλεγχο ενώσεις, τη δεξαμεθαζόνη ή το έκδοχο, παρουσία ή απουσία TNF. Σημειώνεται ότι η χορήγηση της δεξαμεθαζόνης ή των ενώσεων απουσία του TNF δεν είχε καμία επίδραση στην έκφραση των γονιδίων που μελετήθηκαν (δεν παρουσιάζεται εδώ). Η Εικόνα 18 δείχνει ότι χορήγηση της δεξαμεθαζόνης παρουσία TNF οδήγησε στην αναμενόμενη μερική καταστολή της επαγωγής της έκφρασης και των τριών γονιδίων. Χορήγηση των υπό έλεγχο ενώσεων οδήγησε σε κάποια καταστολή της έκφρασης των γονιδίων hTNF και hIL8 αλλά η καταστολή αυτή ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για τη δράση των ενώσεων MolPort-002-274-987 και IDK6 στο γονίδιο hIL8. Αντίθετα, καμία από τις υπό έλεγχο ενώσεις δεν οδήγησε σε καταστολή της επαγωγής της έκφρασης του γονιδίου hCCL2.



Εικόνα 18. Οι ενώσεις IDK6, MolPort-987 and Amb990 οδηγούν σε μερική καταστολή της επαγόμενης από τον TNF ενεργοποίησης προφλεγμονωδών γονιδίων-στόχων του NFKB. Κύτταρα HeLa B2

καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 11 και επώαστηκαν με δεξαμεθαζόνη (Dex, 1 μ M), τις υπό έλεγχο ενώσεις (10 μ M) ή με το έκδοχο (DMSO) για 3 ώρες και ακολούθησε επώαση για 1 επιπλέον ώρα παρουσία 10ng/ml TNF. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων TNF, IL8 και CCL2 προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 11. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της GAPDH και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης κάθε γονιδίου παρουσία TNF. * $p < 0.05$ σε σχέση με την επίδραση μόνο του TNF.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι οι υπό έλεγχο ενώσεις δεν διαμεσολαβούν επαγωγή γονιδίων μέσω GRE μελετήθηκε η επίδρασή τους στην έκφραση του GRE-εξαρτώμενου γονιδίου hFKBP5. Η Εικόνα 19 δείχνει επαγωγή της έκφρασης του hFKBP5 από τη δεξαμεθαζόνη, όπως αναμένεται, αλλά από καμία από τις υπό έλεγχο ενώσεις. Τα αποτελέσματά μας, δηλώνουν ότι οι Amb1022990, MolPort-002-274-987 και IDK6 δεν διαμεσολαβούν GRE-εξαρτώμενη μεταγραφή γονιδίων σε συμφωνία με τα προηγούμενα ευρήματά μας, αλλά ότι οι ενώσεις MolPort-002-274-987 και IDK6 καταστέλλουν σημαντικά την επαγωγή του γονιδίου IL8.



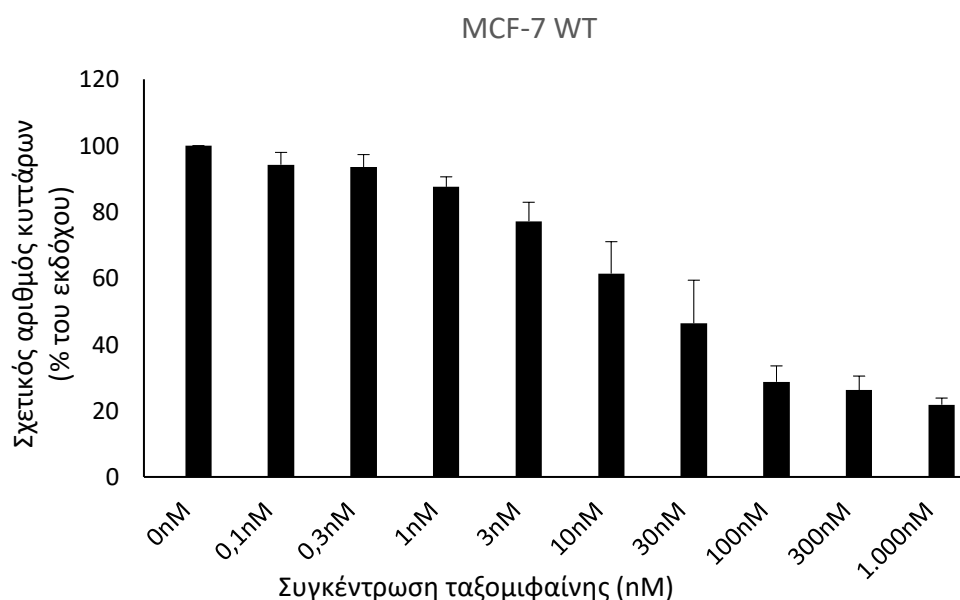
Εικόνα 19. Οι ενώσεις IDK6, MolPort-987 and Amb990 δεν προκαλούν ενεργοποίηση της μεταγραφής του GRE-εξαρτώμενου γονιδίου FKBP5. Κύτταρα HeLa B2 καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 11 και επώαστηκαν με δεξαμεθαζόνη (Dex, 1 μ M), τις υπό έλεγχο ενώσεις (10 μ M) ή με το έκδοχο (DMSO) για 4 ώρες. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου FKBP5 προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 11, κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της GAPDH και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης παρουσία του εκδόχου. * $p < 0.05$ σε σχέση με την επίδραση του εκδόχου.

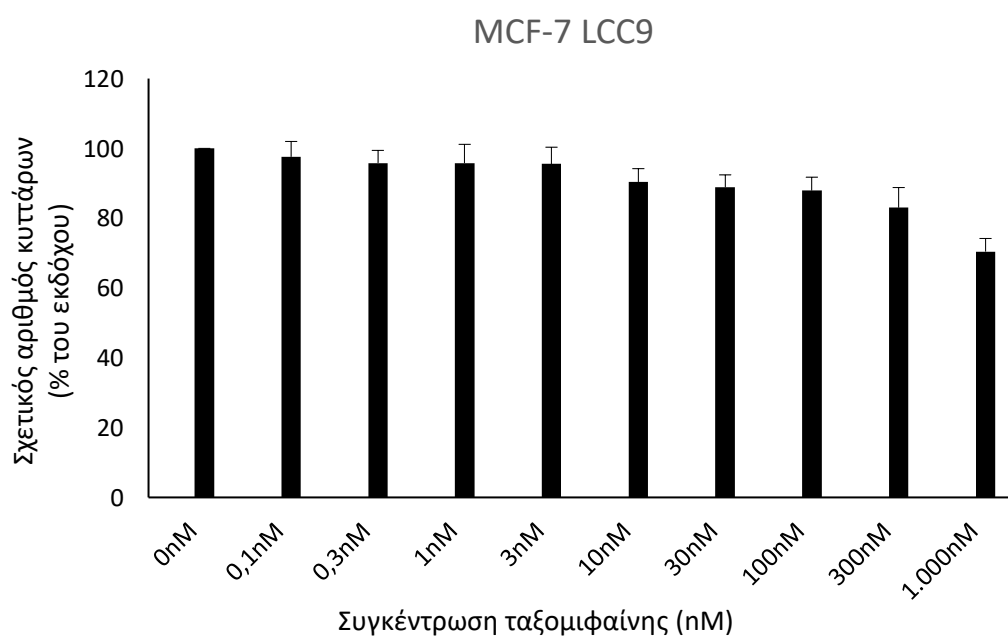
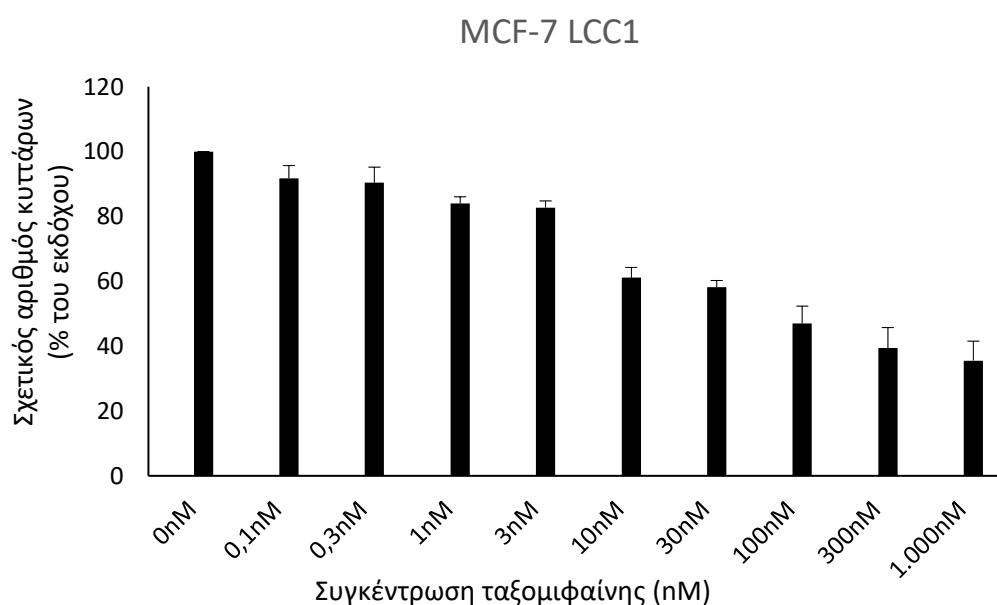
Συμπερασματικά οι νέες ενώσεις είναι πρόδρομες ενώσεις που δεν παρουσιάζουν καλύτερη δράση από αυτή της πρόδρομης ένωσης Amb1021822.

2.2 Αποτίμηση της αντικαρκινικής δράσης των μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του GR

Ένας από τους στόχους της εργασίας ήταν η αποτίμηση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης των υποψήφιων ενώσεων με προφίλ επιλεκτικού αγωνιστή του GR. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα καρκίνου του μαστού (ΚτΜ) MCF-7/LCC1 και MCF-7/LCC9 που δείχνουν μερική και πλήρη ανθεκτικότητα, αντίστοιχα, στο αντιοιστρογόνο 4-υδροξυταμοξιφαίνη (OHT, αναφέρεται στη συνέχεια ως ταμοξιφαίνη) λόγω υπερενεργοποίησης του NF-κΒ (Nehra et al, 2010). Η Εικόνα 20 επιβεβαιώνει την μερική ανταπόκριση των κυττάρων MCF7/LCC1 και τη απουσία ανταπόκρισης των κυττάρων MCF7/LCC9 στην ταμοξιφαίνη συγκριτικά με την ανταπόκριση των MCF7 κυττάρων άγριου τύπου (MCF7-WT).

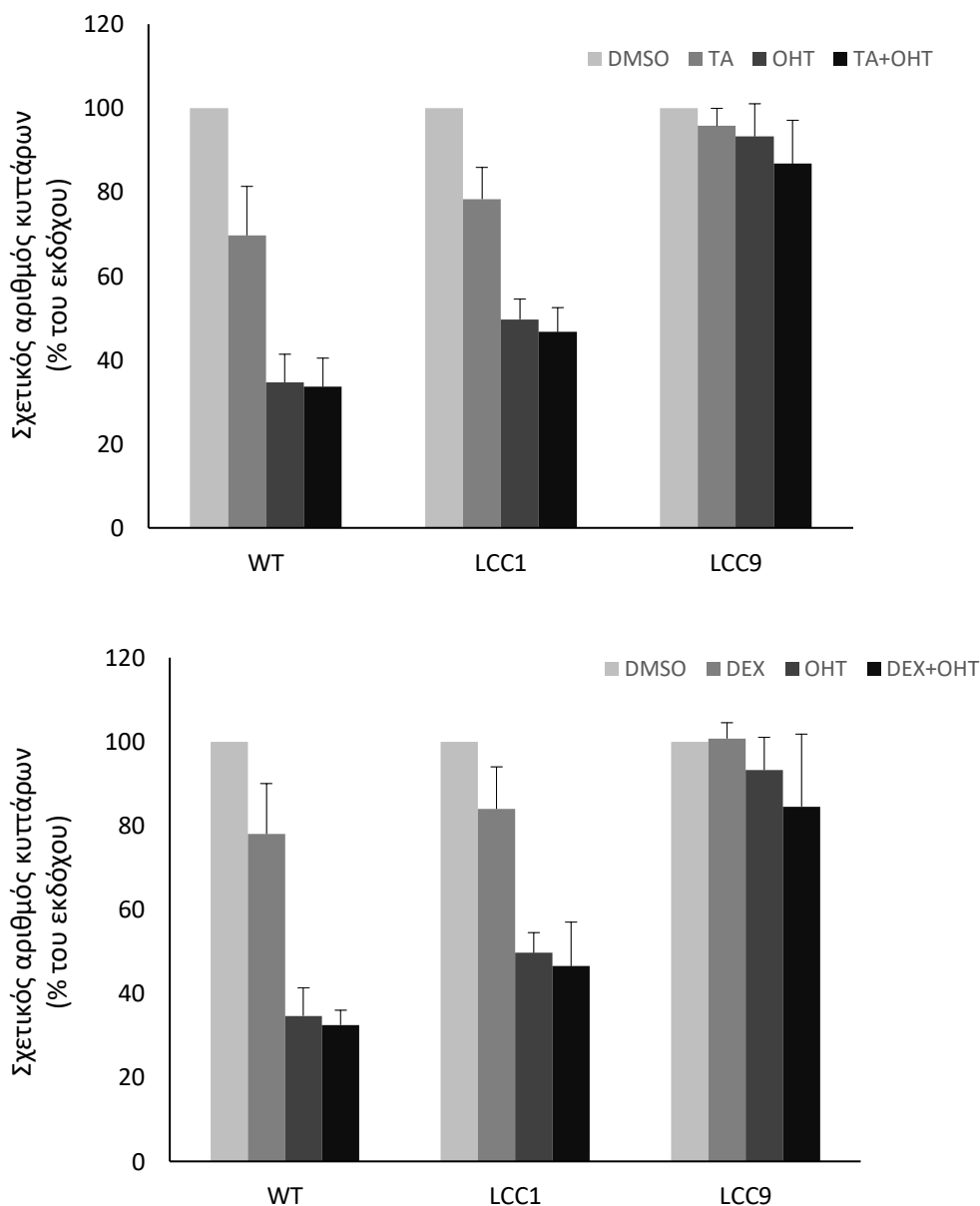
Αρχικά, μελετήθηκε η ικανότητα των κλασικών γλυκοκορτικοειδών τριαμσινολόνη και δεξαμεθαζόνη (TA και DEX), που χρησιμοποιήθηκαν ως ενώσεις αναφοράς, να αποκαθιστούν την ευαισθησία των παραπάνω κυττάρων στην ταμοξιφαίνη μέσω καταστολής της δράσης του NF-κΒ (Εικόνα 21). Στατιστική ανάλυση δεν έδειξε σημαντικές διαφορές στην ανταπόκριση των κυττάρων σε ταυτόχρονη παρουσία της ταμοξιφαίνης και του γλυκοκορτικοειδούς σε σχέση με την ταμοξιφαίνη μόνη της. Παρόμοια, ανάλογα πειράματα με χρήση των πρόδρομων ενώσεων 1 και 13 δεν οδήγησαν σε αποκατάσταση της ευαισθησίας των κυττάρων MCF7/LCC1 και MCF7/LCC9 στη ταμοξιφαίνη (δεν παρουσιάζονται εδώ).





Εικόνα 20. Μερική και πλήρης αντοχή των κυττάρων MCF-7/LCC1 και MCF-7/LCC9 στην ταμοξιφαίνη. Κύτταρα MCF-7, MCF-7/LCC1 και MCF-7/LCC9 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε RPMI παρουσία 10% ορού ελεύθερου στεροειδών, ινσουλίνης (1 mg/L) και οιστραδιόλης (0,1 nM) και στη συνέχεια επώαστηκαν με το έκδοχο (0,1% DMSO) ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις ταμοξιφαίνης (όπως δηλώνεται) για 6 ημέρες όπως περιγράφεται στο τμήμα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Ακολούθησε μέτρηση του σχετικού αριθμού των κυττάρων με crystal violet. Η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων παρουσία του εκδόχου).

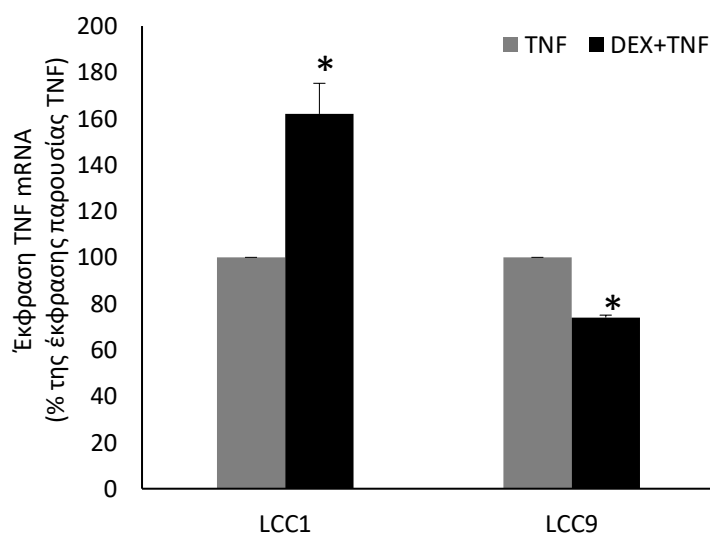
Στη συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητα της δεξαμεθαζόνης να καταστέλλει την επαγωγή γονιδίων-στόχων του NF-κΒ και συγκεκριμένα του γονιδίου TNF στα κύτταρα MCF-7/LCC1 και MCF-7/LCC9. Η Εικόνα 22 δείχνει ότι στα κύτταρα MCF-7/LCC1 η δεξαμεθαζόνη οδήγησε σε σημαντική επαγωγή αντί για καταστολή του γονιδίου TNF ενώ η καταστολή στα κύτταρα MCF-7/LCC9 ήταν μικρή.



Εικόνα 21. Τα κλασικά γλυκοκορτικοειδή δεξαμεθαζόνη (DEX) και τριαμσινολόνη (TA) δεν αποκαθιστούν την ευαισθησία των κυττάρων KtMMCF7/LCC1 και MCF7/LCC9 στην ταμοξιφαίνη. Κύτταρα MCF-7, MCF7/LCC1 και MCF7/LCC9 επώστηκαν με 1 μΜ του γλυκοκορτικοειδούς απουσία ή παρουσία 0,1 μΜ ταμοξιφαίνης ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην εικόνα 20. Η

μέτρηση του σχετικού αριθμού των κυττάρων και η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε όπως στην Εικόνα 20.

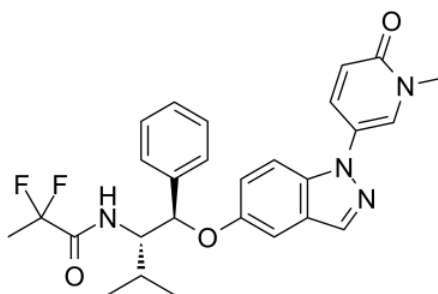
Συμπερασματικά, η απουσία της αποκατάστασης της ευαισθησίας των κυττάρων MCF7/LCC1 και MCF7/LCC9 στη ταμοξιφαίνη και η ταυτόχρονη απουσία καταστολής του γονιδίου TNF από τα κλασικά γλυκοκορτικοειδή στα κύτταρα MCF7/LCC1 δηλώνουν ότι η αλληλεπίδραση του GR και του NF- κ B διαμεσολαβείται από διαφορετικούς μηχανισμούς στα MCF7/LCC1 και MCF7/LCC9 σε σχέση με το καλά μελετημένο σύστημα των κυττάρων HeLa. Με βάση τα παραπάνω, δεν προχώρησε η αποτίμηση της δράσης των υποψηφίων μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών με το σύστημα των ανθεκτικών στην ταμοξιφαίνη κυττάρων καρκίνου του μαστού.



Εικόνα 22. Η δεξαμεθαζόνη δεν καταστέλλει την επαγωγή του γονιδίου TNF στα κύτταρα MCF7/LCC1. Κύτταρα MCF7/LCC1 και MCF7/LCC9 καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 20 και στη συνέχεια επώαστηκαν με το έκδοχο (DMSO) ή δεξαμεθαζόνη (DEX, 1 μ M) για 3 ώρες και ακολούθησε επώαση για 1 επιπλέον ώρα παρουσία 10 ng/ml TNF. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου TNF προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 11, κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της GAPDH και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης παρουσία του εκδόχου. * $p < 0.05$ σε σχέση με την παρουσία μόνο του TNF.

2.3 Μελέτη της δράσης του μη στεροειδούς επιλεκτικού αγωνιστή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, AZD9567

Στο κεφάλαιο 2.3 αξιολογήθηκε η δράση της ένωσης AZD9567 ως επιλεκτικού αγωνιστή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και μελετήθηκαν οι μηχανισμοί που διαμεσολαβούν αυτή τη δράση. Έχει δειχθεί ότι η ένωση AZD9567 (Σχήμα 6) συνδέεται στον GR με υψηλή χημική συγγένεια, ότι έχει υψηλή *in vivo* αποτελεσματικότητα στην καταστολή της φλεγμονής όταν χορηγείται από το στόμα σε αρουραίους με φλεγμονή στις αρθρώσεις και ότι παρουσιάζει βελτιωμένο προφίλ παρενεργειών σε σχέση με τα κλασσικά γλυκοκορτικοειδή (Ripa et al. 2018). Στα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω μελετήθηκε η δράση της ένωσης AZD9567 σε σχέση με αυτή της δεξαμεθαζόνης και της υδροκορτιζόνης.



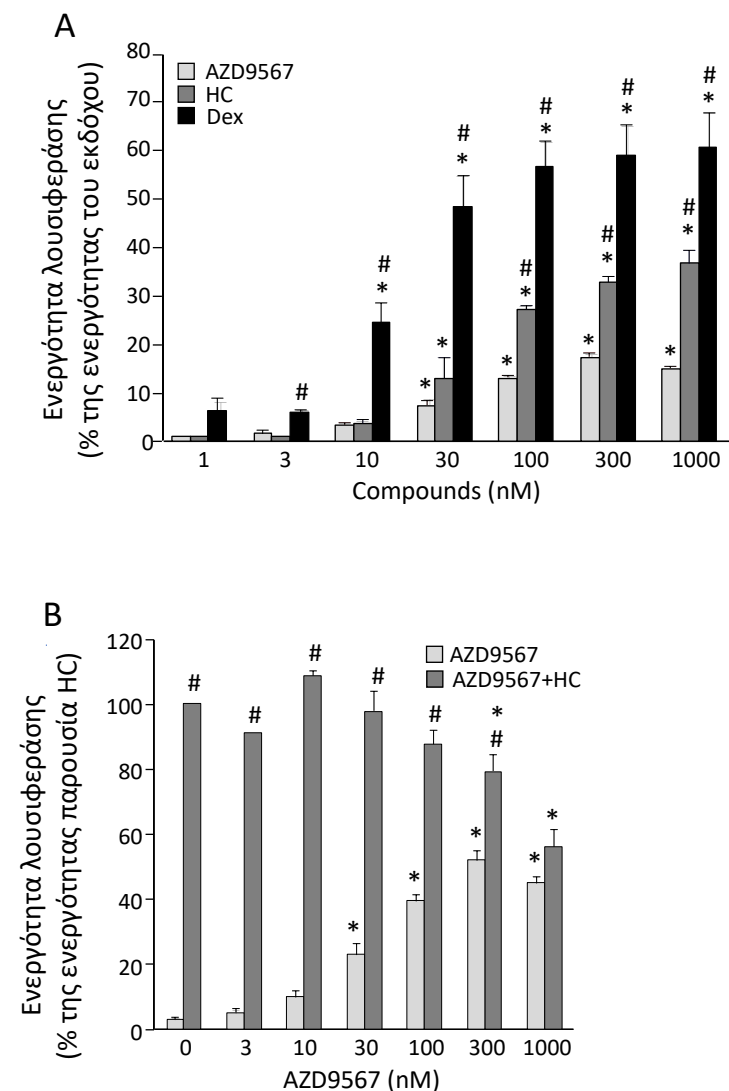
Σχήμα 6. Η χημική δομή της ένωσης AZD9567.

2.3.1 Επίδραση της ένωσης AZD9567 στην ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω GRE

Αρχικά, αξιολογήθηκε η ικανότητα της ένωσης AZD9567 να επάγει την εξαρτώμενη από στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GRE) γονιδιακή έκφραση σε κύτταρα HeLa B2. Επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων AZD9567 έως 1 μM έφτασε σε μέγιστη 15-πλάσια επαγωγή έκφρασης της λουσιφεράσης, ενώ η επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων HC και Dex έως 1 μM προκάλεσε επαγωγή της έκφρασης της λουσιφεράσης 37 φορές και 61 φορές αντίστοιχα (Εικόνα 23A). Οι συγκεντρώσεις οι οποίες οδήγησαν στο 50% της μέγιστης δράσης για τις AZD9567, HC και Dex (IC_{50}) ήταν 33,4 nM, 63,8 nM και 17,5 nM, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η AZD9567 είναι μερικός αγωνιστής του GR στα κύτταρα HeLa B2.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητα της ένωσης AZD9567 να παρεμποδίζει την επαγόμενη από την υδροκορτιζόνη (HC) ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων-στόχων του GR μέσω GRE σε κύτταρα HeLa B2. Η εικόνα 23B δείχνει ότι αυξανόμενες συγκεντρώσεις της ένωσης AZD9567 παρουσία υδροκορτιζόνης (0,3 μM) οδήγησαν σε αυξανόμενη καταστολή της επαγωγής της ενεργότητας λουσιφεράσης από την υδροκορτιζόνη (Εικόνα 23B). Η επαγωγή

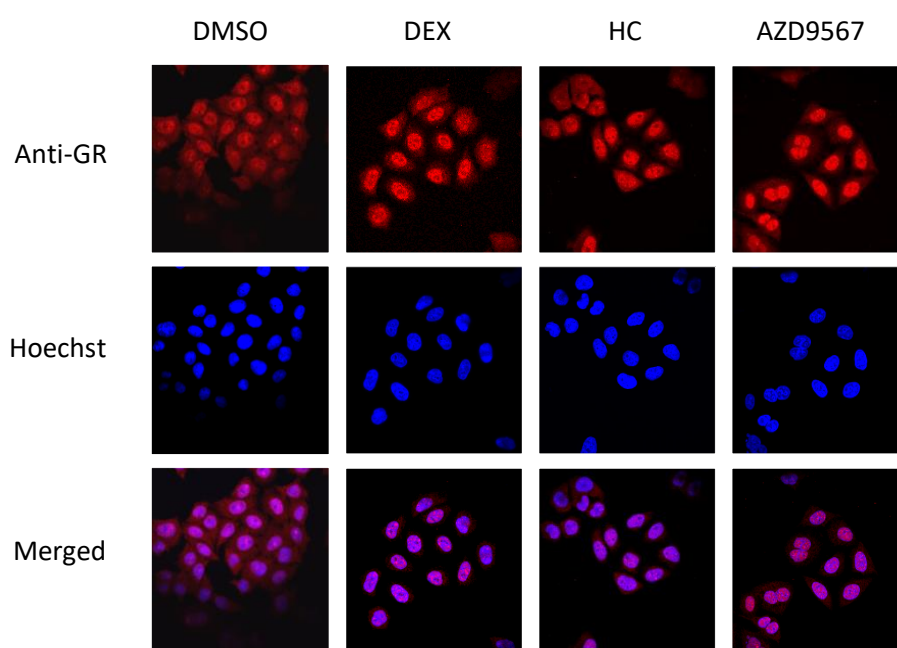
της λουσιφεράσης από 1 μM AZD9567 απουσία και παρουσία υδροκορτιζόνης ήταν πρακτικά η ίδια δηλώνοντας πλήρη ανταγωνισμό της δράσης της HC από την AZD9567.



Εικόνα 23. Η ένωση AZD9567 είναι μερικός αγωνιστής του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). (A) Κύτταρα HeLa B2 καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό ελεύθερο στεροειδών και στη συνέχεια επώαστηκαν με το έκδοχο (DMSO) ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις των ενώσεων AZD9567, υδροκορτιζόνης (HC) ή δεξαμεθαζόνης (Dex) για 20 ώρες. Ακολούθησε μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης και έκφρασή της όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4. Οι τιμές (μέσος όρος \pm SEM) είναι από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα έγινε εις τριπλούν. * $p < 0.05$ σε σχέση με την επίδραση του εκδόχου και # $p < 0.05$ σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση της AZD9567 (ANOVA). (B) Κύτταρα HeLa B2 καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω (A) και στη συνέχεια επώαστηκαν με το έκδοχο (DMSO) ή αυξανόμενες συγκεντρώσεις της ένωσης AZD9567 απουσία ή παρουσία υδροκορτιζόνης (HC, 0.3 μM), για 20 ώρες. Η μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης και έκφρασή της έγιναν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 4. Οι τιμές (μέσος όρος \pm SEM) είναι από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα που το καθένα έγινε εις

τριπλούν.*p < 0.05 σε σχέση με την απουσία της AZD9567, #p < 0.05 σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση της AZD9567.

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω, μελετήθηκε η ικανότητα της AZD9567 να προκαλεί πυρηνική μετατόπιση του GR σε κύτταρα HeLa B2 χρησιμοποιώντας έμμεσο ανοσοφθορισμό (IF). Η Εικόνα 24 δείχνει ότι παρουσία του εκδόχου ο GR εντοπίστηκε τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα και ότι η επίδραση της Dex, της HC ή της AZD9567 οδήγησε σε σχεδόν πλήρη μετατόπιση του GR στον πυρήνα επιβεβαιώνοντας έτσι την αγωνιστική δράση της AZD9567 στα κύτταρα HeLa B2. Τα παραπάνω αποτέλεσμα μας δείχνουν ότι η AZD9567 είναι μερικός αγωνιστής του GR σε κύτταρα HeLa B2 ικανός να υποκαταστήσει την υδροκορτιζόνη σε φαρμακολογικής σημασίας συγκεντρώσεις.



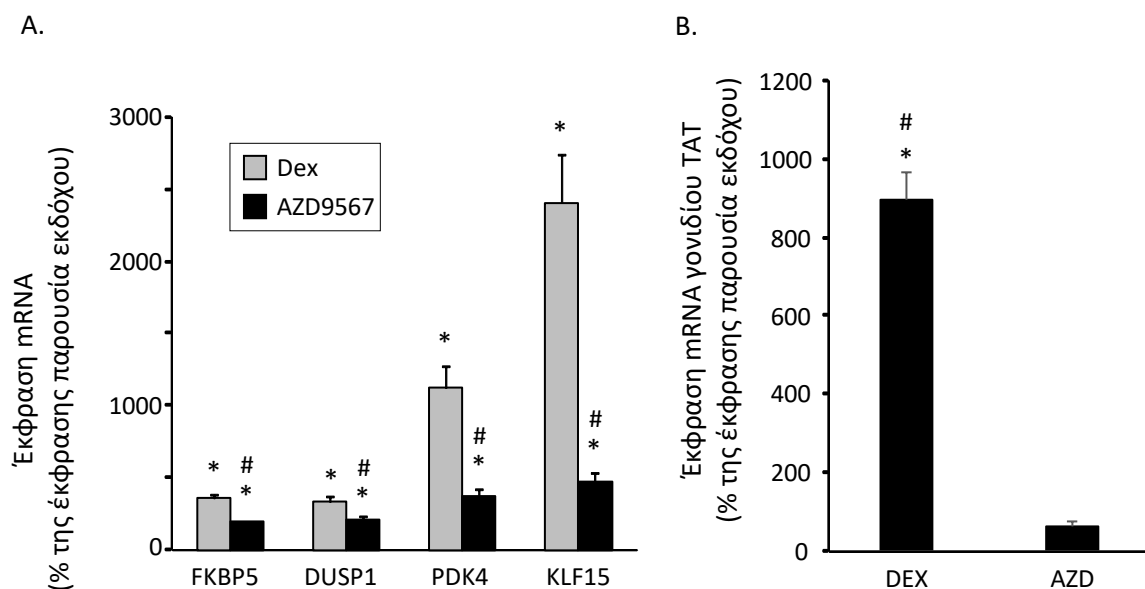
Εικόνα 24. Η ένωση AZD9567 οδηγεί σε μετατόπιση του GR στον πυρήνα. HeLa B2 κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό ελεύθερο στεροειδών και επώαστηκαν με έκδοχο (0.1% DMSO), Dex (1 μ M), HC (1 μ M) ή AZD9567 (1 μ M) για 30 λεπτά. Ακολούθησε ανάλυση με έμμεσο ανοσοφθορισμό με χρήση του αντισώματος 10-26 έναντι του ανθρώπινου GR (Ab10-26), δευτερογενούς αντισώματος σημασμένου με Alexa Fluor® 555 και τελικά με τη χρωστική Hoechst 33346. Μεγέθυνση: x400.

2.3.2 Επίδραση της ένωσης AZD9567 στην έκφραση γονιδίων-στόχων του GR και του NF- κ B

Προκειμένου να ενισχυθούν και να επεκταθούν τα παραπάνω αποτελέσματά μας, μελετήθηκε η δράση της ένωσης AZD9567 στην επαγωγή της μεταγραφής ενδογενών GRE-εξαρτώμενων γονιδίων-στόχων του GR συγκριτικά με τη δράση της δεξαμεθαζόνης σε κύτταρα HeLa B2. Η Εικόνα 25 δείχνει ότι η ένωση AZD9567 επάγει τη μεταγραφή των

ενδογενών γονιδίων hFKBP52, hDUSP1, hPDK4 και hKLF15 στα κύτταρα HeLa B2 αλλά σε σημαντικά χαμηλότερο βαθμό σε σχέση με την επαγωγή παρουσία δεξαμεθαζόνης. Το ποσοστό επαγωγής από την AZD9567 σε σχέση με την επαγωγή από τη δεξαμεθαζόνη δεν είναι ίδιο για όλα τα γονίδια που ελέγχθηκαν και κυμαίνεται από 20% μέχρι 60%. Αποτελέσματα που δεν παρουσιάζονται εδώ έδειξαν μη επαγωγή των παραπάνω γονιδίων στα κύτταρα HeLa B2_GR KD (κύτταρα HeLa B2 που δεν εκφράζουν GR) επιβεβαιώνοντας ότι η ένωση AZD9567 δρα μέσω του GR. Η Εικόνα 25A επιβεβαιώνει τη μερική αγωνιστική δράση της AZD9567 στα κύτταρα HeLa B2. Τα αποτελέσματά μας φαίνεται να έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες που είχαν δείξει ότι η AZD9567 δεν επάγει την έκφραση του γονιδίου της αμινοτρανσφεράσης της τυροσίνης (TAT) σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα [Ripa et al., 2018]. Μελέτη όμως της επίδρασης της ένωσης AZD9567 στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της TAT σε κύτταρα HepG2 (ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος) έδειξε ότι η AZD9567 δεν επάγει την έκφραση της TAT ενώ η δεξαμεθαζόνη οδήγησε στην αναμενόμενη επαγωγή της (Εικόνα 25B). Τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι η δράση της ένωσης AZD9567 είναι ειδική για κάθε γονίδιο και/ή τύπο κυττάρου.

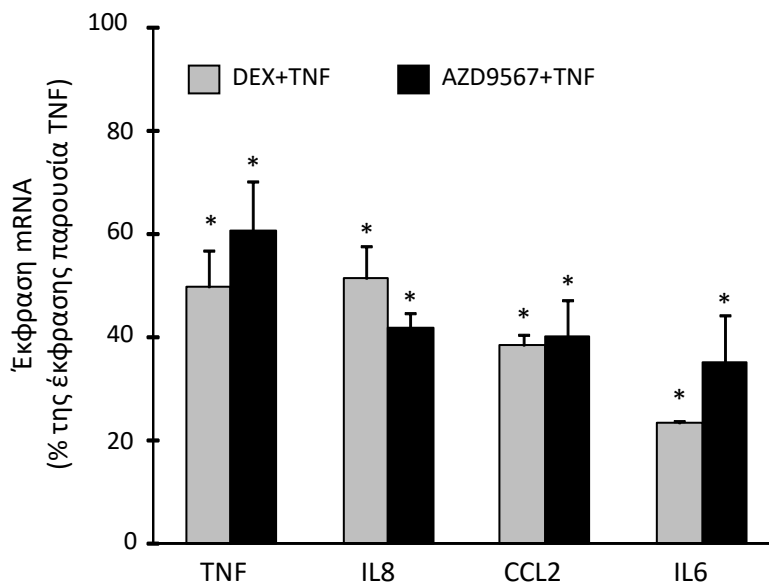
Παράλληλα, μελετήθηκε η ικανότητα της ένωσης AZD9567 να καταστέλλει την ενεργότητα του NF-κΒ και συγκεκριμένα να καταστέλλει την επαγωγή από τον TNF (ενεργοποιητής του NF-κΒ) της έκφρασης γονιδίων με (προ)φλεγμονώδη δράση. Η έκφραση των γονιδίων hTNF, hIL8, hCCL2 και hIL6 προσδιορίστηκε μετά από επώαση των κυττάρων HeLa B2 με την ένωση AZD9567, τη δεξαμεθαζόνη ή το έκδοχο, παρουσία ή απουσία TNF. Η δεξαμεθαζόνη και η ένωση AZD9567 δεν είχαν καμία επίδραση στην έκφραση των γονιδίων που μελετήθηκαν απουσία του TNF (δεν παρουσιάζεται εδώ). Η Εικόνα 26 δείχνει ότι η ένωση AZD9567 καταστέλλει την επαγόμενη από τον TNF ενεργοποίηση προφλεγμονωδών γονιδίων-στόχων του NF-κΒ. Το ποσοστό της καταστολής δεν είναι το ίδιο για όλα τα γονίδια αλλά είναι παρόμοιο με αυτό που προκαλείται από τη δεξαμεθαζόνη (δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους).



Εικόνα 25. (A) Η ένωση AZD9567 οδηγεί σε μικρότερη ενεργοποίηση της μεταγραφής GRE-εξαρτώμενων γονιδίων σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη σε κύτταρα HeLa B2. Κύτταρα HeLa B2 καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό ελεύθερο στεροειδών και στη συνέχεια επώαστηκαν με το έκδοχο (DMSO), δεξαμεθαζόνη (Dex, 1 μ M) ή AZD9567 (1 μ M) για 1 ώρα. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτών προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 11, κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης της GAPDH και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης κάθε γονιδίου παρουσία DMSO. * $p < 0.05$ σε σχέση με την επίδραση του εκδόχου και # $p < 0.05$ σε σχέση με την επίδραση της Dex. (B) Η ένωση AZD9567 δεν ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου της TAT (tyrosine aminotransferase) σε ηπατοκύτταρα. Κύτταρα HepG2 καλλιεργήθηκαν και επώαστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της TAT προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω (A). * $p < 0.05$ σε σχέση με την επίδραση του εκδόχου, # $p < 0.05$ σε σχέση με την επίδραση της Dex.

Η βιολογική αποτίμηση της ένωσης AZD9567 στα κύτταρα HeLa B2 έδειξε ότι επάγει τη μεταγραφή GRE-εξαρτώμενων γονιδίων σε βαθμό πολύ χαμηλότερο από αυτόν της δεξαμεθαζόνης ενώ καταστέλλει την TNF-εξαρτώμενη επαγωγή προφλεγμονωδών γονιδίων-στόχων του NF- κ B σε βαθμό παρόμοιο με αυτόν της δεξαμεθαζόνης, δηλώνοντας έτσι την επιλεκτική αντιφλεγμονώδη δράση της.

Παράλληλα, ανάλογα πειράματα έγιναν και σε κύτταρα RAW 264.7, μακροφάγα κύτταρα ποντικού που αποτελούν γνωστό κυτταρικό μοντέλο μελέτης της φλεγμονής προκειμένου να διερευνησουμε παραπέρα την επιλεκτική αντιφλεγμονώδη δράση της ένωσης AZD9567. Σημειώνεται ότι η πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης σε μακροφάγα κύτταρα με επίδραση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) είναι κατάλληλο σύστημα για τη μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης των αγωνιστών του GR.

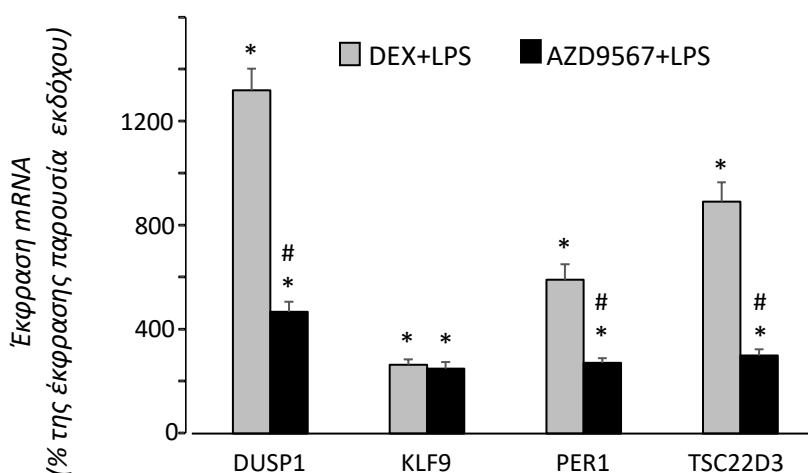


Εικόνα 26. Η ένωση AZD9567 οδηγεί σε καταστολή της επαγόμενης από τον TNF ενεργοποίησης προφλεγμονωδών γονιδίων-στόχων του NFKB. Κύτταρα HeLa B2 καλλιιεργήθηκαν για 48 ώρες σε υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% ορό ελεύθερο στεροειδών και στη συνέχεια και επώαστηκαν με το έκδοχο (DMSO), δεξαμεθαζόνη (Dex, 1 μM) ή AZD9567 (1 μM) για 3 ώρες και στη συνέχεια για 1 επιπλέον ώρα παρουσία ή απουσία 10 ng/ml TNF. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που δηλώνονται προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 11 και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης κάθε γονιδίου παρουσία TNF. * $p < 0.05$ σε σχέση με την επίδραση μόνο του TNF.

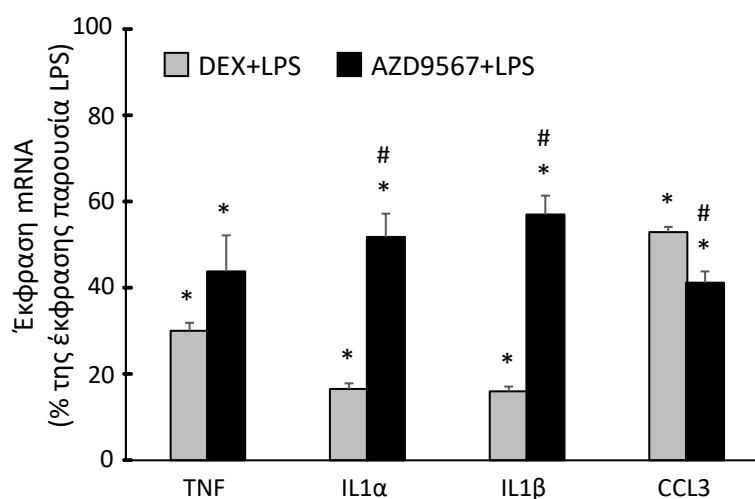
Η Εικόνα 27 δείχνει ότι η ένωση AZD9567 οδηγεί σε διαφορετικού βαθμού επαγωγή της μεταγραφής ενδογενών GRE-εξαρτώμενων γονιδίων-στόχων του GR. Η επαγωγή του γονιδίου mKLF9 ήταν παρόμοια με την επαγωγή από τη δεξαμεθαζόνη αλλά χαμηλή και στις δύο περιπτώσεις. Η επαγωγή όμως των γονιδίων mTSC22D3, mPER1 και mDUSP1 από την AZD9567 ήταν σημαντικά χαμηλότερη από την επαγωγή παρουσία δεξαμεθαζόνης. Το ποσοστό επαγωγής από την AZD9567 σε σχέση με την επαγωγή από τη δεξαμεθαζόνη ήταν 34%, 36% και 46% για τα γονίδια mTSC22D3, mPER1 και mDUSP1, αντίστοιχα, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα στα κύτταρα HeLa B2 και επιβεβαιώνοντας την περιορισμένη επαγωγική αγωνιστική δράση της ένωσης AZD9567.

Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα της ένωσης AZD9567 να καταστέλλει την ενεργότητα του NF-κB και συγκεκριμένα να καταστέλλει την επαγωγή από το LPS της έκφρασης γονιδίων με (προ)φλεγμονώδη δράση. Η έκφραση των γονιδίων προσδιορίστηκε μετά από επώαση των κυττάρων RAW 264.7 με την ένωση AZD9567, τη δεξαμεθαζόνη ή το έκδοχο, παρουσία ή απουσία LPS. Η καταστολή της επαγωγής του γονιδίου mTNF από την AZD9567 είναι ίδια με

την καταστολή από τη δεξαμεθαζόνη ενώ η καταστολή του γονιδίου mCCL3 είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή της δεξαμεθαζόνης (Εικόνα 28). Αντίθετα, η καταστολή των γονιδίων mIL1a και mIL1b είναι σημαντικά χαμηλότερη από αυτή της δεξαμεθαζόνης.



Εικόνα 27. Η ένωση AZD9567 οδηγεί σε περιορισμένη ενεργοποίηση της μεταγραφής GRE-εξαρτώμενων γονιδίων σε μακροφάγα. Κύτταρα RAW264.7 καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε υλικό alpha MEM εμπλουτισμένο με 10% ορό ελεύθερο στεροειδών και στη συνέχεια επώαστηκαν με το έκδοχο (DMSO), δεξαμεθαζόνη (Dex, 1 μ M) ή AZD9567 (1 μ M) για 1 ώρα. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που δηλώνονται προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 11 και παρουσιάζονται ως % της έκφρασης κάθε γονιδίου παρουσία DMSO. * $p < 0.05$ σε σχέση με την επίδραση του εκδόχου, # $p < 0.05$ vs σε σχέση με την επίδραση της Dex.



Εικόνα 28. Η ένωση AZD9567 οδηγεί σε καταστολή της επαγόμενης από τον TNF ενεργοποίησης προφλεγμονωδών γονιδίων-στόχων του NF- κ B σε μακροφάγα. Κύτταρα RAW264.7 καλλιεργήθηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 24 και επώαστηκαν με το έκδοχο (DMSO), δεξαμεθαζόνη (Dex, 1 μ M) ή AZD9567 (1 μ M) παρουσία ή απουσία LPS (10 ng/ml) για 1 ώρα. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που δηλώνονται προσδιορίστηκαν όπως περιγράφεται στην Εικόνα 11 και παρουσιάζονται ως % της

έκφρασης κάθε γονιδίου παρουσία LPS. * $p < 0.05$ σε σχέση με την επίδραση μόνο του LPS, # $p < 0.05$ σε σχέση με την επίδραση του συνδυασμού Dex+ LPS.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την ισχυρή κατασταλτική αγωνιστική δράση της ένωσης AZD9567 επί γονιδίων-στόχων του NF- κ B σε αντιδιαστολή με την περιορισμένη επαγωγική αγωνιστική δράση της ένωσης επί των GRE-εξαρτώμενων γονιδίων, επιβεβαιώνοντας την επιλεκτική αγωνιστική δράση της ένωσης AZD9567.

2.3.3 Μεταγραφομικό προφίλ του μη στεροειδούς επιλεκτικού αγωνιστή του GR AZD9567 σε σύγκριση με το προφίλ της δεξαμεθαζόνης.

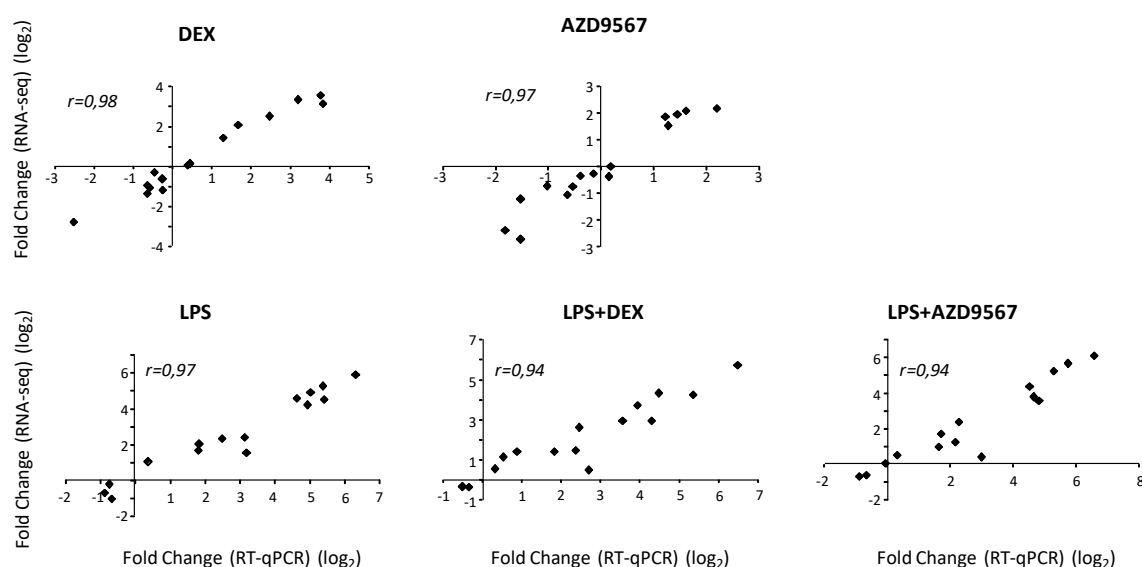
Προκειμένου να μελετηθούν οι μηχανισμοί δράσης της ένωσης AZD9567, ταυτοποιήθηκε το ολικό μεταγραφικό προφίλ της ένωσης, σε σύγκριση με αυτό της δεξαμεθαζόνης, σε μακροφάγα κύτταρα RAW264.7 μετά από επώαση με δεξαμεθαζόνη ή AZD9567, με και χωρίς πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης με LPS, με τη χρήση της τεχνολογίας του RNA-sequencing (RNA-αλληλούχιση). Ανάλυση των αποτελεσμάτων οδήγησε στην ταυτοποίηση των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων, σε σχέση με το έκδοχο, ο αριθμός των οποίων παρουσιάζεται στον Πίνακα 4. Τα αποτελέσματα της RNA-αλληλούχισης επιβεβαιώθηκαν με προσδιορισμό των επιπέδων του mRNA (μετά από αντίστροφη μεταγραφή και real time PCR) για 15 τυχαία επιλεγμένα ρυθμιζόμενα γονίδια. Η Εικόνα 29 δείχνει ισχυρή συσχέτιση των σχετικών επιπέδων έκφρασης όπως προκύπτουν από τις δύο μεθοδολογίες.

Πίνακας 4. Ο αριθμός των διαφορετικά ρυθμιζόμενων γονιδίων (επάγονται ή καταστέλλονται) σε κύτταρα RAW264.7 που επώαστηκαν με το έκδοχο (DMSO), δεξαμεθαζόνη (DEX 1 μ M) ή AZD9567 (1 μ M) παρουσία ή απουσία LPS (10ng/ml) για 1 ώρα (FDR<0.1 & abs log₂FC>0.5).

Επίδραση	Διαφορικά Εκφρασμένα Γονίδια		
	Σύνολο	Επαγωγή	Καταστολή
DEX	247	164	83
AZD9567	1278	529	749
LPS	2095	1113	982
DEX+LPS	2708	1385	1323
AZD9567+LPS	2153	1071	1082

2.3.3.1. Μεταγραφομικό προφίλ του μη στεροειδούς επιλεκτικού αγωνιστή του GR AZD9567 σε σύγκριση με το προφίλ της δεξαμεθαζόνης απουσία φλεγμονώδους απόκρισης

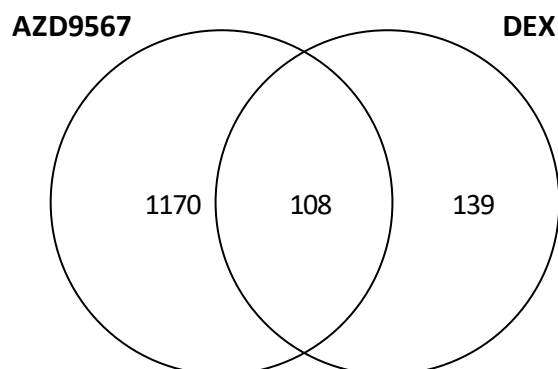
Σύγκριση του αριθμού των γονιδίων που ρυθμίζονται από την AZD9567 και τη δεξαμεθαζόνη (Πίνακας 4) έδειξε ότι, απουσία φλεγμονώδους υποβάθρου, η AZD9567 ρυθμίζει πολύ μεγαλύτερο αριθμό γονιδίων (5 φορές περισσότερα γονίδια) από τη δεξαμεθαζόνη. Το 66% των γονιδίων που ρυθμίζονται από τη δεξαμεθαζόνη επάγονται ενώ το 34% καταστέλλονται. Αντίθετα, η AZD9567 επάγει το 41% και καταστέλλει το 59% των γονιδίων που αυτή ρυθμίζει. Επιπλέον, μόνο το 8.5% των γονιδίων που ρυθμίζονται από το AZD9567 ρυθμίζονται και από τη δεξαμεθαζόνη (Εικόνα 30), δηλώνοντας ότι το μεταγραφικό προφίλ της AZD9567 είναι διαφορετικό από αυτό της δεξαμεθαζόνης.



Εικόνα 29. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του mRNA όπως προσδιορίστηκε με βάση την RNA-αλληλούχιση και real time PCR για 15 τυχαία επιλεγμένα γονίδια (BTG2, CCL2, CCL3, DUSP1, DUSP4, HTR2A, IL10, KLF4, KLF9, NFKBID, PER1, TNF, TNFAIP3, TSC22D3, ZFP36) που ρυθμίζονται από DEX, AZD9568, LSP, LPS+DEX και LPS+ASZ9567, όπως δηλώνεται. Οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA εκφράζονται ως βαθμός μεταβολής της έκφρασης σε κάθε περίπτωση σε σχέση με το έκδοχο (σε λογαριθμική κλίμακα). *r*, Pearson correlation.

Προκειμένου να ταυτοποιηθούν γονίδια με πιθανά κεντρικό ρόλο στην απόκριση των κυττάρων στη δεξαμεθαζόνη και στην ένωση AZD9567, πραγματοποιήθηκε τοπολογική ανάλυση αξιοποιώντας το BioInfoMiner (Koutsandreas et al, 2016), όπου χρησιμοποιούνται σημασιολογικές πληροφορίες για την ιεράρχηση των γονιδίων με βάση την κεντρική τους θέση σε δίκτυα γνώσης, όπως αυτό της Gene Ontology (GO). Αυτή η ανάλυση κατέληξε σε μια σύντομη λίστα γονιδίων που αναφέρονται ως κομβικά γονίδια τα οποία

αντιπροσωπεύουν πιθανούς κύριους ρυθμιστές της κυτταρικής απόκρισης στη δεξαμεθαζόνη και στην ένωση AZD9567 (Πίνακας 5 και Πίνακας 6, αντίστοιχα).



Εικόνα 30. Το μεταγραφομικό προφίλ της ένωσης AZD9567 διαφέρει από αυτό της δεξαμεθαζόνης. Το διάγραμμα Venn δείχνει τα κοινά και τα μοναδικά γονίδια που ρυθμίζονται από τη δεξαμεθαζόνη και την AZD9567.

Πίνακας 5. Κομβικά γονίδια για το σύνολο των γονιδίων που εκφράζονται διαφορετικά σε κύτταρα RAW264.7 παρουσία δεξαμεθαζόνης.

Κομβικά γονίδια που ρυθμίζονται παρουσία δεξαμεθαζόνης					
Rank	Gene Symbol	Definition	Systemic Processes	Fold Change	Pvalue
1	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	15	-1.67	0.008
2	Tnf	tumor necrosis factor	13	-2.76	2.22e-18
3	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	12	-1.17	0.0000326
4	Egr1	early growth response 1	11	-1.69	1.09e-13
5	Zfp36l1	zinc finger protein 36, C3H type-like 1	9	0.75	0.085
6	Zc3h12a	zinc finger CCCH type containing 12A	9	1.42	3.26e-11
7	Klf4	Kruppel-like factor 4 (gut)	8	3.13	2.22e-18
8	Fosl1	fos-like antigen 1	8	-0.99	0.078
9	Pik3r1	phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1	8	0.5	0.006
10	Irf1	interferon regulatory factor 1	7	-0.96	3.58e-7
11	Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	7	0.59	0.00021
12	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha		0.58	0.0000636

13	Adm	adrenomedullin	7	3.54	0.01
14	Junb	jun B proto-oncogene	7	-1.32	1.24e-11
15	Dusp1	dual specificity phosphatase 1	7	3.59	1.73e-19
16	Adrb2	adrenergic receptor, beta 2	7	1.01	4.52e-8
17	Rapgef2	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	7	0.62	0.0000339
18	Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	6	-0.61	0.011
19	Zfp36	zinc finger protein 36	6	-0.94	1.49e-8
20	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2	6	-0.8	7.21e-7

Πίνακας 6. Κομβικά γονίδια για το σύνολο των γονιδίων που εκφράζονται διαφορετικά σε κύτταρα RAW264.7 παρουσία της ένωσης AZD9567.

Κομβικά γονίδια που ρυθμίζονται παρουσία της ένωσης AZD9567					
Rank	Gene Symbol	Definition	Systemic Processes	Fold Change	Pvalue
1	Pycard	PYD and CARD domain containing	17	1.64	0.002
2	Tnf	tumor necrosis factor	17	-2.36	9.32e-17
3	Tlr4	toll-like receptor 4	16	-0.56	0.000169
4	Tlr9	toll-like receptor 9	16	-0.54	0.003
5	Tlr2	toll-like receptor 2	15	-0.5	0.000233
6	Nod2	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2	14	-0.54	0.024
7	Fcer1g	Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide	13	-0.56	0.0000643
8	Tlr3	toll-like receptor 3	13	-0.68	0.000357
9	Aif1	allograft inflammatory factor 1	12	-1.36	7.05e-10
10	Anxa1	annexin A1	12	-0.54	0.0000549
11	Gata3	GATA binding protein 3	12	-0.85	0.005
12	Jun	jun proto-oncogene	12	-0.57	0.0000302
13	Casp1	caspase 1	12	-0.76	2.08e-8
14	Tnfaip3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	11	-1.05	3,00E-09
15	Irf1	interferon regulatory factor 1	11	-0.73	0.0000162
16	Ptger4	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	11	-0.64	0.00035

17	Nlrp3	NLR family, pyrin domain containing 3	11	-0.73	1.07e-7
18	Cx3cr1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	10	0.62	0.000274
19	Relb	avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B	10	-0.64	0.0000347
20	Igf1	insulin-like growth factor 1	10	-0.84	2.12e-10
21	Cd24a	CD24a antigen	10	0.75	0.047
22	Gas6	growth arrest specific 6	10	-1.14	2.81e-12
23	Lgals9	lectin, galactose binding, soluble 9	10	-1.35	7.07e-11
24	Tlr6	toll-like receptor 6	10	-0.55	0.001
25	Tlr8	toll-like receptor 8	10	-0.8	1.3e-8
26	Il15	interleukin 15	10	-0.66	0.038
27	Egr1	early growth response 1	10	0.7	4,00E-07
28	Src	Rous sarcoma oncogene	9	-1.14	1.15e-9
29	Icam1	intercellular adhesion molecule 1	9	-0.7	1.64e-7
30	Slc11a1	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	9	-0.84	3,00E-10
31	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	9	-1.84	0.000985
32	Cd74	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)	9	0.52	0.0000245
33	Il10	interleukin 10	9	-2.7	0.00000343
34	Myc	myelocytomatosis oncogene	9	-2.32	9.25e-9
35	Sbno2	strawberry notch 2	9	-0.62	6.6e-7
36	Irgm2	immunity-related GTPase family M member 2	9	-0.92	0.0000492
37	Dusp10	dual specificity phosphatase 10	7	0.57	0.073
38	Shmt2	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	5	1.16	1.46e-13
39	Timeless	timeless circadian clock 1	5	0.62	0.000245
40	Cdc6	cell division cycle 6	3	0.5	0.003

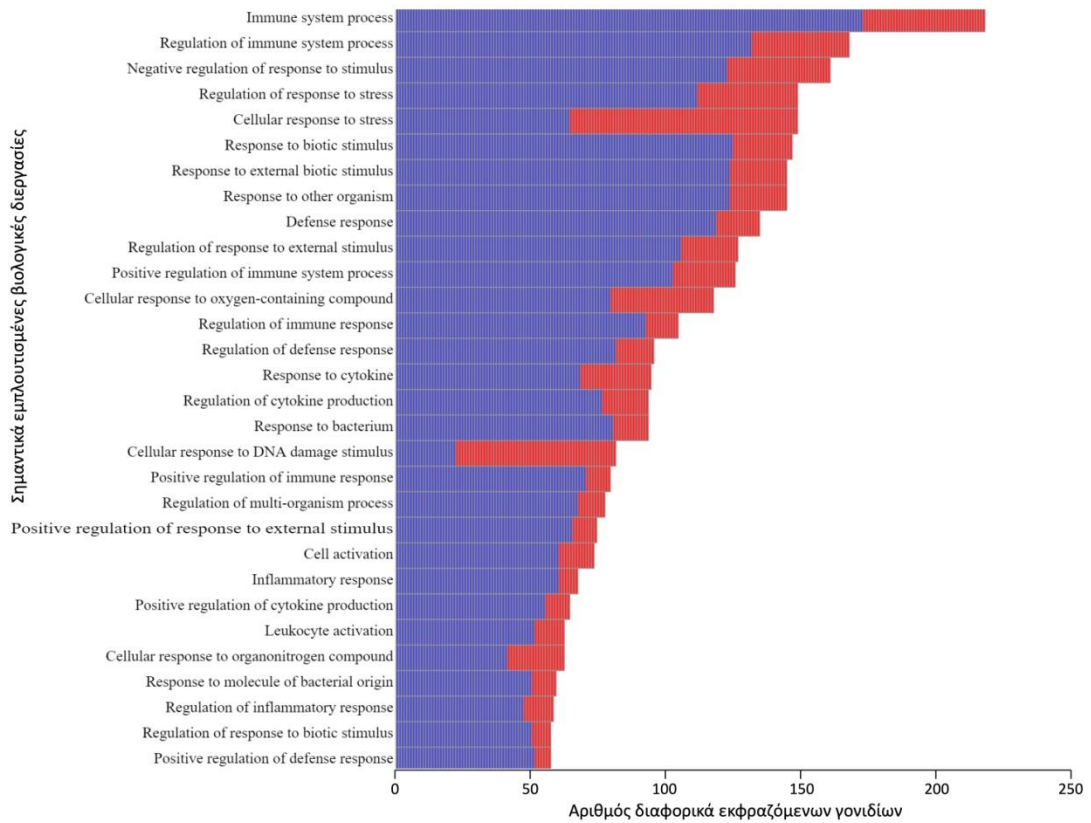
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε λειτουργική ανάλυση, βασισμένη στον εμπλουτισμό των βιολογικών διεργασιών της Gene Ontology (GO) για κάθε σύνολο διαφορεικά εκφραζόμενων

γονιδίων. Οι κορυφαίες 30 -ως προς τον αριθμό των σχετικών γονιδίων- στατιστικά σημαντικές βιολογικές διεργασίες που εντοπίστηκαν για τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια παρουσία της ένωσης AZD9567 ή της δεξαμεθαζόνης παρουσιάζονται στις Εικόνες 31 και 32, αντίστοιχα. Οι πλήρεις λίστες των εμπλουτισμένων βιολογικών διεργασιών της GO παρουσιάζονται στους Συμπληρωματικούς Πίνακες ΣΠ1 και ΣΠ2, αντίστοιχα. Σύγκριση των βιολογικών διεργασιών που ρυθμίζονται από τη δεξαμεθαζόνη και την ένωση AZD9567 και ανάλυση των όρων της GO που συμπεριλαμβάνουν ανέδειξε ομοιότητες αλλά και διαφορές (Πίνακας 7 και Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ3). Τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση των επιλεγμένων βιολογικών διεργασιών του Πίνακα 7 παρουσιάζονται στους Συμπληρωματικούς Πίνακες ΣΠ4 έως ΣΠ14. Συγκεκριμένα, αναδείχθηκαν διεργασίες που ταυτοποιούνται:

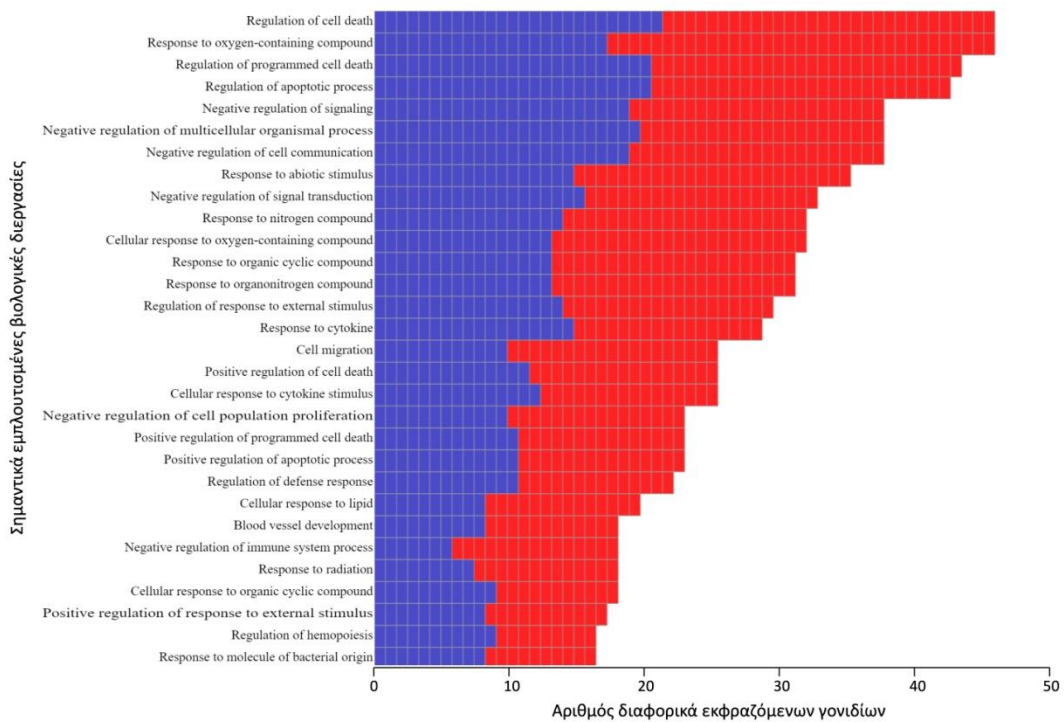
- αποκλειστικά παρουσία δεξαμεθαζόνης, όπως η ανταπόκριση στα γλυκοκορτικοειδή και η διαφοροποίηση των λιποκυττάρων
- κυρίως παρουσία δεξαμεθαζόνης, όπως ο κυτταρικός θάνατος
- παρουσία δεξαμεθαζόνης και της ένωσης AZD9567, όπως ο κικκάδιος ρυθμός, η ανταπόκριση στο LPS, η πρόσφυση λευκοκυττάρων, η διαφοροποίηση λευκοκυττάρων και η φλεγμονώδης απόκριση
- κυρίως παρουσία της ένωσης AZD9567, όπως η ρύθμιση παραγωγής κυτοκινών και η απόκριση άμυνας*
- αποκλειστικά παρουσία της ένωσης AZD9567, όπως η ανοσολογική απόκριση.

Τα παραπάνω προτείνουν ότι η ένωση AZD9567 διαμεσολαβεί κάποιες από τις κλασικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών (ρύθμιση κικκάδιου ρυθμού, διαφοροποίηση-πρόσφυση λευκοκυττάρων και απόκριση στη φλεγμονή) αλλά επιπλέον διαμεσολαβεί και διαφορετικές δράσεις που σχετίζονται με την παραγωγή κυτοκινών, την απόκριση άμυνας και την ανοσολογική απόκριση.

* Αντιδράσεις, που προκαλούνται ως απάντηση στην παρουσία ξένου σώματος ή στην εμφάνιση τραυματισμού, και που έχουν ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της βλάβης στον οργανισμό που έχει προσβληθεί ή την πρόληψη/ανάρρωση από τη μόλυνση που προκλήθηκε από την επίθεση



Εικόνα 31. Λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού των βιολογικών διεργασιών της Gene Ontology για το σύνολο των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων παρουσία της ένωσης AZD9567. Οι κορυφαίες 30 -ως προς τον αριθμό των σχετικών γονιδίων- στατιστικά σημαντικές εμπλουτισμένες βιολογικές διεργασίες παρουσιάζονται μαζί με τον αριθμό των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτές. Τα γονίδια που καταστέλλονται και επάγονται δηλώνονται με μπλε και κόκκινο, αντίστοιχα.



Εικόνα 32. Λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού των βιολογικών διεργασιών της Gene Ontology για το σύνολο των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων παρουσία δεξαμεθαζόνης. Οι κορυφαίες 30 -ως προς τον αριθμό των σχετικών γονιδίων- στατιστικά σημαντικές εμπλουτισμένες βιολογικές διεργασίες παρουσιάζονται μαζί με τον αριθμό των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτές. Τα γονίδια που καταστέλλονται και επάγονται δηλώνονται με μπλε και κόκκινο, αντίστοιχα.

Πίνακας 7. Βιολογικές διεργασίες που ρυθμίζονται από τη δεξαμεθαζόνη και την ένωση AZD9567 σε κύτταρα RAW264.7 και ο αντίστοιχος αριθμός των σχετικών διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων.

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ	ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	
	DEX	AZD9567
RESPONSE TO GLUCOCORTICOIDS	13	
FAT CELL DIFFERENTIATION	20	
CELL DEATH	56	9
CIRCADIAN RHYTHM	16	26
RESPONSE TO LPS	18	56
LEUKOCYTE CELL ADHESION	15	40
LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	26	74
INFLAMMATORY RESPONSE	33	99
REGULATION OF CYTOKINE PRODUCTION	8	103
DEFENCE RESPONSE	27	169
IMMUNE RESPONSE		251

Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα 108 γονίδια που ρυθμίζονται τόσο από τη δεξαμεθαζόνη όσο και από την ένωση AZD9567 (Εικόνα 30). Σύγκριση του προφίλ διαφορικής έκφρασης των γονιδίων έδειξε ότι 35 από αυτά επάγονται από τη δεξαμεθαζόνη και την ένωση AZD9567, 22 επάγονται από τη δεξαμεθαζόνη και καταστέλλονται από την ένωση AZD9567, 5 καταστέλλονται από τη δεξαμεθαζόνη και επάγονται από την ένωση AZD9567 και 46 καταστέλλονται από τη δεξαμεθαζόνη και την ένωση AZD9567. Σύγκριση του βαθμού επαγωγής των 35 γονιδίων μεταξύ των δύο κατεργασιών έδειξε μεγαλύτερο βαθμό επαγωγής από τη δεξαμεθαζόνη σε σχέση την ένωση AZD9567 για την πλειοψηφία των επαγόμενων γονιδίων (89%, 31 από τα 35, Πίνακας 8). Αντίθετα, ο βαθμός καταστολής των 46 γονιδίων από τη δεξαμεθαζόνη ήταν μικρότερος από αυτόν της ένωσης AZD9567 για την πλειοψηφία των καταστέλλομενων γονιδίων (67%, 31 από τα 46, Πίνακας 9). Τα παραπάνω είναι σε συμφωνία με το μεγαλύτερο ποσοστό γονιδίων που καταστέλλονται από την ένωση AZD9567 σε σχέση με τη δεξαμεθαζόνη (Πίνακας 4) και δηλώνουν ένα διαφορετικό μεταγραφομικό προφίλ της AZD9567 σε σχέση με αυτό της δεξαμεθαζόνης ακόμα και για τα κοινά γονίδια.

Πίνακας 8. Γονίδια που επάγονται από τη δεξαμεθαζόνη και την ένωση AZD9567. Τα γονίδια για τα οποία ο βαθμός επαγωγής (FC, fold change) από την DEX είναι μικρότερος από αυτόν της ένωσης AZD9567 δηλώνονται με έντονα γράμματα.

Γονίδια που επάγονται από DEX και AZD9567					
Γονίδιο	DEX_FC	AZD_FC	Γονίδιο	DEX_FC	AZD_FC
Net1	1,45	1,42	Jdp2	2,51	2,15
Nectin1	1,57	1,48	Arc	2,54	1,99
Ddx43	1,63	1,52	Klf9	2,74	3,66
Bc1	1,65	2,19	Fkbp5	2,89	1,76
Olfml3	1,66	1,63	Nfil3	3,03	2,18
Inafm1	1,69	1,51	Dpep3	3,04	2,83
Arrdc3	1,80	1,49	Nr4a1	3,59	1,89
Cited2	1,91	2,99	Sik1	4,20	3,92
Dnajb13	2,09	1,58	Cytip	4,40	2,15
Spsb1	2,09	1,70	Il15ra	4,75	1,63
4933431G14Rik	2,11	1,83	Per1	5,76	3,88
Zfp69	2,11	1,67	Klf4	8,78	2,90
Klf13	2,13	2,01	Serpine1	9,33	2,73
Usp2	2,13	1,60	Tsc22d3	10,30	4,29
Dclre1b	2,16	1,63	Dusp1	12,03	4,58
Bmf	2,17	1,48	Ddit4	20,12	6,85
Ciart	2,29	1,53	Abcg4	38,24	53,49
Chka	2,32	2,00			

Πίνακας 9. Γονίδια που καταστέλλονται από τη δεξαμεθαζόνη και την ένωση AZD9567. Τα γονίδια για τα οποία ο βαθμός καταστολής (FC, fold change) από την AZD9567 είναι μικρότερος από αυτόν της DEX δηλώνονται με έντονα γράμματα.

Γονίδια που καταστέλλονται από DEX και AZD9567					
Γονίδιο	DEX_FC	AZD_FC	Γονίδιο	DEX_FC	AZD_FC
Tnf	0,15	0,19	Tgif1	0,59	0,60
Egr2	0,19	0,46	Gpr84	0,59	0,39
Ier3	0,26	0,55	Traf1	0,61	0,53
Cxcl2	0,28	0,26	Bhlhe41	0,61	0,47
Ptgs2	0,31	0,28	Pde4b	0,62	0,36
A930011G23Rik	0,39	0,31	Cd83	0,62	0,57
Plau	0,40	0,37	Dusp5	0,63	0,61

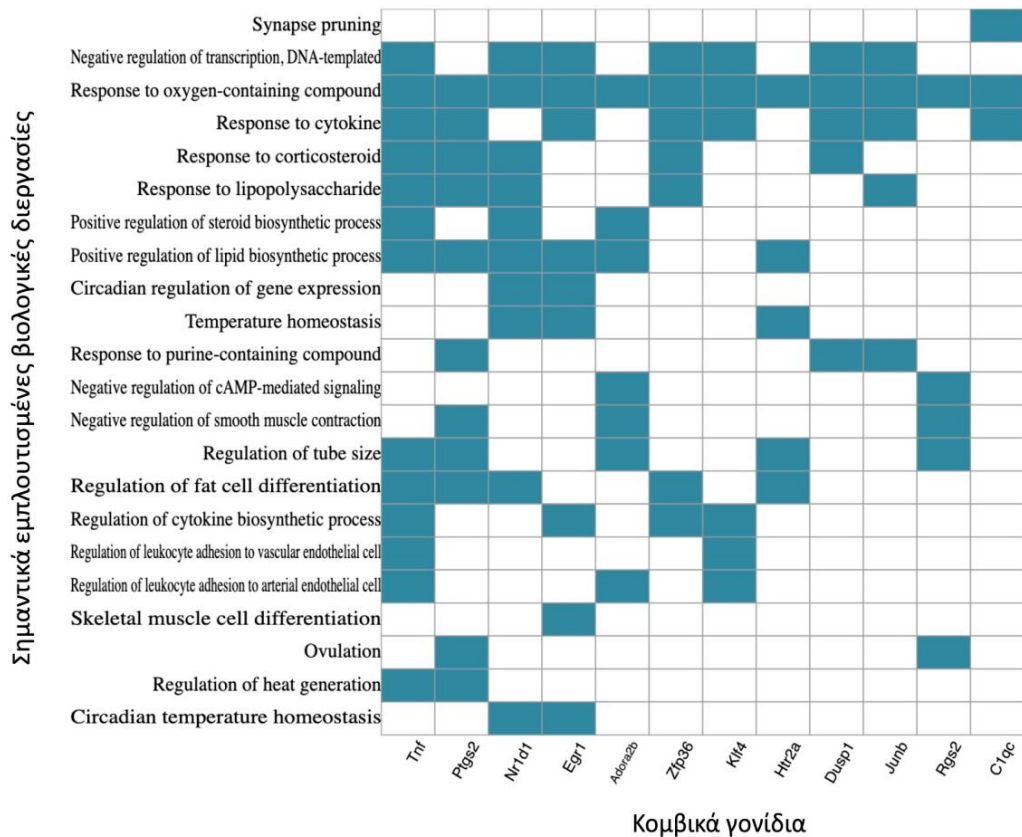
Junb	0,40	0,66	Psd	0,63	0,61
Tnfsf9	0,48	0,64	Nfkbie	0,65	0,44
Zfp503	0,48	0,48	Irak2	0,65	0,68
Bhlhe40	0,50	0,63	Nr1d1	0,65	0,48
Fosl1	0,50	0,51	Plaur	0,67	0,68
Cdc42ep2	0,51	0,30	Cass4	0,67	0,60
Irf1	0,51	0,60	ATP6	0,67	0,59
Zfp36	0,52	0,60	Icam1	0,68	0,61
Plk2	0,56	0,30	Zfand2a	0,68	0,60
Adamts1	0,56	0,31	Ptpre	0,69	0,42
Adora2b	0,57	0,63	Nrros	0,69	0,58
Rgs2	0,58	0,61	Plekho2	0,70	0,70
Osm	0,58	0,25	Etv3	0,70	0,64
COX3	0,58	0,57	Klf10	0,70	0,62
Nupr1	0,58	0,64	Bcl6	0,70	0,60
Bcl3	0,58	0,45	Ralgds	0,71	0,65

Επιπλέον, για την ομάδα των 108 κοινών διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων ταυτοποιήθηκαν τα κομβικά γονίδια (Πίνακας 10) και έγινε λειτουργική ανάλυση βασισμένη στον εμπλουτισμό των βιολογικών διεργασιών της Gene Ontology (GO). Η ανάλυση αυτή ανέδειξε κυρίως κλασικές διεργασίες που ρυθμίζονται από τα γλυκοκορτικοειδή, όπως διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, η ρύθμιση του κερκάδιου ρυθμού, η ανταπόκριση στο LPS και η φλεγμονώδης απόκριση (Εικόνα 33).

Πίνακας 10. Κομβικά γονίδια για το σύνολο των 108 κοινών γονιδίων που εκφράζονται διαφορετικά σε κύτταρα RAW264.7 τόσο παρουσία δεξαμεθαζόνης όσο και της ένωσης AZD9567.

Rank	Gene Symbol	Definition	Systemic Processes
1	Tnf	tumor necrosis factor	13
2	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	11
3	Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	10
4	Egr1	early growth response 1	9
5	Adora2b	adenosine A2b receptor	7
6	Zfp36	zinc finger protein 36	7
7	Klf4	Kruppel-like factor 4 (gut)	6

8	Htr2a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	5
9	Dusp1	dual specificity phosphatase 1	5
10	Junb	jun B proto-oncogene	5
11	Rgs2	regulator of G-protein signaling 2	5
12	C1qc	complement component 1, q subcomponent, C chain	3



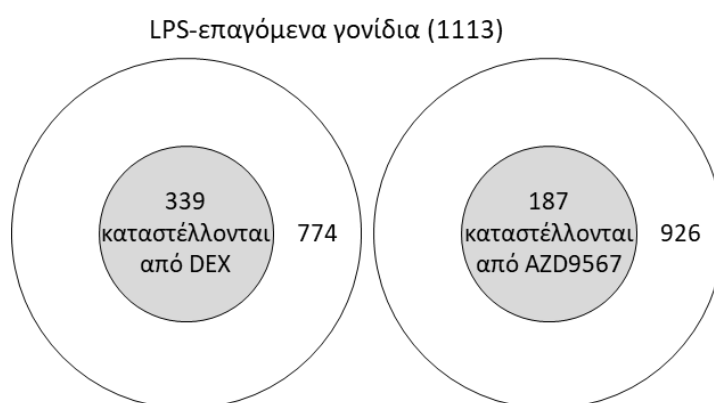
Εικόνα 33: Λειτουργική ανάλυση των 108 διαφορεικά εκφραζόμενων γονιδίων που ρυθμίζονται από τη δεξαμεθαζόνη και την ένωση AZD9567. Στο οριζόντιο άξονα παρουσιάζονται τα κομβικά γονίδια, και στον κάθετο οι κύριες βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν.

2.3.3.2 Μεταγραφικό προφίλ του μη στεροειδούς επιλεκτικού αγωνιστή του GR AZD9567 σε σύγκριση με το προφίλ της δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με την πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης

2.3.3.2.1 Δράση της ένωσης AZD9567 σε σύγκριση με τη δράση της δεξαμεθαζόνης στην καταστολή των γονιδίων που επάγονται από την πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης

Προκειμένου να μελετηθεί η αντιφλεγμονώδης δράση της ένωσης AZD9567, προσδιορίστηκαν τα γονίδια που επάγονται από την πρόκληση της φλεγμονώδους απόκρισης από το LPS και καταστέλλονται από την συγχορήγηση δεξαμεθαζόνης ή της

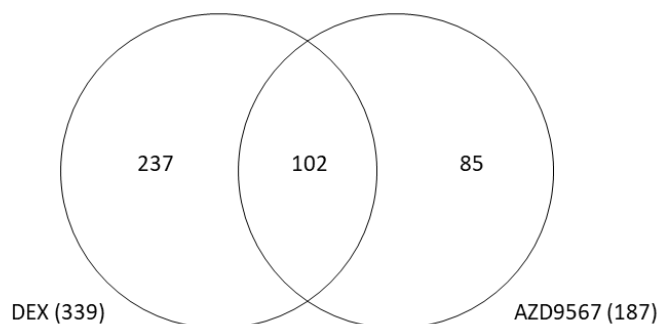
ένωσης AZD9567. Η Εικόνα 34 δείχνει ότι από τα 1113 γονίδια που επάγονται από το LPS, 339 γονίδια καταστέλλονται από την δεξαμεθαζόνη και 187 καταστέλλονται από την ένωση AZD9567. Ανάλυση των 339 και 187 γονιδίων ανέδειξε κομβικά γονίδια που επάγονται από το LPS και καταστέλλονται είτε από τη δεξαμεθαζόνη είτε από την AZD9567 (Συμπληρωματικοί Πίνακες ΣΠ15 και ΣΠ16). Οι σημαντικές βιολογικές διεργασίες που αναδείχθηκαν από τη λειτουργική ανάλυση με βάση τον εμπλουτισμό των βιολογικών διεργασιών της Gene Ontology εμπλέκονται κυρίως στη φλεγμονώδη απόκριση και στην ανοσοαπόκριση (Συμπληρωματικοί Πίνακες ΣΠ17 και ΣΠ18).



Εικόνα 34. Τα διαγράμματα Venn δείχνουν τα γονίδια που επάγονται από το LPS και καταστέλλονται από τη συγχορήγηση δεξαμεθαζόνης (DEX) ή της ένωσης AZD9567.

Σύγκριση των 339 και 187 γονιδίων ταυτοποίησε 102 γονίδια που επάγονται από το LPS και καταστέλλονται τόσο από τη συγχορήγηση δεξαμεθαζόνης όσο και της ένωσης AZD9567 (Εικόνα 35). Ανάλυση των 102 γονιδίων ανέδειξε 13 κομβικά γονίδια με σημαντικό ρόλο στη φλεγμονώδη απόκριση (Πίνακας 11 και Εικόνα 36A). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, οι σημαντικές βιολογικές διεργασίες που αναδείχθηκαν από τη λειτουργική ανάλυση με βάση τον εμπλουτισμό των βιολογικών διεργασιών της Gene Ontology εμπλέκονται κυρίως στη φλεγμονώδη αντίδραση (Εικόνα 36B και Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ19). Τα παραπάνω στηρίζουν την ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση της ένωσης AZD9567 στα κύτταρα RAW 264.7 και δείχνουν ότι η αντιφλεγμονώδης δράση της ένωσης AZD9567 διαμεσολαβείται από τους ίδιους κύριους μηχανισμούς που εμπλέκονται και στην αντιφλεγμονώδη δράση της δεξαμεθαζόνης.

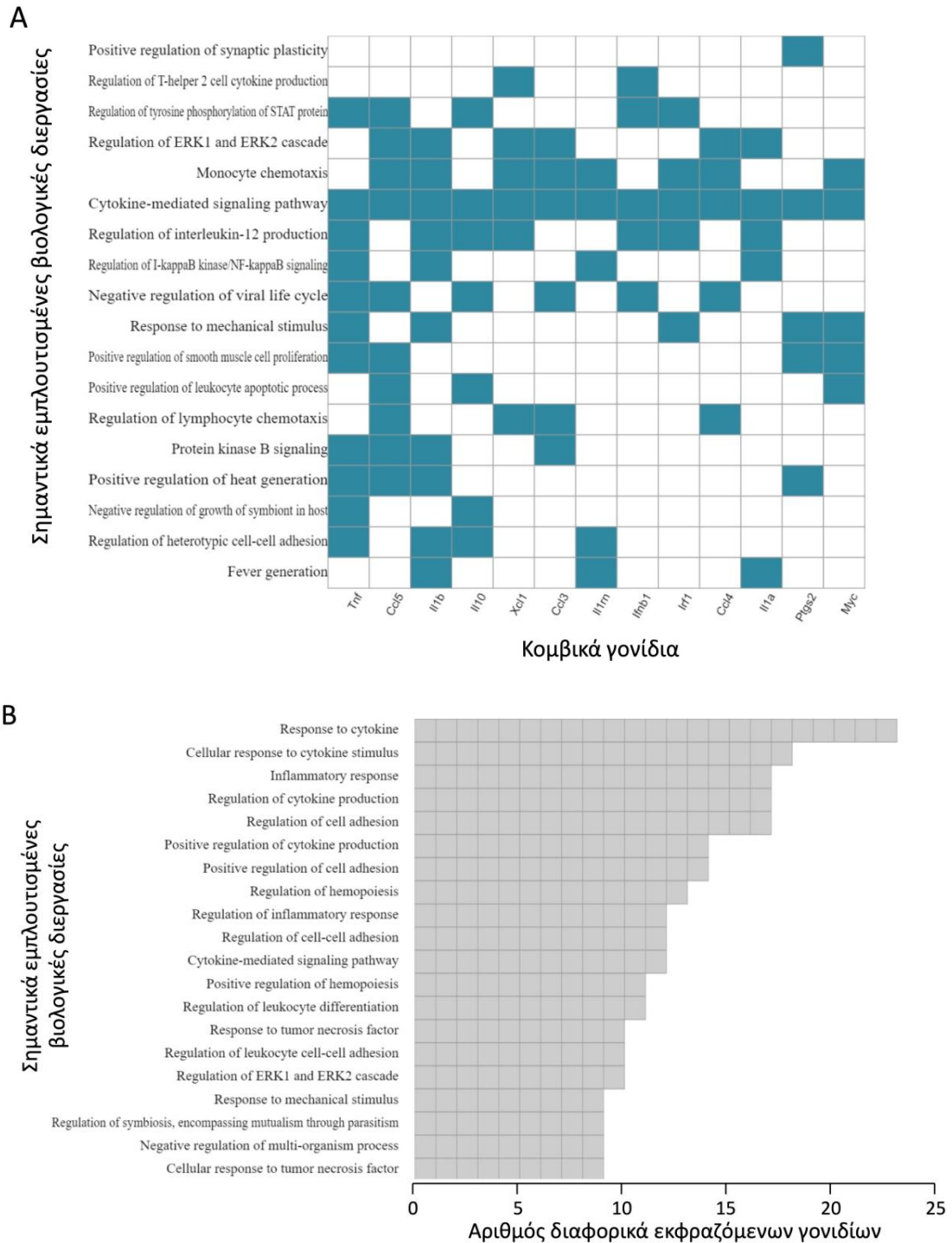
LPS-επαγόμενα γονίδια που καταστέλλονται από συγχρόνηση δεξαμεθαζόνης (DEX) ή της ένωσης AZD9567



Εικόνα 35. Τα διαγράμματα Venn δείχνουν την αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των γονιδίων που επάγονται από το LPS και καταστέλλονται από τη συγχρόνηση δεξαμεθαζόνης (DEX) ή της ένωσης AZD9567 σε κύτταρα RAW264.7.

Πίνακας 11. Κομβικά γονίδια για τα 102 κοινά γονίδια που επάγονται από το LPS και καταστέλλονται τόσο με συγχρόνηση δεξαμεθαζόνης όσο και της ένωσης AZD9567 σε κύτταρα RAW264.7.

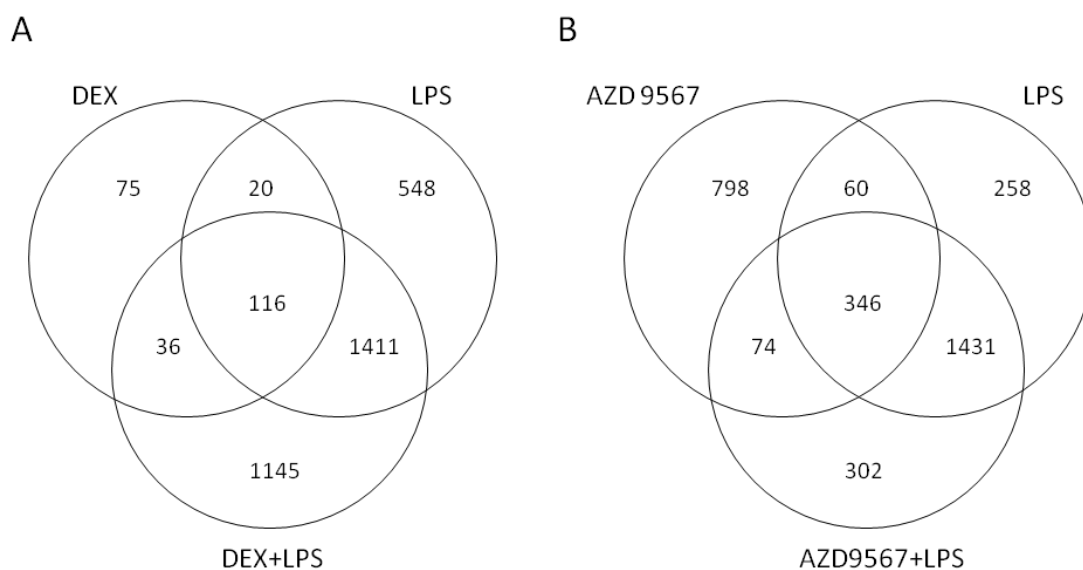
Rank	Gene Symbol	Definition	Systemic Processes
1	Tnf	tumor necrosis factor	11
2	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	10
3	Il1b	interleukin 1 beta	10
4	Il10	interleukin 10	7
5	Xcl1	chemokine (C motif) ligand 1	6
6	Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	6
7	Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist	5
8	Ifnb1	interferon beta 1, fibroblast	5
9	Irf1	interferon regulatory factor 1	5
10	Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	5
11	Il1a	interleukin 1 alpha	5
12	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	5
13	Myc	myelocytomatosis oncogene	5



Εικόνα 36: Λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού των βιολογικών διεργασιών της Gene Ontology για τα 102 διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια που επάγονται από το LPS και καταστέλλονται από τη συγχρήση δεξαμεθαζόνης ή της ένωσης AZD9567 σε κύτταρα RAW264.7. (A) Συσχέτιση των κομβικών γονιδίων (οριζόντιος άξονας) με τις κύριες βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν (κάθετος άξονας). (B) Οι κορυφαίες 20 -ως προς τον αριθμό των σχετικών γονιδίων- στατιστικά σημαντικές βιολογικές διεργασίες που εντοπίστηκαν παρουσιάζονται μαζί με τον αριθμό των αντίστοιχων γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτές.

2.3.3.2.2 Δράση της ένωσης AZD9567 σε σύγκριση με τη δράση της δεξαμεθαζόνης στη ρύθμιση νέων γονιδίων μετά από την πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης

Σύγκριση των γονιδίων που ρυθμίζονται από τη δεξαμεθαζόνη ή την AZD9567, από το LPS και από τον συνδυασμό τους (αναφέρονται στον Πίνακα 4) έδειξε ότι οι συνδυαστικές επιδράσεις (Dex+LPS ή AZD9567+LPS) μεταβάλλουν το ρεπερτόριο των γονιδίων που ρυθμίζονται από την κάθε επίδραση ξεχωριστά (Εικόνα 37). Το 42% των γονιδίων που ρυθμίζονται από το συνδυασμό της δεξαμεθαζόνης με το LPS δεν ρυθμίζονται από τις απλές κατεργασίες με δεξαμεθαζόνη ή LPS (Εικόνα 37A). Η αναδιάταξη του ρεπερτορίου των ρυθμιζόμενων γονιδίων είναι λιγότερο εκτεταμένη στην περίπτωση του συνδυασμού της ένωσης AZD9567 με το LPS όπου μόνο το 14% των γονιδίων που ρυθμίζονται από το συνδυασμό δεν ρυθμίζονται από τις απλές κατεργασίες με την ένωση AZD9567 ή το LPS (Εικόνα 37B).



Εικόνα 37. Τα διαγράμματα Venn δείχνουν την αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των γονιδίων που ρυθμίζονται από (A) τη δεξαμεθαζόνη (Dex), το LPS και το συνδυασμό τους, και (B) την ένωση AZD956, το LPS και το συνδυασμό τους, σε κύτταρα RAW264.7.

Ανάλυση των 1145 και 302 νέων γονιδίων που ρυθμίζονται από την συνδυαστική επίδραση της δεξαμεθαζόνης με το LPS και της AZD9567 με το LPS ανέδειξε 66 και 20 κομβικά γονίδια, αντίστοιχα (Πίνακες 13 και 14). Τέλος, λειτουργική ανάλυση με βάση τον εμπλουτισμό των βιολογικών διεργασιών της Gene Ontology ανέδειξε τις σημαντικές βιολογικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται τα 1145 και 302 νέα γονίδια. Οι βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τα νέα 1145 (DEX+LPS)-ρυθμιζόμενα γονίδια περιλαμβάνουν μεταβολικές διεργασίες και διεργασίες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, την ανοσολογική

απόκριση, την παραγωγή κυτοκινών και την απόκριση άμυνας (Εικόνα 38 και Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ20). Στην περίπτωση των νέων 302 (AZD9567+LPS)-ρυθμιζόμενων γονιδίων οι βιολογικές διεργασίες που αναδείχθηκαν σχετίζονται κυρίων με τη βιοσύνθεση, το μεταβολισμό και τις τροποποιήσεις (μακρο)μορίων (Εικόνα 39 και Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ21).

Πίνακας 13. Κομβικά γονίδια για τα διαφορετικά ρυθμιζόμενα 1145 νέα γονίδια που εκφράζονται μετά από συνδυαστική επίδραση με δεξαμεθαζόνη και LPS στα κύτταρα RAW264.7.

Rank	Gene Symbol	Definition	Systemic Processes
1	Aicda	activation-induced cytidine deaminase	8
2	Blm	Bloom syndrome, RecQ like helicase	7
3	Arb2	arrestin, beta 2	7
4	Ada	adenosine deaminase	7
5	Lgals9	lectin, galactose binding, soluble 9	7
6	P2rx7	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7	6
7	Igf1	insulin-like growth factor 1	6
8	Syk	spleen tyrosine kinase	6
9	Brca2	breast cancer 2, early onset	6
10	Gata3	GATA binding protein 3	6
11	Tlr3	toll-like receptor 3	6
12	Washc1	WASH complex subunit 1	6
13	H2-M3	histocompatibility 2, M region locus 3	5
14	Ddx58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	5
15	Nek2	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2	5
16	Nlrc3	NLR family, CARD domain containing 3	5
17	Fancd2	Fanconi anemia, complementation group D2	5
18	Mmp12	matrix metalloproteinase 12	5
19	Aurka	aurora kinase A	5
20	Aurkb	aurora kinase B	5

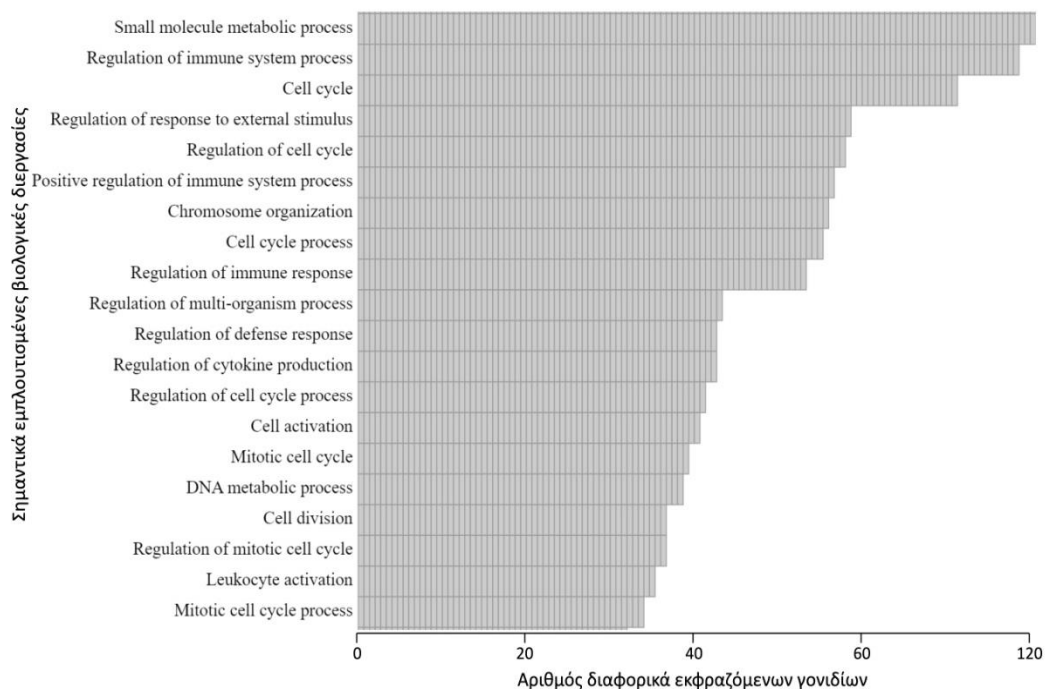
21	Lgals8	lectin, galactose binding, soluble 8	5
22	Tlr8	toll-like receptor 8	5
23	Gm4737	predicted gene 4737	5
24	Rad51	RAD51 recombinase	5
25	Cd36	CD36 molecule	5
26	Cenpe	centromere protein E	5
27	Nudt16	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16	5
28	Ndc80	NDC80 kinetochore complex component	5
29	Ccne1	cyclin E1	5
30	Ahcy	S-adenosylhomocysteine hydrolase	5
31	Aif1	allograft inflammatory factor 1	5
32	B2m	beta-2 microglobulin	4
33	Shmt2	serine hydroxymethyltransferase 2 (mitochondrial)	4
34	Shmt1	serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble)	4
35	Mad2l1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1	4
36	H2-T23	histocompatibility 2, T region locus 23	4
37	Parp3	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 3	4
38	Gins1	GINS complex subunit 1 (Psf1 homolog)	4
39	Top2a	topoisomerase (DNA) II alpha	4
40	Trim30a	tripartite motif-containing 30A	4
41	Irf7	interferon regulatory factor 7	4
42	Irf4	interferon regulatory factor 4	4
43	Slc11a1	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	4
44	Adar	adenosine deaminase, RNA-specific	4
45	Cd24a	CD24a antigen	4
46	Kif11	kinesin family member 11	4

47	Bub1b	BUB1B, mitotic checkpoint serine/threonine kinase	4
48	Fmr1	fragile X mental retardation 1	4
49	Tlr1	toll-like receptor 1	4
50	C3	complement component 3	4
51	Il15	interleukin 15	4
52	Cdc45	cell division cycle 45	4
53	Cenpw	centromere protein W	4
54	Nudt18	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 18	4
55	Cd300a	CD300A molecule	4
56	Kif4	kinesin family member 4	4
57	Ntmt1	N-terminal Xaa-Pro-Lys N-methyltransferase 1	4
58	Spag5	sperm associated antigen 5	4
59	Esco2	establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 2	4
60	Smad3	SMAD family member 3	4
61	Nusap1	nucleolar and spindle associated protein 1	4
62	Ddx11	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box helicase 11	4
63	Espl1	extra spindle pole bodies 1, separase	4
64	Pola1	polymerase (DNA directed), alpha 1	4
65	Fancm	Fanconi anemia, complementation group M	4
66	Renbp	renin binding protein	3

Πίνακας 14. Κομβικά γονίδια για τα διαφορεικά ρυθμιζόμενα 302 νέα γονίδια που εκφράζονται μετά από συνδυαστική επίδραση με AZD9567 και LPS στα κύτταρα RAW264.7.

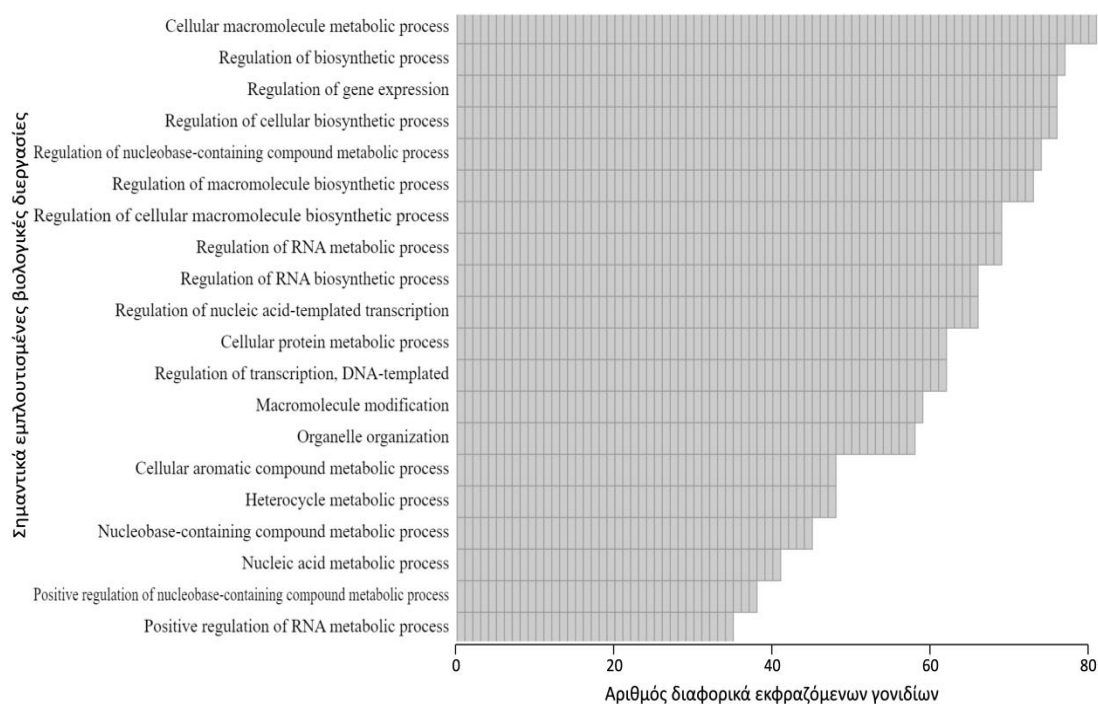
Rank	Gene Symbol	Definition	Systemic Processes
1	Ctr9	CTR9 homolog, Paf1/RNA polymerase II complex component	7
2	Mul1	mitochondrial ubiquitin ligase activator of NFKB 1	6
3	Npm1	nucleophosmin 1	6

4	Pelo	pelota mRNA surveillance and ribosome rescue factor	5
5	Bcl2l1	BCL2-like 1	5
6	Kmt2b	lysine (K)-specific methyltransferase 2B	4
7	Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	4
8	Rad23a	RAD23 homolog A, nucleotide excision repair protein	4
9	Erc6	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6	4
10	Zfp830	zinc finger protein 830	4
11	Smg8	smg-8 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans)	3
12	Kat5	K(lysine) acetyltransferase 5	3
13	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	3
14	Ttbk2	tau tubulin kinase 2	3
15	Smg9	smg-9 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans)	3
16	Bend3	BEN domain containing 3	3
17	Sirt6	sirtuin 6	3
18	Msl2	MSL complex subunit 2	3
19	Uggt2	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 2	3
20	Traf2	TNF receptor-associated factor 2	3



Εικόνα 38: Λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού των βιολογικών διεργασιών της Gene Ontology για τα 1145 νέα γονίδια που εκφράζονται μετά από συνδυαστική επίδραση δεξαμεθαζόνης και LPS σε

κύτταρα RAW264.7. Οι κορυφαίες 20 -ως προς τον αριθμό των σχετικών γονιδίων- στατιστικά σημαντικές εμπλουτισμένες βιολογικές διεργασίες παρουσιάζονται μαζί με τον αριθμό των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτές.



Εικόνα 39: Λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού των βιολογικών διεργασιών της Gene Ontology για τα 302 νέα γονίδια που εκφράζονται μετά από συνδυαστική επίδραση με την AZD9567 και LPS σε κύτταρα RAW264.7. Οι κορυφαίες 20 -ως προς τον αριθμό των σχετικών γονιδίων- στατιστικά σημαντικές εμπλουτισμένες βιολογικές διεργασίες παρουσιάζονται μαζί με τον αριθμό των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτές.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

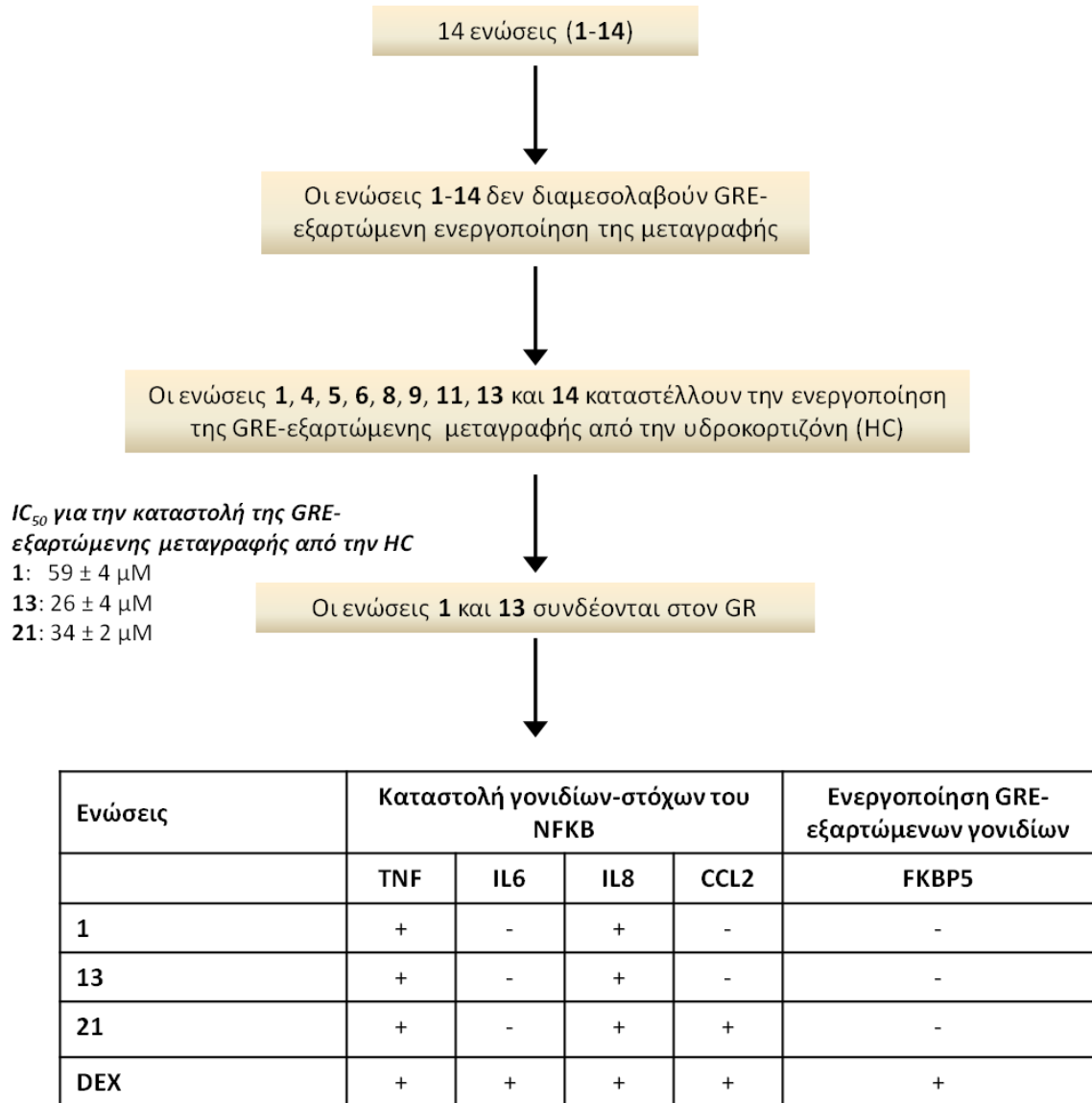
A. Ταυτοποίηση μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Στο πρώτο μέρος της παρούσας εργασίας παρουσιάζεται η ταυτοποίηση νέων μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε φαρμακοφόρο μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για εικονική σάρωση 7,8 εκατομμύριων ενώσεων της χημικής βιβλιοθήκης Ambinter και σε συνδυασμό με μελέτες μοριακής σύνδεσης οδήγησε σε ένα μικρό αριθμό υποψήφιων επιλεκτικών αγωνιστών του GR. Βιολογική αποτίμηση των ενώσεων αυτών ανέδειξε δύο βενζοθειαζολικά ανάλογα (ενώσεις **1** και **13**) με το επιθυμητό προφίλ.

Η πρόσδεση των ενώσεων **1** και **13** στο διευρυμένο τμήμα πρόσδεσης της ορμόνης στον GR (GR-LBD) διατηρεί τις αλληλεπιδράσεις με τα γνωστά σημαντικά αμινοξέα (Asn564, Gln570, Phe623, Arg611) και επιπλέον αναδεικνύει 2 νέα σημαντικές αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Trp577 και Lys667 που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν περαιτέρω για τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων της εικονικής σάρωσης.

Η βιολογική αποτίμηση, επισκόπηση της οποίας παρουσιάζεται στον Σχήμα 7, αποκάλυψε ότι οι ενώσεις **1** και **13** δεν δρουν ως κλασικά γλυκοκορτικοειδή αφού δεν επάγουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων στόχων που ελέγχονται από τα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή όπως φάνηκε τόσο από το γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης όσο και από το ενδογενές γονίδιο-στόχο του GR FKBP5. Ωστόσο οι ενώσεις αυτές μπορούν να αναστείλουν την ενεργοποίηση του GR από την υδροκορτιζόνη εκτοπίζοντας την από τον υποδοχέα όπως έδειξαν τα πειράματα πολωσιμετρίας φθορισμού. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες παρατηρήσεις που δείχνουν ότι η στεροειδής ένωση αναφοράς **21** εκτοπίζει εν μέρει τη δεξαμεθαζόνη από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών αρουραίου, αναστέλλει την ενεργοποίηση των GRE-εξαρτώμενων γονιδίων και δεν ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου της αμινοτρανσφεράσης της τυροσίνης (TAT, γονίδιο που ελέγχεται από τα GREs) σε ηπατοκύτταρα αρουραίου (Vincent et al, 1997 - Pecci et al, 2009). Τα πειράματα πολωσιμετρίας φθορισμού αποκάλυψαν ότι οι ενώσεις **1** και **13** συνδέονται με τον GR εκτοπίζοντας την υδροκορτιζόνη από αυτόν αν και με μικρότερη συγγένεια σε σύγκριση με αυτή της δεξαμεθαζόνης. Οι ενώσεις **4-11** και **14** που αναστέλλουν την ενεργοποίηση που διαμεσολαβείται από την υδροκορτιζόνη και δεν συνδέονται στον υποδοχέα GR σε συγκέντρωση 10μM πιθανόν να συνδέονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (100 μM).

Βιολογική αποτίμηση υποψήφιων επιλεκτικών αγωνιστών του GR



Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση της βιολογικής αποτίμησης των υποψήφιων μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του GR.

Οι ενώσεις 1 και 13 επελέγησαν για τη βιολογική αποτίμηση λόγω της μικρής συγκέντρωσης που απαιτείται για τη σύνδεση τους στον υποδοχέα η οποία επιβεβαιώθηκε από τα δεδομένα της πυρηνικής μετατόπισης του GR. Ο εντοπισμός του GR απουσία ορμόνης τόσο στο πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων HeLa B2 συμφωνεί με τα προηγούμενα δεδομένα που δείχνουν την συνεχή μεταφορά του GR μεταξύ των δύο κυτταρικών δομών (Vandevyver et al, 2012). Οι ενώσεις 13 και 21 επάγουν τον εντοπισμό του GR στον πυρήνα με παρόμοιο τρόπο με αυτόν της δεξαμεθαζόνης, ενώ αντίθετα η ένωση 1 οδηγεί σε μερική πυρηνική εντόπιση του GR. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την

υψηλότερη χημική συγγένεια πρόσδεσης των ενώσεων **13** και **21** στον GR σε σχέση με την ένωση **1** και με τη μεγαλύτερη καταστολή στη δράση της υδροκορτιζόνης από τις ενώσεις **13** και **21** σε σχέση με την ένωση **1**. Σημειώνεται ότι η διαφορετική συγγένεια πρόσδεσης των ενώσεων **1** και **13** στον GR είχε προβλεφθεί και από τις *in silico* μελέτες. Συμπερασματικά οι ενώσεις **1** και **13** συνδέονται στον GR.

Η επίδραση των επιλεγμένων ενώσεων στην καταστολή των γονιδίων-στόχων του NF-κΒ έγινε στα κύτταρα HeLa B2. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν ένα κατάλληλο σύστημα ελέγχου της αλληλεπίδρασης του GR και του NF-κΒ γιατί είναι καλά μελετημένα, εκφράζουν ενδογενή GR και p65 (κύρια υπομονάδα του NF-κΒ) και ανταποκρίνονται σωστά στα γλυκοκορτικοειδή, σε προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (όπως ο TNF) και στο συνδυασμό τους. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ενώσεις **1** και **13** καταστέλλουν ένα υποσύνολο γονιδίων-στόχων του NF-κΒ, εν μέρει διαφορετικών από αυτά που καταστέλλει η στεροειδής ένωση **21** και αρκετά διαφορετικών από αυτά που καταστέλλει η δεξαμεθαζόνη. Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι ο GR καταστέλλει την έκφραση προφλεγμονωδών γονιδίων μέσω διαφορετικών μηχανισμών για κάθε γονίδιο ή ομάδα γονιδίων και ότι ο συνκαταστολέας GRIP1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στους μηχανισμούς αυτούς. Συγκεκριμένα, ο GR καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου του TNF στο στάδιο της επιμήκυνσης ενώ στην περίπτωση του γονιδίου της ιντερλευκίνης IL1α στο στάδιο της έναρξης της μεταγραφής (Gurte et al, 2013). Με βάση τα παραπάνω, η διαφορετική επίδραση των ενώσεων **1**, **13** και **21** σε σύγκριση με τη δεξαμεθαζόνη στην έκφραση των γονιδίων-στόχων του NF-κΒ, πιθανά οφείλεται στο ότι η δέσμευση διαφορετικών επιλεκτικών αγωνιστών στον GR προκαλεί αφενός διαφορετικές αλλαγές στη διαμόρφωσή του και αφετέρου ενεργοποίηση συγκεκριμένων ρυθμιστών (συνενεργοποιητών/συνκαταστολέων) οδηγώντας σε διαφορετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης ανάλογα με τα εγγενή χαρακτηριστικά κάθε γονιδίου-στόχου. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του GR από επιλεκτικούς αγωνιστές του, θα μπορούσε να επηρεάσει την αλληλεπίδρασή του με τον NF-κΒ οδηγώντας σε αλλαγές τόσο στη σύνδεσή τους στη χρωματίνη όσο και στο προφίλ των γονιδίων που ρυθμίζουν σε σχέση με τα κλασικά γλυκοκορτικοειδή. Η υπόθεση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες μας που έδειξαν ότι η συενεργοποίηση του GR και NF-κΒ οδηγεί σε ένα εκτεταμένο και εξαιρετικά σημαντικό επαναπρογραμματισμό του προφίλ των γονιδίων-στόχων τους παράλληλα με σημαντικές αλλαγές στην αλληλεπίδρασή τους με τη χρωματίνη. Επομένως, και σε συμφωνία με αποτελέσματα άλλων ερευνών που δείχνουν ότι η ενεργοποίηση των αντιφλεγμονωδών γονιδίων από το GR είναι απαραίτητη για την καταστολή της φλεγμονής και ο ότι ο GR εμπλέκεται τόσο σε προφλεγμονώδεις όσο και σε αντιφλεγμονώδεις δράσεις,

για την ταυτοποίηση πραγματικών επιλεκτικών αγωνιστών του GR κρίνεται απαραίτητη η συνολική ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ των υποψηφίων ενώσεων.

Συμπερασματικά οι ενώσεις **1** και **13** είναι γνήσιοι μη στεροειδείς επιλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα GR αφού 1) συνδέονται με τον υποδοχέα και επάγουν τη μετατόπιση του στον πυρήνα, 2) δεν επάγουν την έκφραση γονιδίων που ελέγχονται από GRE και 3) καταστέλλουν την επαγωγή συγκεκριμένων προφλεγμονωδών γονιδίων-στόχων του NF-κΒ. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν πρόδρομες ενώσεις στις οποίες βασίστηκαν οι προσπάθειες ανάπτυξης ενώσεων-οδηγών.

Η βελτιστοποίηση των πρόδρομων ενώσεων βασίστηκε στη δομή της ένωσης **13** που δείχνει καλύτερη δράση από την ένωση **1**. Βιολογική αποτίμηση των ενώσεων που προκρίθηκαν από την αναζήτηση ενώσεων δομικά όμοιων με την ένωση **13** καθώς και από εικονική σάρωση της βιβλιοθήκης ενώσεων Zinc, με χρήση βελτιστοποιημένου φαρμακοφόρου μοντέλου κατευθυνόμενου από τη δομή των επιλεκτικών μη στεροειδών αγωνιστών του GR, ανέδειξε 2 ενώσεις με το επιθυμητό προφίλ. Η δράση των ενώσεων αυτών είναι όμοια με τη δράση της ένωσης **13**. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα της προσπάθειας βελτιστοποίησης των πρόδρομων ενώσεων μέσα από τη σύνθεση τροποποιημένων παραγώγων τους (ιμινοβενζοθειαζολυλο-2-θειο ακεταμιδικές ενώσεις). Η ένωση **IDK6** έδειξε παρόμοια δράση με αυτή της ένωσης **13** δηλώνοντας ότι η παρεμβολή μιας ογκώδους ομάδας κατά μήκος της αλυσίδας που συνδέει το θειοακεταμίδιο με την αρυλομάδα (Σχήμα 5) δεν επηρεάζει τη δράση της ένωσης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ένωση **IDK11** που έδειξε μερική καταστολή της δράσης της υδροκορτιζόνης στη συγκέντρωση των 10 μΜ. Η χαμηλή διαλυτότητα της ένωσης αυτής δεν επέτρεψε τον παραπέρα χαρακτηρισμό της αλλά φαίνεται ότι η αύξηση του μεγέθους της περιοχής που προσδέεται στο GR-LBD με την προσθήκη ναφθαλινίου στο δεξιό τμήμα της ένωσης (Σχήμα 5) μπορεί να επηρεάζει τη δράση της. Τα παραπάνω προτείνουν ότι απαιτείται συνδυασμός διαφορετικών προσεγγίσεων προκειμένου να επιτευχθεί η βελτιστοποίηση των πρόδρομων ενώσεων και η ανάπτυξη μιας ένωσης-οδηγού.

Για την αποτίμηση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης των μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του GR επιλέχθηκε το σύστημα των κυττάρων καρκίνου του μαστού MCF-7/LCC1 και MCF-7/LCC9 τα οποία έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζουν μερική και πλήρη ανθεκτικότητα, αντίστοιχα, στη δράση του αντιοιστρογόνου 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνη λόγω υπερενεργοποίησης του NF-κΒ (Nehra et al, 2010). Τα πειράματά μας επιβεβαίωσαν την αντοχή των κυττάρων αυτών στην 4-υδροξυ-ταμοξιφαίνη αλλά δεν έδειξαν αποκατάσταση της ευαισθητοποίησης σε αυτή παρουσία κλασικών γλυκοκορτικοειδών με ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση όπως η δεξαμεθαζόνη. Επιπλέον, η καταστολή του γονιδίου του TNF

(κλασικός στόχος του NF-κΒ) από τη δεξαμεθαζόνη στα κύτταρα MCF7/LCC9 αλλά όχι στα MCF7/LCC1 δηλώνει ότι η αλληλεπίδραση του GR και του NF-κΒ διαμεσολαβείται από διαφορετικούς μηχανισμούς στα κύτταρα MCF-7/LCC1 και MCF-7/LCC9 σε σχέση με το καλά μελετημένο σύστημα των κυττάρων HeLa. Η αποτίμηση της αντικαρκινικής δράσης των μη στεροειδών επιλεκτικών αγωνιστών του GR αλλά και των κλασικών γλυκοκορτικοειδών απαιτεί περαιτέρω μελέτες.

B. Μελέτη της δράσης του μη στεροειδούς επιλεκτικού αγωνιστή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών AZD9567

Στο δεύτερο μέρος αυτής της εργασίας μελετήθηκε η δράση της ένωσης AZD9567 ως επιλεκτικού αγωνιστή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η ένωση AZD9567 είναι μερικός αγωνιστής του GR σε κύτταρα HeLa B2 με το μέγιστο της δράσης της στη GRE-εξαρτώμενη μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς να είναι 2,4 και 4 φορές χαμηλότερο από τη μέγιστη δράση της υδροκορτιζόνης και της δεξαμεθαζόνης, αντίστοιχα. Ο πλήρης ανταγωνισμός της επαγόμενης από την υδροκορτιζόνη GRE-εξαρτώμενης μεταγραφής σε κύτταρα HeLa B2 δείχνει ότι η ένωση AZD9567 μπορεί να την υποκαταστήσει την υδροκορτιζόνη σε φαρμακολογικής σημασίας συγκεντρώσεις και είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η ένωση AZD9567 καταστέλλει την επαγόμενη από την πρεδνιζολόνη μεταγραφή του γονιδίου της TAT σε ηπατοκύτταρα (Ripa et al, 2018). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η ένωση AZD9567 οδηγεί σε επαγωγή της μεταγραφής ενδογενών GRE-εξαρτώμενων γονιδίων-στόχων του GR σε κύτταρα HeLa B2 αλλά και σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού RAW264.7 με το βαθμό επαγωγής από την ένωση AZD9567 να είναι σημαντικά χαμηλότερος από αυτόν της δεξαμεθαζόνης και το ποσοστό επαγωγής από την AZD9567 σε σχέση με τη δεξαμεθαζόνη διαφορετικό για κάθε γονίδιο. Η απουσία επαγωγής της μεταγραφής του γονιδίου της TAT στα κύτταρα HepG2 (ηπατικό καρκίνωμα) συμφωνεί με ανάλογα δημοσιευμένα αποτελέσματα (Ripa et al, 2018). Τα παραπάνω δηλώνουν την επιλεκτική και περιορισμένη επαγωγική δράση της ένωσης AZD9567 ανάλογα με το κάθε γονίδιο-στόχο και/ή κύτταρο-στόχο.

Η κατασταλτική δράση της ένωσης AZD9567 στην επαγωγή γονιδίων-στόχων του NF-κΒ μετά από πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης ήταν παρόμοια με αυτή της δεξαμεθαζόνης στα κύτταρα HeLa B2. Αντίθετα, στα μακροφάγα κύτταρα ποντικού RAW264.7 η κατασταλτική της δράση ήταν παρόμοια, μεγαλύτερη ή μικρότερη από αυτή της δεξαμεθαζόνης ανάλογα με το κάθε γονίδιο. Το διαφορετικό αυτό προφίλ της κατασταλτικής ρύθμισης θα μπορούσε να

οφείλεται και στο διαφορετικό τρόπο πρόκλησης της φλεγμονώδους απόκρισης στις δύο κυτταρικές σειρές. Και στις δύο περιπτώσεις όμως η καταστολή της μεταγραφής του TNF, του πιο κοινού βιοδείκτη για την αξιολόγηση της αντιφλεγμονώδους δράσης, από την ένωση AZD9567 είναι παρόμοια με αυτή της δεξαμεθαζόνης και της πρεδνιζολόνης σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση της ένωσης AZD9567 (Ripa et al, 2018 - Almquist et al, 2020).

Η μελέτη της επίδρασης της ένωσης AZD9567 σε συγκεκριμένα γονίδια-στόχους του GR και του NK-κΒ δίνει σημαντικές πληροφορίες για τη δράση της αλλά δεν είναι αρκετή για να επιβεβαιώσει ότι η συγκεκριμένη ένωση είναι πραγματικός επιλεκτικός αγωνιστής του GR. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε στην ταυτοποίηση του συνολικού μεταγραφομικού προφίλ της ένωσης AZD9567 και της δεξαμεθαζόνης σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού RAW264.7. Τα μακροφάγα κύτταρα αποτελούν ένα σύστημα κατάλληλο για τη μελέτη της φλεγμονώδους απόκρισης. Η σύγκριση των γονιδίων που ρυθμίζονται από τη δεξαμεθαζόνη και την ένωση AZD9567 απουσία φλεγμονώδους απόκρισης ανέδειξε μόνο 108 κοινά ρυθμιζόμενα γονίδια που εμπλέκονται σε κλασικές διεργασίες που ρυθμίζονται από τα γλυκοκορτικοειδή, όπως η ρύθμιση του κερκάδιου ρυθμού, η φλεγμονώδης απόκριση και η διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, δηλώνοντας ότι η ένωση AZD9567 διαμεσολαβεί σημαντικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών. Σύγκριση όμως του συνόλου των γονιδίων που ρυθμίζονται από την κάθε κατεργασία δείχνει ότι η ένωση AZD9567 καταστέλλει μεγαλύτερο ποσοστό γονιδίων από αυτά που επάγει (59% και 41%, αντίστοιχα) ενώ το αντίθετο ισχύει για τη δεξαμεθαζόνη (34% και 66%, αντίστοιχα). Τα παραπάνω δηλώνουν ένα διαφορετικό μεταγραφικό προφίλ για τις δύο ενώσεις. Σε συμφωνία με το εύρημα αυτό, λειτουργική ανάλυση των ρυθμιζόμενων γονιδίων και των βιολογικών διεργασιών στις οποίες εμπλέκονται έδειξε ότι η ένωση AZD9567 δεν διαμεσολαβεί ή διαμεσολαβεί σε πολύ μικρό βαθμό κάποιες από τις κλασικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών όπως η διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και ο κυτταρικός θάνατος. Τόσο τα γονίδια που ρυθμίζονται από τη δεξαμεθαζόνη όσο και αυτά που ρυθμίζονται από την ένωση AZD9567 στην πλειονότητα τους εμπλέκονται σε σημαντικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών όπως η ρύθμιση του κερκάδιου ρυθμού, η διαφοροποίηση και η πρόσφυση των λευκοκυττάρων, η ανταπόκριση στο LPS και η φλεγμονώδης απόκριση. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ανάδειξη μέσα από τη λειτουργική ανάλυση βιολογικών διεργασιών που ρυθμίζονται σχεδόν αποκλειστικά ή μόνο από την AZD9567 όπως η ρύθμιση παραγωγής κυτοκινών και η απόκριση άμυνας ή η ανοσολογική απόκριση, αντίστοιχα. Με βάση τα παραπάνω η ένωση AZD9567 διαμεσολαβεί πολλές από τις κλασικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών σε συμφωνία με τη δημοσιευμένη ισχυρή

αντιφλεγμονώδη δράσης της (Ripa et al, 2018). Επιπλέον διαμεσολαβεί και διαφορετικές δράσεις στις οποίες μπορεί να οφείλεται το βελτιωμένο θεραπευτικό της προφίλ και οι οποίες θα πρέπει να μελετηθούν παραπέρα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε η μελέτη της δράσης της AZD9567 στην ανοσολογική απόκριση και ιδιαίτερα στην αυτοάνοση απόκριση, δεδομένου ότι πολλές αυτοάνοσες νόσοι όπως π.χ. ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος συνδέονται με το σύνδρομο ενεργοποίησης των μακροφάγων και απαιτούν συνεχή χορήγηση υψηλών δόσεων πρεδνιζολόνης (Galapopoulos et al 2017; Crayne et al, 2019).

Η μελέτη του μεταγραφομικού προφίλ της ένωσης AZD9567 και της δεξαμεθαζόνης σε συνδυασμό με την πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης παρουσία LPS έδειξε ότι και οι δύο ενώσεις καταστέλλουν ένα ποσοστό των γονιδίων που επάγονται από το LPS (30% η δεξαμεθαζόνη και 17% η AZD9567). Σύγκριση των γονιδίων που καταστέλλονται από την ένωση AZD9567 και τη δεξαμεθαζόνη ανέδειξε 102 κοινά γονίδια μεταξύ των οποίων σημαντικά προφλεγμονώδη γονίδια. Τα κοινά γονίδια εμπλέκονται κυρίως σε βιολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη απόκριση δείχνοντας ότι η αντιφλεγμονώδης δράση της ένωσης AZD9567 διαμεσολαβείται από τους ίδιους κύριους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αντιφλεγμονώδη δράση της δεξαμεθαζόνης. Η καταστολή των γονιδίων αυτών είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες μας που έδειξαν ότι το γλυκοκορτικοειδές τριαμσινολόνη καταστέλλει μέρος των γονιδίων που επάγει η πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης με TNF σε κύτταρα HeLa B2 (Rao et al, 2011). Παρόμοια, η δεξαμεθαζόνη βρέθηκε να καταστέλλει το 33% των γονιδίων που επάγονται από το LPS κατά την πρόκληση φλεγμονώδους απόκρισης σε μακροφάγα κύτταρα μυελού των οστών ποντικού (Sacta et al, 2018).

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι οι συνδυαστικές κατεργασίες (Dex+LPS ή AZD9567+LPS) μεταβάλλουν το ρεπερτόριο των γονιδίων που ρυθμίζονται από την κάθε κατεργασία χωριστά σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες μας που έδειξαν επαναπρογραμματισμό των γονιδίων-στόχων του GR και του NF-κΒ μετά από την συνενεργοποίησή τους (Rao et al, 2011). Η αναδιάταξη του ρεπερτορίου των ρυθμιζόμενων γονιδίων είναι λιγότερο εκτεταμένη στην περίπτωση του συνδυασμού της ένωσης AZD9567 με το LPS σε συμφωνία με τα υπόλοιπα αποτελέσματά μας που δείχνουν διαφορετικό μεταγραφομικό προφίλ της ένωσης AZD9567 σε σχέση με αυτό της δεξαμεθαζόνης. Τα νέα γονίδια που ρυθμίζονται από το συνδυασμό της δεξαμεθαζόνης με το LPS εμπλέκονται σε μεταβολικές διεργασίες και διεργασίες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, την ανοσολογική απόκριση, την παραγωγή κυτοκινών και την απόκριση άμυνας. Ο συνδυασμός της ένωσης AZD9567 με το LPS ρυθμίζει νέα γονίδια που σχετίζονται κυρίως με τη βιοσύνθεση, το μεταβολισμό και τις

τροποποιήσεις (μακρο)μορίων ενισχύοντας και πάλι το διαφορετικό μεταγραφομικό προφίλ της ένωσης AZD9567. Τα αποτελέσματα μας προτείνουν ότι η ενεργοποίηση του GR από τη δεξαμεθαζόνη ή την ένωση AZD9567 οδηγεί σε διαφορετική αλληλεπίδραση με τον ενεργοποιημένο NF-κΒ (από το LPS) και πιθανά αλλάζει τις θέσεις πρόσδεσής τους στη χρωματίνη και τα γονίδια-στόχους που ρυθμίζουν σε κάθε περίπτωση.

Συμπερασματικά, η ένωση AZD9567 είναι επιλεκτικός αγωνιστής του GR με περιορισμένη επαγωγική και ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση. Το μεταγραφομικό προφίλ της AZD9567 δείχνει ότι προάγει κοινές αλλά και διαφορετικές βιολογικές διεργασίες σε σχέση με τα κλασσικά γλυκοκορτικοειδή τόσο απουσία όσο και παρουσία φλεγμονώδους απόκρισης. Σε αυτό το διαφορετικό μεταγραφομικό προφίλ μπορεί να οφείλεται το βελτιωμένο θεραπευτικό προφίλ της AZD9567.

4. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική ως ισχυρά αντιφλεγμονώδη φάρμακα, ωστόσο η χρήση τους συνοδεύεται από παρενέργειες. Η αντιφλεγμονώδης δράση των γλυκοκορτικοειδών ασκείται από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) εν μέρει μέσω του ανταγωνισμού της δράσης του πυρηνικού παράγοντα κΒ (NF-κΒ), ενώ η πλειονότητα των παρενεργειών θεωρείται ότι προκαλείται από τη ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του GR. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη νέων επιλεκτικών αγωνιστών του GR που θα διαμεσολαβούν την καταστολή της δράσης του NF-κΒ αλλά όχι την ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων του GR θα μπορούσε να βελτιώσει την κλινική τους χρήση.

Στην παρούσα εργασία ταυτοποιήθηκαν μη στεροειδείς επιλεκτικοί αγωνιστές του GR με χρήση εικονικής σάρωσης της χημικής βιβλιοθήκης της Ambinter (7,8 εκατομμύρια ενώσεις). Βιολογική αποτίμηση των επιλεγμένων ενώσεων ανέδειξε δύο νέα δομικά όμοια πρόδρομα μόρια (βενζοθειαζολικά ανάλογα) που συνδέονται με τον υποδοχέα, δεν επάγουν την έκφραση γονιδίων-στόχων του GR και επιλεκτικά καταστέλλουν την επαγωγή συγκεκριμένων προφλεγμονωδών γονιδίων-στόχων του NF-κΒ. Αποτίμηση της δράσης των νέων πρόδρομων ενώσεων αλλά και κλασικών αγωνιστών του GR σε εξειδικευμένα μοντέλα καρκινικών κυττάρων με υπερνεργοποιημένο NF-κΒ δεν ανέδειξε αντικαρκινική δράση.

Για τη μελέτη των μηχανισμών της δράσης των επιλεκτικών αγωνιστών του GR χρησιμοποιήθηκε ο επιλεκτικός αγωνιστής AZD9567. Δείχθηκε ότι η ένωση AZD9567 είναι μερικός αγωνιστής του GR και μπορεί να υποκαταστήσει πλήρως τη φυσική ορμόνη υδροκορτιζόνη σε φαρμακολογικής σημασίας συγκεντρώσεις. Ταυτοποίηση του συνολικού μεταγραφομικού προφίλ της ένωσης AZD9567 σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού έδειξε ότι η ένωση AZD9567 αν και δεν διαμεσολαβεί κάποιες από τις γνωστές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών (κυτταρικός θάνατος, διαφοροποίηση λιποκυττάρων), διαμεσολαβεί πολλές από τις κλασσικές δράσεις τους (ρύθμιση του κερκάδιου ρυθμού, διαφοροποίηση λευκοκυττάρων, φλεγμονώδης απόκριση) αλλά και διαφορετικές δράσεις (παραγωγή κυτοκινών, απόκριση άμυνας, ανοσολογική απόκριση). Η αντιφλεγμονώδης δράση της ένωσης AZD9567 σε συνθήκες πρόκλησης φλεγμονώδους απόκρισης διαμεσολαβείται, τουλάχιστο εν μέρει, από τους ίδιους κύριους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αντιφλεγμονώδη δράση των κλασικών γλυκοκορτικοειδών. Τέλος, η ένωση AZD9567 παρουσία φλεγμονώδους απόκρισης ρυθμίζει ένα σύνολο νέων γονιδίων που σχετίζονται κυρίως με τη βιοσύνθεση, το μεταβολισμό και τις τροποποιήσεις (μακρο)μορίων. Συμπερασματικά, η ένωση AZD9567 προάγει κοινές αλλά και διαφορετικές βιολογικές διεργασίες σε σχέση με τα κλασσικά γλυκοκορτικοειδή τόσο απουσία όσο και παρουσία

φλεγμονώδους απόκρισης και σε αυτό το διαφορετικό μεταγραφομικό προφίλ μπορεί να οφείλεται το βελτιωμένο θεραπευτικό προφίλ της.

Η παρούσα διατριβή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο των Πράξεων:

«ΣΘΕΝΟΣ: Στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά εκφυλιστικών νοσημάτων, με έμφαση τον καρκίνο και τη γήρανση» (MIS 447985)

και «ΣΘΕΝΟΣ-β: Στοχευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις κατά εκφυλιστικών νοσημάτων, με έμφαση τον καρκίνο και τη γήρανση-βελτιστοποίηση των στοχοθετημένων βιοδραστικών ενώσεων» (MIS 5002398)

που χρηματοδοτήθηκαν από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2007-2023 (ΣΘΕΝΟΣ) και του ΕΣΠΑ 2014-2020 (ΣΘΕΝΟΣ-β) με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



5. SUMMARY

Glucocorticoids (GCs) are widely used as potent anti-inflammatory drugs; however, GC therapy is often accompanied by adverse side effects. The anti-inflammatory action of GCs is exerted through the glucocorticoid receptor (GR) in part by antagonizing the pro-inflammatory nuclear factor κ B (NF- κ B) whereas the majority of side effects are assumed to be mediated by transactivation of GR target genes. Development of novel non-steroidal selective GR agonists (SEGRA) favoring transrepression of NF- κ B target genes over transactivation of genes associated with undesirable effects could improve the clinical performance of GCs.

In the present study we set out to identify non-steroidal selective GR agonists utilizing a virtual screening approach of Ambinter library (7.8 million compounds). Two structurally similar hits (1,3-benzothiazole analogs) were identified that bind to GR, induce its translocation to the nucleus, do not mediate transactivation of GR target genes, whereas partially repress a number of pro-inflammatory NF- κ B target genes, in a GR-dependent manner. The discovered 1,3-benzothiazole analogs introduce a new class of genuine SEGRA. Evaluation of the action of the new hit compounds as well as of classical GR agonists in specialized models of cancer cells with hyperactivated NF- κ B did not reveal anticancer activity.

Compound AZD9567, a non-steroidal selective GR agonist, was used in order to study the mechanisms underlying the function of SEGRA. AZD9567 was shown to act as a partial agonist of GR capable of substituting for circulating hydrocortisone at pharmacologically relevant concentrations. Identification of the global transcriptomic profile of compound AZD9567 in mouse macrophages showed that AZD9567, although it does not mediate some of the known actions of glucocorticoids (cell death, fat cell differentiation), mediates many of their classical actions (regulation of circadian rhythm, leukocyte differentiation, inflammatory response) but also different actions (cytokine production, defense response, immune response). Under conditions that elicit an inflammatory response, the anti-inflammatory action of AZD9567 is mediated, at least in part, by the same principal mechanisms involved in the anti-inflammatory activity of classical glucocorticoids. Finally, under the same conditions, compound AZD9567 regulates a set of new genes mainly related to biosynthesis, metabolism and modifications of (macro)molecules. In conclusion, compound AZD9567 mediates common but also different biological processes compared to classical glucocorticoids both in the absence and presence of an inflammatory response and its different transcriptomic profile may account for its improved therapeutic effect.

III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aceto T, Beckhorn GD, Jorgensen JR, et al. (1996) Iatrogenic ACTH-cortisol insufficiency. *Pediatr Clin N Am* 13:543–557.
- Aguilera G, Jessop DS, Harbuz MS, Kiss A, Lightman SL. (1997) Differential regulation of hypothalamic pituitary corticotropin releasing hormone receptors during development of adjuvant-induced arthritis in the rat. *J Endocrinol* 185-191. <https://doi.10.1677/joe.0.1530185>
- Alexis MN, Mavridou I, Mitsiou DJ (1992) Subunit composition of the untransformed glucocorticoid receptor in the cytosol and in the cell. *Eur J Biochem* 75-84. <https://doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb16607.x>
- Almquist J, Sadiq MW, Eriksson Ulf G., Myrbäck TH, Prothon S, Leander J (2020) Estimation of Equipotent Doses for Anti-Inflammatory Effects of Prednisolone and AZD9567, an Oral Selective Nonsteroidal Glucocorticoid Receptor Modulator. *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology* 444-455 <https://doi.10.1002/psp4.12536>
- Almquist J, Rikard SM, Wågberg M, Bruce AC, Gennemark P, Fritsche-Danielson R, Chien KR, Peirce SM, Hansson K, Lundahl A (2020) Model-Based Analysis Reveals a Sustained and Dose-Dependent Acceleration of Wound Healing by VEGF-A mRNA (AZD8601). *CPT Pharmacometrics Systems Pharmacology* Volume 9, Issue 8 p.384-394. <https://doi.10.1002/psp4.12516>
- Barker M, Clackers M, Copley R, Demaine DA, Humphreys D, Inglis GG, Johnston MJ, Jones HT, Haase MV, House D, Loiseau R, Nisbet L, Pacquet F, Skone PA, Shanahan SE, Tape D, Vinader VM, Washington M, Uings I, Upton R, McLay IM, Macdonald SJ. (2006) Dissociated nonsteroidal glucocorticoid receptor modulators; discovery of the agonist trigger in a tetrahydronaphthalene-benzoxazine series. *J Med Chem* 49:4216-4231. <https://doi.org/10.1021/jm060302x>
- Barnes PJ. (1998) Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 94 (6): 557–572. <https://doi:10.1042/cs0940557>
- Betageri R, Gilmore T, Kuzmich D, Kirrane TM, Bentzien J, Wiedenmayer D, Bekkali Y, Regan J, Berry A, Latli B, Kukulka AJ, Fadra TN, Nelson RM, Goldrick S, Zuvela-Jelaska L, Souza D, Pelletier J, Dinallo R, Panzenbeck M, Torcellini C, Lee H, Pack E, Harcken C, Nabozny G, Thomson DS (2011) Non-steroidal dissociated glucocorticoid agonists: indoles as A-ring mimetics and function-regulating pharmacophores. *Bioorg Med Chem Lett* 21:6842-6851. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.09.018>

- Biggadike K., Bledsoe RK, Coe DM, Cooper TW, House D, Iannone MA, Macdonald SJ, Madauss KP, McLay IM, Shipley TJ, Taylor SJ, Tran TB, Uings IJ, Weller V, Williams SP (2009) Design and x-ray crystal structures of high-potency nonsteroidal glucocorticoid agonists exploiting a novel binding site on the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:18114-18119. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909125106>
- Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, et al. (2002) Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110(1):93–105. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00817-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00817-6)
- Blind RD, Garabedian MJ. Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. (2008) *J Steroid Biochem Mol Biol.* 109(1-2):150–7. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.01.002>
- Braith RW, Welsch MA, Mills RM Jr, et al. (1988) Resistance exercise prevents glucocorticoid-induced myopathy in heart transplant recipients. *Med Sci Sports Exerc* 30:483–489. <https://doi.org/10.1097/00005768-199804000-00003>
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics.* 34 i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Clark AR, Belvisi MG (2012) Maps and legends: the quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor. *Pharmacol Ther* 134:54-67. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.12.004>
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction *Anal Biochem.* 162(1):156-9. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>.
- Crayne CB, Albeituni S, Nichols KE, Cron RQ (2019) The Immunology of Macrophage Activation Syndrome *Front Immunol.* 10:119. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00119>
- Da Silva J A P, Jacobs J W G, Kirwan J R, Boers M, Saag K G, L B S Inês, E J P de Koning, F Buttgereit, M Cutolo, H Capell, R Rau, J W J Bijlsma (2006) Safety of low dose glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis: published evidence and prospective trial data *Ann Rheum Dis* 65:285-293. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.038638>
- Davies L, Karthikeyan N, Lynch JT, Sial EA, Gkourtsa A, Demonacos C, et al. (2008) Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol Endocrinol.* 22(6):1331–44. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0360>

- Deroo BJ, Rentsch C, Sampath S, Young J, DeFranco DB, Archer TK. (2002) Proteasomal inhibition enhances glucocorticoid receptor transactivation and alters its subnuclear trafficking. *Mol Cell Biol.* 22(12):4113–23. <https://doi: 10.1128/mcb.22.12.4113-4123.2002>
- Desmet SJ, De Bosscher K (2018) Glucocorticoid receptors: finding the middle ground. *J Clin Invest.* 127(4):1136-1145 <https://doi.org/10.1172/JCI88886>
- De Bosscher K, Haegeman G, Elewaut D (2010) Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. *Curr Opin Pharmacol* 10:497-504. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.04.007>
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA- seq aligner, *Bioinformatics.* 15–21. <https://doi: 10.1093/bioinformatics/bts635>
- Dorrington MG, Fraser IDC (2019) NF-κB Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration, *Front Immunol.* <https://doi 10.3389/fimmu.2019.00705>
- Fardet L, Flahault A, Kettaneh A, et al. (2007) Corticosteroid-induced clinical adverse events: frequency, risk factors and patient's opinion. *Br J Dermatol.* 157:142-148. <https://doi.10.1111/j.1365-2133.2007.07950.x>
- Fel A, Aslangul E, Le Jeune C. (2012) Eye and corticosteroid's use. *Presse Med.* 41:414-421 <https://doi.10.1016/j.lpm.2012.02.001>
- Francke U, Foellmer BE (1989) The glucocorticoid receptor gene is in 5q31-q32 [corrected] p.610-612 [https://doi: 10.1016/0888-7543\(89\)90287-5](https://doi: 10.1016/0888-7543(89)90287-5)
- Galanopoulos N, Christoforidou A, Bezirgiannidou Z. Lupus thrombocytopenia: pathogenesis and therapeutic implications (2017) *Mediterr J Rheumatol Mar* 28;28(1):20-26. <https://doi: 10.31138/mjr.28.1.20>
- Galliher-Beckley AJ, Williams JG, Cidlowski JA. Ligand-independent phosphorylation of the glucocorticoid receptor integrates cellular stress pathways with nuclear receptor signaling. (2011) *Mol Cell Biol.* 31(23):4663–75. <https://doi: 10.1128/MCB.05866-11>
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joels M. (2012) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol.* 350(2):299–309. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.020>
- Grossi O, Genereau T. (2013) Glucocorticoids and infections, doping, surgery, sexuality]. *Rev Med Interne.* 34:269-278. <https://doi.10.1016/j.revmed.2012.12.008>
- Gross KL, Oakley RH, Scoltock AB, Jewell CM, Cidlowski JA. (2011) Glucocorticoid Receptor {alpha} Isoform-Selective Regulation of Antiapoptotic Genes in Osteosarcoma Cells: A New

Mechanism for Glucocorticoid Resistance. *Mol Endocrinol.* 25(7):1087–99. [https://doi: 10.1210/me.2010-0051](https://doi.org/10.1210/me.2010-0051)

- Gupte R, Muse GW, Chinenov Y, Adelman K, Rogatsky I (2013) Glucocorticoid receptor represses proinflammatory genes at distinct steps of the transcription cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:14616-14621. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309898110>
- Han L, Wang B, Wang R, Gong S, Chen G, and Xu W (2019) The shift in the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells mediated by glucocorticoid receptor. *Stem Cell Research & Therapy*, 10, 377. <https://doi: 10.1186/s13287-019-1498-0>
- Hayden MS, Ghosh S (2012) NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & Dev.* 26(3):203-34. <https://doi.org/10.1101/gad.183434.111>
- Hoesel B and Schmid JA. (2013) The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*, 12:86. <https://doi: 10.1186/1476-4598-12-86>.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-641. <https://doi: 10.1038/318635a0>
- Holmstrom S, Van Antwerp ME, Iniguez-Lluhi JA. (2003) Direct and distinguishable inhibitory roles for SUMO isoforms in the control of transcriptional synergy. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 100(26):15758–63. <https://doi:10.1073/pnas.2136933100>
- Holmstrom SR, Chupreta S, So AY, Iniguez-Lluhi JA. Sumo-Mediated Inhibition of (2008) Glucocorticoid Receptor Synergistic Activity Depends on Stable Assembly at the Promoter but Not on Daxx. *Mol Endocrinol* p.2061-2075. <https://doi:10.1210/me.2007-0581>
- Hubler TR, Scammell JG (2004) Intronic hormone response elements mediate regulation of FKBP5 by progestins and glucocorticoids. *Cell Stress Chaperones* 9:243-252. <https://doi.org/10.1379/CSC-32R.1>
- Hübner S, Dejager L, Libert C, Tuckermann JP (2015) The glucocorticoid receptor in inflammatory processes: transrepression is not enough. *Biol Chem* 396:1223-1231. <https://doi.org/10.1515/hsz-2015-0106>
- Hudson WH, Youn C, Ortlund EA. (2013) The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nature structural & molecular biology.* 20(1):53–8.
- Kino T, Su YA, Chrousos GP (2009) Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci Nov*;66(21):3435-48. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0098-z>.
- Koutsandreas T, Binenbaum I, Pilalis E, Valavanis I, Papadodima O, Chatziioannou A, Analyzing and Visualizing. (2016) Genomic Complexity for the Derivation of the Emergent Molecular

<https://doi.org/10.4018/IJMSTR.2016040103>

- Krett NL, Pillay S, Moalli PA, Greipp PR, Rosen ST. (1995) A variant glucocorticoid receptor messenger RNA is expressed in multiple myeloma patients *Cancer Res.* 55(13):2727-9.
- Kumar R, Thompson EB. (2005) Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 94(5):383–94. <https://doi:10.1016/j.jsbmb.2004.12.046>
- Liao Y, Smyth GK, Shi W, feature Counts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features, *Bioinformatics.* 30 (2014) 923-930. <https://doi:10.1093/bioinformatics/btt656>
- Lewis-Tuffin LJ, Jewell CM, Bienstock RJ, Collins JB, Cidlowski JA (2007) Human Glucocorticoid Receptor Binds RU-486 and Is Transcriptionally Active. *Molecular and cellular biology*, p.2266-2282. <https://doi:10.1128/MCB.01439-06>
- Lu NZ and Cidlowski JA (2005) Translational Regulatory Mechanisms Generate N-Terminal Glucocorticoid Receptor Isoforms with Unique Transcriptional Target Genes, p.331-342. <https://doi:10.1016/j.molcel.2005.03.025>
- Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L, Yamamoto KR. (2009) DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science.* 324(5925):407–10. <https://doi:10.1126/science.1164265>
- Moortel LV, Gevaert K, De Bosscher K (2020) Improved Glucocorticoid Receptor Ligands: Fantastic Beasts, but How to Find Them? *Front Endocrinol* 11:559673. <https://doi:10.3389/fendo.2020.559673>
- Nehra R, Riggins RB, Shajahan AN, Zwart A, Crawford AC, Robert Clarke R. (2010) BCL2 and CASP8 regulation by NF- κ B differentially affect mitochondrial function and cell fate in antiestrogen-sensitive and -resistant breast cancer cells, p.2040-2055. <https://doi:10.1096/fj.09-138305>
- Nissen RM, Yamamoto KR. (2000) The glucocorticoid receptor inhibits NF κ B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 14(18):2314–29. <https://doi:10.1101/gad.827900>
- Nicolaidis NC, Chrousos G, Kino T, Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, New M, Purnell J, Sahay R, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trencé DL, Wilson DP (2020)

Glucocorticoid Receptor. Endotext, PMID: 25905394.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279171/>

- Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. (1996) The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem.* 1996; 271(16):9550–9559. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9550>
- Oakley RH, Cidlowski JA (2013) The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 132:1033-1044. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007>
- Oakley RH, Cidlowski JA. (2011) Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem.* 286(5):3177–3184. [https://doi: 10.1074/jbc.R110.179325](https://doi:10.1074/jbc.R110.179325)
- Olefsky JM, Kimmerling G. (1976) Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Am J Med Sci.*271(2):202-210. <https://doi.10.1097/00000441-197603000-00009>
- Oray M, Abusamra K, Ebrahimiadib N, Meese H, Foster CS, FACR, FACS (2016) Long-term side effects of glucocorticoids. *Expert Opinion on Drug Safety*, p.45-465 <http://dx.doi.org/10.1517/14740338.2016.1140743>
- Petta I, Dejager L, Ballegeer M, Lievens S, Tavernier J, Bosscher KD, Liberté C (2016) The Interactome of the Glucocorticoid Receptor and Its Influence on the Actions of Glucocorticoids in Combatting Inflammatory and Infectious Diseases. *ASM Journals* 80(2):495-522. <https://doi:10.1128/MMBR.00064-15>
- Pecci A, Alvarez LD, Veleiro AS, Ceballos NR, Lantos CP, Burton G (2009) New lead compounds in the search for pure antiglucocorticoids and the dissociation of antiglucocorticoid effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 113:155-162. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.12.018>
- Pecci A, Alvarez LD, Presman DM, Burton G (2018) 21-hydroxy-6,19-epoxyprogesterone: a Promising Therapeutic Agent and a Molecular Tool for Deciphering Glucocorticoid Action. *Mini Rev Med Chem* 18(5):428-438. [doi: 10.2174/1389557516666160118112313](https://doi:10.2174/1389557516666160118112313).
- Pratt WB, Toft DO. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* 18(3):306–60. <https://doi:10.1210/edrv.18.3.0303>
- Potamitis C, Siakouli D, Papavasileiou KD, Boulaka A, Ganou V, Roussaki M, Calogeropoulou T, Zoumpoulakis P, Alexis MN, Zervou M, Mitsiou DJ (2019) Discovery of New Non-steroidal Selective Glucocorticoid Receptor Agonists. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 186:142-153 <https://doi.10.1016/j.jsbmb.2018.10.007>
- Porcu P, Barron AM, Frye CA, Walf AA, Yang SY, He XY, A.L. Morrow AL, Panzica GC, Melcangi RC, (2016) Neurosteroidogenesis today: novel targets for neuroactive

steroid synthesis and action and their relevance for translational research, *J. Neuroendocrinol* 28(2):12351. <https://doi.org/10.1111/jne.12351>

- Qian Zhang Michael J. Lenardo David Baltimore (2017) 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell* 168(1-2):37-57 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.012>
- Rao NA, McCalman MT, Moulos P, Francoijs KJ, Chatziioannou A, Kolisis FN, Alexis MN, Mitsiou DJ, Stunnenberg HG (2011) Coactivation of GR and NFKB alters the repertoire of their binding sites and target genes. *Genome Res* 21:1404-1416. <https://doi.org/10.1101/gr.118042.110>
- Ripa L, Edman K, Dearman M, Edenro G, Hendrickx R, Ullah V, Chang HF, Lepistö M, Chapman D, Geschwindner S, Wissler L, Svanberg P, Lawitz K, Malmberg J, Nikitidis A, Olsson RI, Bird J, Llinas A, Hegelund-Myrbäck T, Berger M, Thorne P, Harrison R, Köhler C, Drmota T (2018) Discovery of a Novel Oral Glucocorticoid Receptor Modulator (AZD9567) with Improved Side Effect Profile *J Med Chem* 61(5):1785-1799. <https://doi.10.1021/acs.jmedchem.7b01690>
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK, edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics*. 26 (2010) 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Sacta MA, Tharmalingam B, Coppo M, Rollins DA, Deochand DK, Benjamin B, Yu L, Bin Zhang B, Hu X, Li R, Chinenov Y, Rogatsky I (2018) Gene-specific mechanisms direct glucocorticoid-receptor-driven repression of inflammatory response genes in macrophages *Elife*, 7:e34864. <https://doi.org/10.7554/eLife.34864>
- Sadr-Azodi O, Mattsson F, Bexlius TS, et al. (2013) Association of oral glucocorticoid use with an increased risk of acute pancreatitis: a population-based nested case-control study. *JAMA Intern Med* 173:444-449. <https://doi.10.1001/jamainternmed.2013.2737>
- Samarasinghe RA, Di Maio R, Volonte D, Galbiati F, Lewis M, Romero G, et al. (2011) Nongenomic glucocorticoid receptor action regulates gap junction intercellular communication and neural progenitor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(40):16657–62. <https://doi.10.1073/pnas.1102821108>
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21(1):55-89. <https://doi:10.1210/edrv.21.1.0389>

- Sato A, Funder JW, Okubo M, et al. (1995) Glucocorticoid-induced hypertension in the elderly. Relation to serum calcium and family history of essential hypertension. *Am J Hypertens*. 8:823–828. [https://doi.10.1016/0895-7061\(95\)00149-J](https://doi.10.1016/0895-7061(95)00149-J)
- Schakman O, Gilson H, Thissen JP. (2008) Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* 197(1):1-10. <https://doi:10.1677/JOE-07-0606>
- Siriani D, Mitsiou DJ, Alexis MN (2003) Overexpressed glucocorticoid receptor negatively regulates gene expression under conditions that favour accumulation of non-hormone-binding forms of the receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 84:171-180. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00027-X](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00027-X)
- Suino-Powell K, Xu Y, Zhang C, Tao YG, Tolbert WD, Simons SS Jr, Xu HE (2008) Doubling the size of the glucocorticoid receptor ligand binding pocket by deacylcortivazol. *Mol Cell Biol* 28:1915-1923. <https://doi.org/10.1128/MCB.01541-07>
- Sundahl N, Bridelance J, Libert C, De Bosscher K, Beck IM (2015) Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. *PharmacolTher* 152:28-41. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.001>
- Surjit M, Ganti KP, Mukherji A, Ye T, Hua G, Metzger D, Li M, Chambon P. (2011) Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell*. 145(2):224–241. <https://doi: 10.1016/j.cell.2011.03.027>
- Taniguchi K, Karin M (2018) NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol* 18(5):309-324. <https://doi 10.1038/nri.2017.142>
- Timmermans S, Souffriau J, Libert C (2019) A General Introduction to Glucocorticoid Biology *Front Immunol*. 10:1545. <https://doi: 10.3389/fimmu.2019.01545>
- Topete DC and Cidlowski JA, (2015) One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* 22(1-2):20-32 <https://doi: 10.1159/000362724>
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ (2014) Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 1843:2563-2582. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Uhlenhaut NH, Barish GD, Yu RT, Downes M, Karunasiri M, Liddle C, et al. (2013) Insights into negative regulation by the glucocorticoid receptor from genome-wide profiling of inflammatory cisomes. *Mol Cell*. 49(1):158–71. <https://doi 10.1016/j.molcel.2012.10.013>
- Wang X, DeFranco DB. (2005) Alternative effects of the ubiquitin-proteasome pathway on glucocorticoid receptor down-regulation and transactivation are mediated by CHIP, an E3 ligase. *Mol Endocrinol*. 19(6):1474–82. <https://doi: 10.1210/me.2004-0383>

- Weinstein RS (2012) Glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* [https://doi: 10.1016/j.ecl.2012.04.004](https://doi:10.1016/j.ecl.2012.04.004)
- Vandevyver S, Dejager L, Libert C (2012) On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic* 13:364-74. [doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01288.x](https://doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01288.x).
- Yudt MR, Jewell CM, Bienstock RJ, Cidlowski JA. (2003) Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta. *Mol Cell Biol.* 23(12):4319–30. [https://doi: 10.1128/MCB.23.12.4319-4330.2003](https://doi:10.1128/MCB.23.12.4319-4330.2003)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ1: Λίστα των σημαντικά εμπλουτισμένων όρων της GO (GO terms) μετά από κατεργασία κυττάρων RAW264.7 με την ένωση AZD9567.

Term id	Term Definition	Enrichment	Correctd pvalue
GO:0031347	regulation of defense response	95/611	0.0002
GO:0032101	regulation of response to external stimulus	126/902	0.0006
GO:0032103	positive regulation of response to external stimulus	74/447	0.0012
GO:0002833	positive regulation of response to biotic stimulus	45/212	0.002
GO:0001817	regulation of cytokine production	93/636	0.0023
GO:0071219	cellular response to molecule of bacterial origin	45/218	0.0025
GO:0071216	cellular response to biotic stimulus	47/241	0.0035
GO:0031349	positive regulation of defense response	57/322	0.0038
GO:0071222	cellular response to lipopolysaccharide	43/213	0.0038
GO:0050727	regulation of inflammatory response	58/331	0.0045
GO:0002684	positive regulation of immune system process	125/962	0.0047
GO:0002682	regulation of immune system process	167/1399	0.0051
GO:0002819	regulation of adaptive immune response	39/188	0.0055
GO:1903555	regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production	33/149	0.0059
GO:0002218	activation of innate immune response	26/103	0.0061
GO:0001819	positive regulation of cytokine production	64/410	0.0064
GO:0045089	positive regulation of innate immune response	39/189	0.0069
GO:0006954	inflammatory response	67/437	0.0087
GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	59/364	0.0089
GO:0050707	regulation of cytokine secretion	38/192	0.0098
GO:0002831	regulation of response to biotic stimulus	57/350	0.0099
GO:0032680	regulation of tumor necrosis factor production	32/147	0.01
GO:0002821	positive regulation of adaptive immune response	30/134	0.0117
GO:0061900	glial cell activation	13/32	0.0118
GO:0002758	innate immune response-activating signal transduction	20/72	0.012
GO:0032496	response to lipopolysaccharide	56/350	0.0122
GO:0042116	macrophage activation	15/42	0.0123
GO:0002221	pattern recognition receptor signaling pathway	20/70	0.0126
GO:0001818	negative regulation of cytokine production	42/238	0.0127
GO:0045088	regulation of innate immune response	48/277	0.0131
GO:0002822	regulation of adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	34/173	0.0134
GO:0050715	positive regulation of cytokine secretion	29/136	0.0134

GO:0002824	positive regulation of adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	28/128	0.0153
GO:0043902	positive regulation of multi-organism process	53/337	0.0156
GO:0032733	positive regulation of interleukin-10 production	13/33	0.0159
GO:0006270	DNA replication initiation	10/21	0.0168
GO:0150076	neuroinflammatory response	13/34	0.0174
GO:0006950	response to stress	311/3144	0.0174
GO:0080134	regulation of response to stress	148/1294	0.0187
GO:0002376	immune system process	217/2086	0.0188
GO:0006261	DNA-dependent DNA replication	22/95	0.0189
GO:0050776	regulation of immune response	104/842	0.0192
GO:0002703	regulation of leukocyte mediated immunity	39/224	0.0192
GO:0002697	regulation of immune effector process	56/384	0.0197
GO:0002274	myeloid leukocyte activation	25/113	0.0199
GO:1901701	cellular response to oxygen-containing compound	117/994	0.0206
GO:0002700	regulation of production of molecular mediator of immune response	28/143	0.0206
GO:0034121	regulation of toll-like receptor signaling pathway	16/59	0.0215
GO:0051707	response to other organism	144/1298	0.0216
GO:0032755	positive regulation of interleukin-6 production	21/92	0.0217
GO:0000188	inactivation of MAPK activity	9/19	0.0221
GO:0009607	response to biotic stimulus	146/1324	0.0226
GO:0043900	regulation of multi-organism process	77/593	0.0233
GO:0043207	response to external biotic stimulus	144/1301	0.0234
GO:0032760	positive regulation of tumor necrosis factor production	20/86	0.0242
GO:0032652	regulation of interleukin-1 production	19/80	0.0255
GO:1903557	positive regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production	20/87	0.0259
GO:0006260	DNA replication	30/165	0.0259
GO:0006974	cellular response to DNA damage stimulus	81/649	0.0264
GO:0002718	regulation of cytokine production involved in immune response	19/82	0.0267
GO:0002699	positive regulation of immune effector process	38/233	0.027
GO:0001775	cell activation	73/561	0.0273
GO:0048002	antigen processing and presentation of peptide antigen	15/55	0.0275
GO:0032675	regulation of interleukin-6 production	27/142	0.0277
GO:0001816	cytokine production	27/144	0.0277
GO:1903708	positive regulation of hemopoiesis	33/197	0.0287
GO:0032653	regulation of interleukin-10 production	14/49	0.0296
GO:1903706	regulation of hemopoiesis	54/390	0.0299

GO:1903039	positive regulation of leukocyte cell-cell adhesion	33/195	0.0301
GO:0014910	regulation of smooth muscle cell migration	19/86	0.031
GO:0009615	response to virus	41/262	0.0314
GO:1902105	regulation of leukocyte differentiation	42/279	0.0322
GO:0035456	response to interferon-beta	15/58	0.0325
GO:0048660	regulation of smooth muscle cell proliferation	29/167	0.0338
GO:0002861	regulation of inflammatory response to antigenic stimulus	10/28	0.0344
GO:0014911	positive regulation of smooth muscle cell migration	15/60	0.0345
GO:0031348	negative regulation of defense response	34/213	0.0352
GO:0050778	positive regulation of immune response	79/645	0.0355
GO:0006564	L-serine biosynthetic process	4/4	0.036
GO:0002706	regulation of lymphocyte mediated immunity	30/175	0.0361
GO:0009617	response to bacterium	93/801	0.0368
GO:0006952	defense response	134/1243	0.037
GO:0045321	leukocyte activation	62/474	0.0376
GO:0035458	cellular response to interferon-beta	13/47	0.0376
GO:1902107	positive regulation of leukocyte differentiation	28/160	0.0389
GO:0032677	regulation of interleukin-8 production	15/61	0.0395
GO:0050728	negative regulation of inflammatory response	26/146	0.0395
GO:0002521	leukocyte differentiation	48/346	0.0398
GO:1901722	regulation of cell proliferation involved in kidney development	7/15	0.0403
GO:0048585	negative regulation of response to stimulus	160/1539	0.0412
GO:0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	12/42	0.0419
GO:1903037	regulation of leukocyte cell-cell adhesion	40/274	0.0428
GO:0032651	regulation of interleukin-1 beta production	15/64	0.0428
GO:1902042	negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors	9/26	0.043
GO:0002708	positive regulation of lymphocyte mediated immunity	23/128	0.0437
GO:0007623	circadian rhythm	26/152	0.0441
GO:0060760	positive regulation of response to cytokine stimulus	13/52	0.0443
GO:0019882	antigen processing and presentation	18/85	0.045
GO:0032102	negative regulation of response to external stimulus	48/358	0.0451
GO:0045619	regulation of lymphocyte differentiation	28/166	0.0453
GO:0002573	myeloid leukocyte differentiation	21/111	0.0455
GO:0046653	tetrahydrofolate metabolic process	8/21	0.047
GO:0050704	regulation of interleukin-1 secretion	12/45	0.047
GO:2000106	regulation of leukocyte apoptotic process	18/89	0.047
GO:0050729	positive regulation of inflammatory response	24/137	0.0477
GO:0032648	regulation of interferon-beta production	12/46	0.0478

GO:0071417	cellular response to organonitrogen compound	62/499	0.0486
GO:0032647	regulation of interferon-alpha production	9/27	0.0492
GO:0002705	positive regulation of leukocyte mediated immunity	26/155	0.0495
GO:0033554	cellular response to stress	148/1427	0.0498
GO:0034097	response to cytokine	94/839	0.0498

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ2: Λίστα των σημαντικά εμπλουτισμένων όρων της GO (GO terms) μετά από κατεργασία κυττάρων RAW264.7 με δεξαμεθαζόνη.

Term id	Term Definition	Enrichment	Corrected pvalue
GO:0045598	regulation of fat cell differentiation	13/127	0.0009
GO:0050873	brown fat cell differentiation	7/34	0.0014
GO:0045600	positive regulation of fat cell differentiation	8/57	0.002
GO:0050727	regulation of inflammatory response	20/331	0.0026
GO:0050729	positive regulation of inflammatory response	12/137	0.0029
GO:0071347	cellular response to interleukin-1	10/96	0.0039
GO:0032496	response to lipopolysaccharide	20/350	0.0048
GO:0046683	response to organophosphorus	12/143	0.0052
GO:0010942	positive regulation of cell death	31/683	0.0053
GO:0051384	response to glucocorticoid	13/173	0.0054
GO:0043433	negative regulation of DNA-binding transcription factor activity	12/150	0.0054
GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	20/364	0.0085
GO:0014070	response to organic cyclic compound	38/936	0.0088
GO:0009628	response to abiotic stimulus	43/1110	0.009
GO:0007623	circadian rhythm	12/152	0.0092
GO:1901700	response to oxygen-containing compound	56/1579	0.0092
GO:0010243	response to organonitrogen compound	38/945	0.0102
GO:0034097	response to cytokine	35/839	0.0104
GO:0071345	cellular response to cytokine stimulus	31/720	0.0117
GO:0009314	response to radiation	22/427	0.0135
GO:1902107	positive regulation of leukocyte differentiation	12/160	0.0135
GO:1901701	cellular response to oxygen-containing compound	39/994	0.0138
GO:0032922	circadian regulation of gene expression	7/55	0.0139
GO:0043065	positive regulation of apoptotic process	28/623	0.0144
GO:0043068	positive regulation of programmed cell death	28/628	0.0149
GO:0071222	cellular response to lipopolysaccharide	14/213	0.0154
GO:0045444	fat cell differentiation	10/117	0.0159
GO:0032101	regulation of response to external stimulus	36/902	0.0172
GO:0001659	temperature homeostasis	6/40	0.0175
GO:0071219	cellular response to molecule of bacterial origin	14/218	0.0187
GO:0031960	response to corticosteroid	13/189	0.0191
GO:0023057	negative regulation of signaling	46/1270	0.0196
GO:1903708	positive regulation of hemopoiesis	13/197	0.0201
GO:0031347	regulation of defense response	27/611	0.0203
GO:0010648	negative regulation of cell communication	46/1266	0.0208
GO:1903706	regulation of hemopoiesis	20/390	0.022

GO:0051241	negative regulation of multicellular organismal process	46/1281	0.0222
GO:1902105	regulation of leukocyte differentiation	16/279	0.0234
GO:0051591	response to cAMP	9/104	0.0246
GO:0070555	response to interleukin-1	10/126	0.0248
GO:0045986	negative regulation of smooth muscle contraction	4/17	0.0258
GO:0022408	negative regulation of cell-cell adhesion	12/172	0.0268
GO:0045932	negative regulation of muscle contraction	5/30	0.0273
GO:0022407	regulation of cell-cell adhesion	19/373	0.0279
GO:0048511	rhythmic process	16/285	0.028
GO:0002683	negative regulation of immune system process	22/463	0.0287
GO:0071407	cellular response to organic cyclic compound	22/469	0.0288
GO:1901342	regulation of vasculature development	18/348	0.0298
GO:0034612	response to tumor necrosis factor	12/182	0.0299
GO:1901698	response to nitrogen compound	39/1047	0.0304
GO:0071396	cellular response to lipid	24/534	0.0309
GO:0071216	cellular response to biotic stimulus	14/241	0.0311
GO:0002521	leukocyte differentiation	18/346	0.0315
GO:0016477	cell migration	31/778	0.0315
GO:0008285	negative regulation of cell population proliferation	28/676	0.0324
GO:0071356	cellular response to tumor necrosis factor	11/157	0.0328
GO:1903707	negative regulation of hemopoiesis	11/154	0.0343
GO:0031349	positive regulation of defense response	17/322	0.0344
GO:0032103	positive regulation of response to external stimulus	21/447	0.0363
GO:0060135	maternal process involved in female pregnancy	7/70	0.0363
GO:0002573	myeloid leukocyte differentiation	9/111	0.0367
GO:0043067	regulation of programmed cell death	53/1595	0.0375
GO:1903037	regulation of leukocyte cell-cell adhesion	15/274	0.038
GO:0050866	negative regulation of cell activation	12/191	0.0381
GO:0042981	regulation of apoptotic process	52/1571	0.0385
GO:0043153	entrainment of circadian clock by photoperiod	4/20	0.0397
GO:0045123	cellular extravasation	5/35	0.041
GO:0001568	blood vessel development	22/499	0.0421
GO:1903038	negative regulation of leukocyte cell-cell adhesion	9/120	0.0429
GO:0014074	response to purine-containing compound	11/167	0.0433
GO:0008630	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	7/75	0.0436
GO:0010941	regulation of cell death	56/1733	0.0438
GO:0002695	negative regulation of leukocyte activation	11/169	0.0441
GO:1902106	negative regulation of leukocyte differentiation	8/95	0.0451
GO:0042035	regulation of cytokine biosynthetic process	8/98	0.0465
GO:0030728	ovulation	4/22	0.0467

GO:0006954	inflammatory response	20/437	0.0474
GO:0009968	negative regulation of signal transduction	40/1143	0.0482

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ3: Βιολογικές διεργασίες που ρυθμίζονται από τη δεξαμεθαζόνη και την ένωση AZD9567. Για κάθε βιολογική διεργασία παρουσιάζονται οι σχετικοί όροι της GO και ο αριθμός των σχετικών διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων για κάθε κατεργασία.

BIOLOGICAL PROCESSES	GO terms		Related genes	
	DEX	AZD9567	DEX	AZD9567
RESPONSE TO GCs	response to glucocorticoid		13	
	response to corticosteroid			
FAT CELL DIFFERENTIATION	regulation of fat cell differentiation		20	
	brown fat cell differentiation			
	positive regulation of fat cell differentiation			
	fat cell differentiation			
CELL DEATH	positive regulation of cell death	negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors	56	9
	positive regulation of apoptotic process			
	positive regulation of programmed cell death			
	regulation of programmed cell death			
	regulation of apoptotic process			
	intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage			
	regulation of cell death			
CIRCADIAN RHYTHM	circadian rhythm	circadian rhythm	16	26
	circadian regulation of gene expression			
	rhythmic process			
	entrainment of circadian clock by photoperiod			
RESPONSE TO LPS	response to lipopolysaccharide	cellular response to lipopolysaccharide	18	56
	cellular response to lipopolysaccharide	response to lipopolysaccharide		
LEUKOCYTE CELL ADHESION	regulation of leukocyte cell-cell adhesion	positive regulation of	15	40

		leukocyte cell-cell adhesion		
	negative regulation of leukocyte cell-cell adhesion	regulation of leukocyte cell-cell adhesion		
LEUKOCYTE DIFFERENTIATION	positive regulation of leukocyte differentiation	regulation of leukocyte differentiation	26	74
	regulation of leukocyte differentiation	positive regulation of leukocyte differentiation		
	leukocyte differentiation	leukocyte differentiation		
	myeloid leukocyte differentiation	myeloid leukocyte differentiation		
	negative regulation of leukocyte differentiation			
INFLAMMATORY RESPONSE	regulation of inflammatory response	regulation of inflammatory response	33	99
	positive regulation of inflammatory response	inflammatory response		
	inflammatory response	regulation of inflammatory response to antigenic stimulus		
		negative regulation of inflammatory response		
		positive regulation of inflammatory response		
REGULATION OF CYTOKINE PRODUCTION	regulation of cytokine biosynthetic process	regulation of cytokine production	8	103
		positive regulation of cytokine production		
		regulation of cytokine secretion		
		regulation of tumor necrosis factor production		
		negative regulation of cytokine production		

		positive regulation of cytokine secretion		
		positive regulation of interleukin-10 production		
		positive regulation of interleukin-6 production		
		positive regulation of tumor necrosis factor production		
		regulation of interleukin-1 production		
		positive regulation of tumor necrosis factor superfamily cytokine production		
		regulation of cytokine production involved in immune response		
		regulation of interleukin-6 production		
		cytokine production		
		regulation of interleukin-10 production		
		regulation of interleukin-1 beta production		
		regulation of interleukin-1 secretion		
DEFENCE RESPONSE	regulation of defense response	regulation of defense response	27	169
	positive regulation of defense response	positive regulation of defense response		
		negative regulation of defense response		

		defense response		
IMMUNE RESPONSE		regulation of adaptive immune response		251
		activation of innate immune response		
		positive regulation of innate immune response		
		positive regulation of adaptive immune response		
		innate immune response-activating signal transduction		
		regulation of innate immune response		
		regulation of adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains		
		positive regulation of adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains		
		regulation of immune response		
		regulation of production of molecular mediator of immune response		

		positive regulation of immune response		
--	--	--	--	--

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ4: Γονίδια που εκφράζονται διαφορετικά σε κύτταρα RAW264.7 παρουσία δεξαμεθαζόνης και σχετίζονται με τη βιολογική διεργασία 'απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή'. Τα κομβικά γονίδια δηλώνονται με έντονα γράμματα.

RESPONSE TO GC			
Gene	DEX_FC	Gene	DEX_FC
Adm	3.54	Pik3r1	0.5
Ccl2	-1.17	Ptgs2	-1.67
Cxcl2	-1.86	Sgk1	2.42
Ddit4	4.33	Tnf	-2.76
Dusp1	3.59	Zfp36	-0.94
Fosl1	-0.99	Zfp36l1	0.75
Klf9	1.46		

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ5: Γονίδια που εκφράζονται διαφορετικά σε κύτταρα RAW264.7 παρουσία δεξαμεθαζόνης και σχετίζονται με τη βιολογική διεργασία 'διαφοροποίηση λιποκυττάρων'. Τα κομβικά γονίδια δηλώνονται με έντονα γράμματα.

FAT CELL DIFFERENTIATION	
Gene	DEX_FC
Adrb2	1.01
Bbs12	1.19
Cebpa	0.58
Cebpb	0.59
Egr2	-2.37
Fabp4	2.23
Htr2a	2.11
Jag1	1.68
Jdp2	1.33
Klf4	3.13
Napepld	0.99
Nr1d1	-0.61
Nr4a1	1.84
Pex11a	0.6
Ptgs2	-1.67
Rgs2	-0.8
Tnf	-2.76
Zc3h12a	1.42
Zfp36	-0.94
Zfp36l1	0.75

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ6: Γονίδια που εκφράζονται διαφορεικά σε κύτταρα RAW264.7 παρουσία δεξαμεθαζόνης ή της ένωσης AZD9567 και σχετίζονται με τη βιολογική διεργασία 'κυτταρικός θάνατος'. Τα κομβικά γονίδια δηλώνονται με έντονα γράμματα.

CELL DEATH					
Gene	AZD9567_FC	DEX_FC	Gene	AZD9567_FC	DEX_FC
Adm		3.54	Klf4		3.13
Adrb2		1.01	Lpar1		0.61
B4galt1		0.53	Mertk		1.15
Bbc3		-0.71	Mrtfa		0.52
Bcl2l1		0.79	Net1		0.53
Bcl3		-0.78	Nfkbid		-1.07
Bcl6		-0.51	Nr4a1		1.84
Bmf		1.12	Nupr1		-0.78
Btg2		-1.33	Osm		-0.79
C1qa		0.93	Pea15a	-0.63	
Ccl3		-0.61	Pik3r1		0.5
Cebpb		0.59	Pim1		-1.02
Cflar	-0.83		Plaur		-0.59
Cited2		0.93	Plk2		-0.83
Ddit4		4.33	Ptgs2		-1.67
Dusp1		3.59	Rapgef2		0.62
Egr1		-1.69	Rhob		1.32
Egr3		-1.06	Serpine1	1.45	3.22
Fam72a		0.89	Sgk1		2.42
Fos1		-0.99	Socs3		-1
Ghrl		-1.19	Stk17b		1.08
Glrx		0.85	Tnf		-2.76
Gpx1	-0.93		Tnfaip3	-1.05	
Hmgb2	0.79		Tnfrsf12a		-0.76
Hmox1	-0.61		Traf1		-0.72
Icam1	-0,7	-0.55	Trp53inp1		0.83
Id3		-0.96	Tsc22d3		3.36
Ier3		-1.95	Wfs1		0.74
Irak2		-0.62	Zc3h12a		1.42
Irf1		-0.96	Zfp36		-0.94
Itga5		0.65	Zfp36l1		0.75
Itrip1	0.56				

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ7: Γονίδια που εκφράζονται διαφορεικά σε κύτταρα RAW264.7 παρουσία δεξαμεθαζόνης ή της ένωσης AZD9567 και σχετίζονται με τη βιολογική διεργασία 'κίρκάδιος ρυθμός'. Τα κομβικά γονίδια δηλώνονται με έντονα γράμματα.

CIRCADIAN RHYTHM		
Gene	AZD9567_FC	DEX_FC
Adamts1		-0.83
Ahcy	0.66	
Bhlhe40	-0.66	-1
Bhlhe41	-1.1	-0.71
Ciart	0.61	1.19
Cry2	0.63	
Egr1	0.7	-1.69
Egr2		-2.37
Fas	-0.51	
Gpr157	-0.8	
Gpr176	-0.55	
Id2	-0.57	
Id3		-0.96
Igf1	-0.84	
Impdh2	0.58	
Jun	-0.57	
Klf10	-0.7	-0.51
Klf9	1.87	1.46
Mmp19		0.55
Mttp	0.68	
Nfil3	1.12	1.6
Nr1d1	-1.05	-0.61
Per1	1.96	2.53
Per2		0.71
Prokr1	-0.98	
Rbm4	0.54	
Relb	-0.64	
Sik1		2.07
Srd5a1	0.78	
Star	0.64	
Timeless	0.62	
Usp2	0.68	1.09

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ8: Γονίδια που εκφράζονται διαφορετικά σε κύτταρα RAW264.7 παρουσία δεξαμεθαζόνης ή της ένωσης AZD9567 και σχετίζονται με τη βιολογική διεργασία 'διαφοροποίηση λευκοκυττάρων'. Τα κομβικά γονίδια δηλώνονται με έντονα γράμματα.

LEUKOCYTE DIFFERENTIATION					
Gene	AZD9567_FC	DEX_FC	Gene	AZD9567_FC	DEX_FC
Anxa1	-0.54		Jun	-0.57	
B2m	-0.72		Junb	-0.6	-1.32
Batf2	-0.83		Kitl	-0.73	
Bcl3	-1.16	-0.78	Klf10	-0.7	-0.51
Bcl6		-0.51	Lfng		-0.58
C1qc	-1.3	0.76	Lgals1	-0.61	
Car2	0.7		Lgals8	-0.52	
Ccl3		-0.61	Lgals9	-1.35	
Cd24a	0.75		Loxl3	-0.53	
Cd28	-0.88		Lrrc17	-0.97	
Cd74	0.52		Mertk	-0.54	1.15
Cd83	-0.81	-0.69	Mmp14	-2.15	
Cd300lf		1.08	Msh2	0.57	
Cebpa	0.58		Myc	-2.32	
Cebpb	0.59		Nfkbid		-1.07
Cited2	1.58	0.93	Nfkbiz	-0.58	
Clec2d	-2.3		Nlrp3	-0.73	
Clec4d	-0.83		Nrros	-0.78	-0.53
Clec4e	-0.69		Ocstamp	1.04	
Dclre1c	-0.57		Pf4	-0.66	
Dcstamp	0.78		Pik3r1		0.5
Dtx1	1.15		Pirb	-1.19	
Dusp10	0.57		Ptpn22		0.68
Egr1	0.7	-1.69	Ptger4	-0.64	
Egr3	0.85	-1.06	Relb	-0.64	
Fam20c	-0.7		Rras	-0.53	
Fanca	0.51		Sash3	-1.09	
Fancd2	0.75		Sbno2	-0.62	
Fas	-0.51		Siglec15	-0.87	
Fcer1g	-0.56		Src	-1.14	
Fos	-0.76		Tfrc	-0.62	
Gab3	-0.54	0.96	Tlr9	-0.54	
Gas6	-1.14		Tnf	-2.36	-2.76
Gata3	-0.85		Tnfaip3	-1.05	
Gpr183	-0.85		Tnfsf9	-0.64	-1.07
Hdac7	-0.73		Trib1		1.17
Hhex		-0.73	Trf	-0.74	
Id2	-0.57		Vegfa	1.27	
Il15	-0.66		Wwp1	-1.02	

Il15ra	0.7	2.25	Zc3h8	0.74	
Il7r	-0.9		Zc3h12a		1.42
Irf1	-0.73	-0.96	Zfp361l1		0.75
Jag2	1.04				

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ9: Γονίδια που εκφράζονται διαφορετικά σε κύτταρα RAW264.7 παρουσία δεξαμεθαζόνης ή της ένωσης AZD9567 και σχετίζονται με τη βιολογική διεργασία 'πρόσφυση λευκοκυττάρων'. Τα κομβικά γονίδια δηλώνονται με έντονα γράμματα.

LEUKOCYTE CELL-CELL ADHESION					
Gene	ACD9567_FC	DEX_FC	Gene	ACD9567_FC	DEX_FC
Aif1	-1.36		Irf1	-0.73	-0.96
Anxa1	-0.54		Itga4	0.76	
Bcl6	-0.73	-0.51	Klf4	1.54	3.13
Cav1	-1.02		Lgals1	-0.61	
Ccl2		-1.17	Lgals8	-0.52	
Ccl25	0.71		Lgals9	-1.35	
Cd24a	0.75		Loxl3	-0.53	
Cd274	-1.52		Nck2	-1.27	
Cd28	-0.88		Nfat5	0.74	
Cd74	0.52		Nfkbid		-1.07
Cd80	-0.67		Nfkbiz	-0.58	
Cd83	-0.81	-0.69	Nlrp3	-0.73	
Cebpb		0.59	Ptafr	-1.64	
Dtx1	1.15		Ptpn22		0.68
Dusp10	0.57		Pycard	1.64	
Egr3	0.85	-1.06	Sash3	-1.09	
Gata3	-0.85		Sdc4		0.71
Gstp1	-0.57		Tfrc	-0.62	
H2-T23	-0.76		Tnf	-2.36	-2.76
Havcr2		0.59	Tnfaip8l2	-0.53	
Icam1	-0.7	-0.55	Tnfsf9	-0.64	
Igf1	-0.84		Tnfsf9		-1.07
Il15	-0.66		Zc3h12a		1.42
Il7r	-0.9		Zc3h8	0.74	

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ10: Γονίδια που εκφράζονται διαφορετικά σε κύτταρα RAW264.7 παρουσία δεξαμεθαζόνης ή της ένωσης AZD9567 και σχετίζονται με τη βιολογική διεργασία 'απόκριση στο LPS'. Τα κομβικά γονίδια δηλώνονται με έντονα γράμματα.

RESPONSE TO LPS					
Gene	ACD9567_FC	DEX_FC	Gene	ACD9567_FC	DEX_FC
Abca1	-0.83		Litaf	-0.62	
Acod1	-0.99		Ly96	-0.66	
Adm		3.54	Mrc1	-1.73	
Arid5a	0.78		Ncl	0.56	
Casp1	-0.76		Nlrp3	-0.73	
Ccl2		-1.17	Nod2	-0.54	
Ccl3		-0.61	Nr1d1	-1.05	-0.61
Cd180	-0.67		Nr1h3	-0.59	
Cd274	-1.52		Pde4b	-1.47	-0.7
Cd36	-1.35		Pf4	-0.66	
Cd80	-0.67		Ptafr	-1.64	
Cebpb		0.59	Ptger4	-0.64	
Cmpk2	-1.1		Ptgir	-1.13	
Cnr2	-0.69	0.52	Ptgs2	-1.84	-1.67
Cpeb1	-2.04		Ptpn22		0.68
Cx3cr1	0.62		Pycard	1.64	
Cxcl10	-0.68		Sbno2	-0.62	
Cxcl16	-0.56		Serpine1	1.45	3.22
Cxcl2	-1.92	-1.86	Sgms1		0.99
Dusp10	0.57		Slc11a1	-0.84	
Fcgr4	-1.2		Src	-1.14	
Fos	-0.76		Star	0.64	
Gstp1	-0.57		Thbd	-1.49	1.37
Havcr2		0.59	Tlr2	-0.5	
Hmgb2	0.79		Tlr4	-0.56	
Il10	-2.7		Tlr9	-0.54	
Il10ra	-0.82		Tnf	-2.36	-2.76
Irak2	-0.56	-0.62	Tnfaip3	-1.05	
Irgm2	-0.92		Tnfrsf1b	-0.66	
Jun	-0.57		Tnip3	-0.62	
Junb	-0.6	-1.32	Zfp36	-0.73	-0.94
Lgals9	-1.35				

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ11: Γονίδια που εκφράζονται διαφορετικά σε κύτταρα RAW264.7 παρουσία δεξαμεθαζόνης ή της ένωσης AZD9567 και σχετίζονται με τη βιολογική διεργασία 'φλεγμονώδης απόκριση'. Τα κομβικά γονίδια δηλώνονται με έντονα γράμματα.

INFLAMMATORY RESPONSE					
Gene	ACD9567_FC	DEX_FC	Gene	ACD9567_FC	DEX_FC
Adora2b	-0.67	-0.82	Il15	-0.66	
Adrb2		1.01	Il18rap		0.85
Ahcy	0.66		Irak2	-0.56	-0.62
Aif1	-1.36		Jam3	1.4	
Alox5ap	-0.56		Jun	-0.57	
Anxa1	-0.54		Ldlr	-0.56	
Aoah	-1.15		Lgals9	-1.35	
Apoe	0.51		Lipa	-0.52	
B4galt1		0.53	Loxl3	-0.53	
Bcl6	-0.73	-0.51	Lxn	-0.59	
Bst1	-0.79		Ly96	-0.66	
C1qa	-0.96	0.93	Metrn1	-1.1	
C3	-0.93		Mfhas1	-0.56	
C3ar1	-1.45		Mmp8	1.99	
Casp1	-0.76		Napepld		0.99
Casp4	-0.93		Ndst1	-0.74	
Ccl2		-1.17	Nfkbid		-1.07
Ccl25	0.71		Nfkbiz	-0.58	
Ccl3		-0.61	Nlrc4	-0.59	
Ccl4		-0.66	Nlrp3	-0.73	
Ccl6	-0.94		Nod2	-0.54	
Ccl2	-1.81		Nr1h3	-0.59	
Cd180	-0.67		Nrros	-0.78	-0.53
Cd200r1	-1.06		Nupr1	-0.65	-0.78
Cd200r4	-0.69		Osm	-2.01	-0.79
Cd24a	0.75		Per1	1.96	2.53
Cd28	-0.88		Pf4	-0.66	
Cd5l	-0.79		Pik3ap1	-0.63	
Cebpa		0.58	Ptafr	-1.64	
Cebpb		0.59	Ptger4	-0.64	
Ciita		-1.62	Ptgir	-1.13	
Clu	-0.62		Ptgs2	-1.84	-1.67
Cnr2	-0.69	0.52	Pycard	1.64	
Ctss	-0.53		Relb	-0.64	
Cx3cr1	0.62		Saa3	-0.69	0.84
Cxcl10	-0.68		Sbno2	-0.62	
Cxcl2	-1.92	-1.86	Serpib9	-1.35	
Dusp10	0.57		Serpine1	1.45	3.22

Ecm1	-0.71		Setd6	0.51	
Fabp4		2.23	Sgms1		0.99
Fanca	0.51		Slc11a1	-0.84	
Fancd2	0.75		Socs3		-1
Fcer1g	-0.56		Tgm2	-0.96	
Fpr2	-2.11		Themis2	-0.51	
Gata3	-0.85		Tlr2	-0.5	
Ghrl		-1.19	Tlr3	-0.68	
Gpr17	-1.54		Tlr4	-0.56	
Gpx1	-0.93		Tlr6	-0.55	
Gstp1	-0.57		Tlr8	-0.8	
H2-T23	-0.76		Tlr9	-0.54	
Havcr2		0.59	Tnf	-2.36	-2.76
Hdac7	-0.73		Tnfaip3	-1.05	
Hmgb2	0.79		Tnfaip8l2	-0.53	
Hmox1	-0.61		Tnfrsf1b	-0.66	
Icam1	-0.7	-0.55	Unc13d	-0.73	
Ifi202b	-1.52		Usp18	-0.69	
Igf1	-0.84		Zc3h12a		1.42
Il10	-2.7		Zfp36	-0.73	-0.94

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ12: Γονίδια που εκφράζονται διαφορεικά σε κύτταρα RAW264.7 παρουσία δεξαμεθαζόνης ή της ένωσης AZD9567 και σχετίζονται με τη βιολογική διεργασία 'παραγωγή κυτοκινών'. Τα κομβικά γονίδια δηλώνονται με έντονα γράμματα.

CYTOKINE PRODUCTION					
Gene	ACD9567_FC	DEX_FC	Gene	ACD9567_FC	DEX_FC
Abca1	-0.83		Klf4	1.54	3.13
Adam33	-1.11		Lgals9	-1.35	
Adora2b	-0.67		Lipa	-0.52	
Aif1	-1.36		Litaf	-0.62	
Anxa1	-0.54		Lurap1	0.69	
Arid5a	0.78		Ly96	-0.66	
B2m	-0.72		Maf	-1.16	
Bcl3	-1.16	-0.78	Mcoln2	-0.75	
Bcl6	-0.73		Mertk	-0.54	
C3	-0.93		Mmp12	-1.98	
C3ar1	-1.45		Mmp8	1.99	
Casp1	-0.76		Mr1	-0.54	
Casp4	-0.93		Ncl	0.56	
Cd200r1	-1.06		Ndrp2	0.77	
Cd24a	0.75		Nfat5	0.74	
Cd274	-1.52		Nfatc2ip	0.59	
Cd28	-0.88		Nlrc4	-0.59	
Cd300c2	-0.92		Nlrp3	-0.73	
Cd36	-1.35		Nod1	-0.92	
Cd74	0.52		Nod2	-0.54	
Cd83	-0.81		Nrros	-0.78	
Cd84	-1.07		Osm	-2.01	
Cebpb		0.59	Panx1	-0.56	
Clec4a2	-0.88		Pde4b	-1.47	
Clec4e	-0.69		Per1	1.96	
Clec4n	-1.48		Pf4	-0.66	
Clu	-0.62		Ptafr	-1.64	
Cx3cr1	0.62		Ptger4	-0.64	
Ddx58	-0.75		Ptgs2	-1.84	
Ddx60	-0.64		Pycard	1.64	
Dhx58	-0.73		Relb	-0.64	
Egr1	0.7	-1.69	Rnf128	-0.81	
Fcer1g	-0.56		Sash3	-1.09	
Gas6	-1.14		Serpine1	1.45	
Gata3	-0.85		Slc11a1	-0.84	
Ghrl	-1.19	-1.19	Src	-1.14	
Gstp1	-0.57		Srgn	0.54	
H2-T23	-0.76		Stat1	-0.63	
Hdac7	-0.73		Tlr2	-0.5	

Hdac9	0.81		Tlr3	-0.68	
Hmgb2	0.79		Tlr4	-0.56	
Hmox1	-0.61		Tlr6	-0.55	
Homer3	-0.57		Tlr8	-0.8	
Hpse	-0.68		Tlr9	-0.54	
Ifih1	-0.7		Tnf	-2.36	-2.76
Igf1	-0.84		Tnfaip3	-1.05	
Il10	-2.7		Tnfrsf1b	-0.66	
Il15	-0.66		Tnfsf9	-0.64	
Irf1	-0.73	-0.96	Traip	0.72	
Irf7	-1.36		Trim16	-0.98	
Irf9	-0.67		Trim30a	-0.91	
Isg15	-1.14		Zfp36	-0.73	-0.94

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ13: Γονίδια που εκφράζονται διαφορετικά σε κύτταρα RAW264.7 παρουσία δεξαμεθαζόνης ή της ένωσης AZD9567 και σχετίζονται με τη βιολογική διεργασία 'αμυντική απόκριση'. Τα κομβικά γονίδια δηλώνονται με έντονα γράμματα.

DEFENCE RESPONSE					
Gene	ACD9567_FC	DEX_FC	Gene	ACD9567_FC	DEX_FC
9930111J21Rik2	-0.71		Il18rap		0.85
Acod1	-0.99		Irak2	-0.56	-0.62
Adora2b	-0.67	-0.82	Irf1	-0.73	-0.96
Adrb2		1.01	Irf7	-1.36	
Ahcy	0.66		Irgm1	-1.08	
Aif1	-1.36		Irgm2	-0.92	
Alox5ap	-0.56		Isg15	-1.14	
Anxa1	-0.54		Jam3	1.4	
Anxa3	-0.64		Jun	-0.57	
Aoah	-1.15		Ldlr	-0.56	
Apoe	0.51		Lgals8	-0.52	
Arid5a	0.78		Lgals9	-1.35	
B2m	-0.72		Lipa	-0.52	
Batf2	-0.83		Loxl3	-0.53	
Bcl3	-1.16		Lxn	-0.59	
Bcl6	-0.73	-0.51	Ly96	-0.66	
Bnip3	0.75		Lyz2	-0.51	
Bst1	-0.79		Masp2	1.02	
C1qa	-0.96	0.93	Mcoln2	-0.75	
C1qb	-1.39		Metrnl	-1.1	
C1qc	-1.3		Mfhas1	-0.56	
C3	-0.93		Mmp12	-1.98	
C3ar1	-1.45		Mmp8	1.99	
Casp1	-0.76		Mr1	-0.54	
Casp4	-0.93		Mrc1	-1.73	
Cav1	-1.02		Myc	-2.32	
Ccl25	0.71		Napepld		0.99
Ccl3		-0.61	Ndst1	-0.74	
Ccl6	-0.94		Nfkbiz	-0.58	
Ccrl2	-1.81		Nlrc4	-0.59	
Cd180	-0.67		Nlrp3	-0.73	
Cd200r4	-0.69		Nod1	-0.92	
Cd24a	0.75		Nod2	-0.54	
Cd28	-0.88		Nr1d1	-1.05	-0.61
Cd300ld3	-0.93		Nr1h3	-0.59	
Cd300lf		1.08	Nrros	-0.78	
Cd36	-1.35		Nupr1	-0.65	-0.78
Cd5l	-0.79		Oas1a	-0.57	
Cd74	0.52		Oas2	-0.83	

Cdc42ep2	-1.73		Oas3	-0.6	
Cebpa		0.58	Oasl1	-0.53	
Cebpb		0.59	Oasl2	-1.77	
Clec2d	-2.3		Osm	-2.01	-0.79
Clec4a2	-0.88		Parp14	-0.85	
Clec4d	-0.83		Per1	1.96	2.53
Clec4e	-0.69		Pf4	-0.66	
Clec4n	-1.48		Pik3ap1	-0.63	
Clu	-0.62		Prdx1	-0.51	
Cnr2	-0.69	0.52	Ptafr	-1.64	
Ctss	-0.53		Ptger4	-0.64	
Cx3cr1	0.62		Ptgir	-1.13	
Cxcl10	-0.68		Ptgs2	-1.84	-1.67
Cxcl16	-0.56		Ptpn22		0.68
Cxcl2	-1.92		Pycard	1.64	
Ddit4	2.78		Rab20	-0.86	
Ddx58	1.19		Relb	-0.64	
Ddx60	-0.64		Rnasel	-0.88	
Dhx58	-0.73		Rtp4	-1.95	
Dusp10	0.57		Saa3	-0.69	
Ecm1	-0.71		Sbno2	-0.62	
Fabp4		2.23	Serpib9	-1.35	
Fanca	0.51		Serpine1	1.45	3.22
Fancd2	0.75		Setd6	0.51	
Fcer1g	-0.56		Shmt2	1.16	
Fpr2	-2.11		Slc11a1	-0.84	
Gata3	-0.85		Slnf8	-0.76	
Ghrl		-1.19	Socs3		-1
Gm5431	-1.37		Spink5	1.19	
Gng7	-0.59		Stab1	-0.92	
Gpr17	-1.54		Star	0.64	
Gpx1	-0.93		Stat1	-0.63	
Gstp1	-0.57		Tgm2	-0.96	
H2-K1	-0.77		Themis2	-0.51	
H2-T23	-0.76		Tifa	-0.9	
Havcr2		0.59	Tlr2	-0.5	
Hdac7	-0.73		Tlr3	-0.68	
Herc6	-0.5		Tlr4	-0.56	
Hmgb2	0.79		Tlr6	-0.55	
Hmox1	-0.61		Tlr8	-0.8	
Icam1	-0.7		Tlr9	-0.54	
Ifi202b	-1.52		Tnf	-2.36	-2.76
Ifi203	-0.52		Tnfaip3	-1.05	
Ifi204	-1.07		Tnfaip8l2	-0.53	
Ifi211	-1.05		Tnfrsf1b	-0.66	

lfi47	-0.75		Tnip3	-0.62	
lfi1	-0.7		Trim12c	-0.79	
lfitm6	0.52		Trim30a	-0.91	
lgi1	-0.84		Unc13d	-0.73	
lgtp	-0.7		Usp18	-0.69	
li10	-2.7		Zc3h12a		1.42
li15	-0.66		Zfp36	-0.73	-0.94

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ14: Γονίδια που εκφράζονται διαφορεικά σε κύτταρα RAW264.7 παρουσία της ένωσης AZD9567 και σχετίζονται με τη βιολογική διεργασία 'ανοσολογική απόκριση'. Τα κομβικά γονίδια δηλώνονται με έντονα γράμματα.

IMMUNE RESPONSE			
Gene	ACD9567_FC	Gene	ACD9567_FC
Acod1	-0.99	Il15	-0.66
Adora2b	-0.67	Il7r	-0.9
Anxa1	-0.54	Irak2	-0.56
Apoe	0.51	Irf1	-0.73
Arid5a	0.78	Irf7	-1.36
B2m	-0.72	Irgm1	-1.08
Bcar1	1.66	Irgm2	-0.92
Bcl6	-0.73	Lgals9	-1.35
C1qa	-0.96	Loxl3	-0.53
C1qb	-1.39	Ly96	-0.66
C1qc	-1.3	Masp2	1.02
C3	-0.93	Mmp12	-1.98
C3ar1	-1.45	Msh2	0.57
Cd180	-0.67	Nfkbiz	-0.58
Cd24a	0.75	Nlrc4	-0.59
Cd274	-1.52	Nlrp3	-0.73
Cd28	-0.88	Nod1	-0.92
Cd300ld3	-0.93	Nod2	-0.54
Cd36	-1.35	Nr1d1	-1.05
Cd5l	-0.79	Nr1h3	-0.59
Cd74	0.52	Parp14	-0.85
Cd84	-1.07	Parp3	-0.55
Clec2d	-2.3	Pde4b	-1.47
Clec4d	-0.83	Pik3ap1	-0.63
Clec4e	-0.69	Ptafr	-1.64
Cmtm3	-0.54	Pycard	1.64
Ddx58	-0.75	Rtn4	-0.58
Ddx60	-0.64	Samsn1	-0.68
Dhx58	-0.73	Sash3	-1.09
Dusp10	0.57	Serpnb9	-1.35
Ecm1	-0.71	Shld1	-0.56
Fcer1g	-0.56	Slc11a1	-0.84
Fcgr4	-1.2	Spink5	1.19
Fpr2	-2.11	Tfrc	-0.62
Gata3	-0.85	Themis2	-0.51
Gm8909	-0.81	Tifa	-0.9
Gpr17	-1.54	Tlr2	-0.5
Gpx1	-0.93	Tlr3	-0.68
H2-D1	-0.86	Tlr4	-0.56

H2-K1	-0.77	Tlr6	-0.55
H2-Q1	-0.93	Tlr8	-0.8
H2-Q2	-0.74	Tlr9	-0.54
H2-T23	-0.76	Tnf	-2.36
H2-T24	-1.08	Tnfaip3	-1.05
Hmgb2	0.79	Tnfrsf1b	-0.66
Hmox1	-0.61	Tnfsf13	-1.05
Ifi202b	-1.52	Tnip3	-0.62
Ifi203	-0.52	Trim12c	-0.79
Ifi204	-1.07	Trim30a	-0.91
Ifi211	-1.05	Unc13d	-0.73
Ifih1	-0.7	Ung	0.51
Il10	-2.7	Vav3	-0.53

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ15: Κομβικά γονίδια για το σύνολο των 339 γονιδίων που επάγονται από το LPS και καταστέλλονται από τη συγχρόνηση της δεξαμεθαζόνης σε κύτταρα RAW264.7.

Rank	Gene Symbol	Definition	Systemic Processes	Fold Change	Pvalue
1	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	16	4.08	2.24e-16
2	Tnf	tumor necrosis factor	15	2.97	4.22e-21
3	Jun	jun proto-oncogene	14	3.43	2.41e-22
4	Il1b	interleukin 1 beta	14	5.05	1.24e-11
5	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	13	4.84	1.57e-17
6	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	13	3.77	3.48e-19
7	Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	13	1.42	1.36e-12
8	Myc	myelocytomatosis oncogene	11	-0.17	0.826
9	Rela	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	10	0.49	0.000387
10	Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	10	4.03	2.61e-21
11	Hmox1	heme oxygenase 1	10	0.24	0.7
12	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene	9	3.05	1.26e-20
13	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7	9	4.51	3.66e-7
14	Il10	interleukin 10	9	0.52	0.138
15	Cd40	CD40 antigen	9	2.19	3.1e-14
16	Zfp36	zinc finger protein 36	8	2.98	3.92e-20
17	Irf1	interferon regulatory factor 1	7	0.96	2.75e-9
18	Xcl1	chemokine (C motif) ligand 1	7	5.32	0.00000532
19	Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	7	5.65	1.74e-9
20	Egfr	epidermal growth factor receptor	7	8.76	3.48e-8
21	H2-Q7	histocompatibility 2, Q region locus 7	4	0.91	0.000829

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ16: Κομβικά γονίδια για το σύνολο των 187 γονιδίων που επάγονται από το LPS και καταστέλλονται από τη συγχρόνηση της ένωσης AZD9567 σε κύτταρα RAW264.7.

Rank	Gene Symbol	Definition	Systemic Processes	Fold Change	Pvalue
1	Il1b	interleukin 1 beta	15	7.14	6.25e-17
2	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	14	3.9	5.05e-16
3	Tnf	tumor necrosis factor	14	3.58	1.25e-22
4	Xcl1	chemokine (C motif) ligand 1	10	4.87	0.0000516
5	Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	10	1	2.33e-9
6	Il10	interleukin 10	9	0.44	0.31
7	Ptpn22	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)	9	0.06	1
8	Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist	8	-0.19	1
9	Nlrp3	NLR family, pyrin domain containing 3	7	2.82	1.16e-21
10	Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	7	2.65	0.00017
11	Ifnb1	interferon beta 1, fibroblast	6	6.69	0.000109
12	Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4	6	3.98	2.28e-21
13	Il1a	interleukin 1 alpha	6	6.69	4.89e-16
14	Irf1	interferon regulatory factor 1	5	1.16	4.86e-11
15	Ifih1	interferon induced with helicase C domain 1	5	0.47	0.008
16	Nfkbid	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, delta	4	1.29	9.6e-12
17	Rela	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	4	0.34	0.128
18	Pde4b	phosphodiesterase 4B, cAMP specific	4	0.35	0.184
19	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	4	6.71	2.92e-21

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ17: Λίστα των σημαντικά εμπλουτισμένων όρων της GO (GO terms) για τα 339 γονίδια που επάγονται από το LPS και καταστέλλονται από τη συγχορήγηση της δεξαμεθαζόνης σε κύτταρα RAW264.7.

Term id	Term Definition	Enrichment	Corrected pvalue
GO:0009612	response to mechanical stimulus	24/222	0.0004
GO:0070555	response to interleukin-1	17/126	0.0012
GO:2000503	positive regulation of natural killer cell chemotaxis	5/6	0.0017
GO:0071347	cellular response to interleukin-1	14/96	0.0026
GO:0034097	response to cytokine	50/839	0.0028
GO:1902107	positive regulation of leukocyte differentiation	18/160	0.0032
GO:0071674	mononuclear cell migration	9/40	0.0041
GO:1903708	positive regulation of hemopoiesis	20/197	0.0044
GO:0034341	response to interferon-gamma	16/133	0.0047
GO:2000501	regulation of natural killer cell chemotaxis	5/8	0.0048
GO:0002711	positive regulation of T cell mediated immunity	11/65	0.0058
GO:0002824	positive regulation of adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	15/128	0.007
GO:0034612	response to tumor necrosis factor	18/182	0.0073
GO:1990266	neutrophil migration	12/83	0.0075
GO:0014074	response to purine-containing compound	17/167	0.0086
GO:0002548	monocyte chemotaxis	8/35	0.0086
GO:0002821	positive regulation of adaptive immune response	15/134	0.0106
GO:0071346	cellular response to interferon-gamma	13/106	0.011
GO:0002709	regulation of T cell mediated immunity	12/88	0.0113
GO:0030593	neutrophil chemotaxis	11/74	0.0115
GO:0002763	positive regulation of myeloid leukocyte differentiation	10/61	0.0119
GO:0002699	positive regulation of immune effector process	20/233	0.0123
GO:0002486	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I via ER pathway, TAP-independent	7/28	0.013
GO:0048661	positive regulation of smooth muscle cell proliferation	13/109	0.0134
GO:0071356	cellular response to tumor necrosis factor	16/157	0.0135
GO:0048245	eosinophil chemotaxis	6/19	0.0135
GO:0097530	granulocyte migration	12/92	0.0138
GO:0002708	positive regulation of lymphocyte mediated immunity	14/128	0.0159
GO:0046683	response to organophosphorus	15/143	0.0161
GO:0002428	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class Ib	7/30	0.0162
GO:0045639	positive regulation of myeloid cell differentiation	12/94	0.0165
GO:0072677	eosinophil migration	6/20	0.0167
GO:0010942	positive regulation of cell death	39/683	0.0178
GO:0048660	regulation of smooth muscle cell proliferation	16/167	0.02
GO:0001916	positive regulation of T cell mediated cytotoxicity	8/42	0.0201

GO:0071621	granulocyte chemotaxis	11/81	0.0204
GO:0006954	inflammatory response	29/437	0.021
GO:0043620	regulation of DNA-templated transcription in response to stress	9/56	0.021
GO:0061469	regulation of type B pancreatic cell proliferation	5/13	0.0224
GO:0009636	response to toxic substance	32/516	0.0242
GO:0031343	positive regulation of cell killing	11/86	0.0242
GO:0002475	antigen processing and presentation via MHC class Ib	7/32	0.0246
GO:0051591	response to cAMP	12/104	0.025
GO:0031331	positive regulation of cellular catabolic process	24/342	0.0251
GO:0048247	lymphocyte chemotaxis	8/43	0.0252
GO:1903706	regulation of hemopoiesis	26/390	0.0256
GO:0001914	regulation of T cell mediated cytotoxicity	8/47	0.0262
GO:0002761	regulation of myeloid leukocyte differentiation	13/123	0.0267
GO:0070098	chemokine-mediated signaling pathway	10/75	0.0271
GO:0001912	positive regulation of leukocyte mediated cytotoxicity	10/73	0.0272
GO:1902105	regulation of leukocyte differentiation	21/279	0.0273
GO:0002819	regulation of adaptive immune response	16/188	0.0284
GO:0031960	response to corticosteroid	16/189	0.0289
GO:0043068	positive regulation of programmed cell death	35/628	0.0301
GO:0097529	myeloid leukocyte migration	12/111	0.031
GO:0031622	positive regulation of fever generation	4/8	0.0311
GO:0031620	regulation of fever generation	4/9	0.0312
GO:0010243	response to organonitrogen compound	47/945	0.0315
GO:0042035	regulation of cytokine biosynthetic process	11/98	0.0323
GO:0043618	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to stress	8/52	0.0345
GO:0045637	regulation of myeloid cell differentiation	17/213	0.0346
GO:0002705	positive regulation of leukocyte mediated immunity	14/155	0.0346
GO:0002706	regulation of lymphocyte mediated immunity	15/175	0.0358
GO:0030595	leukocyte chemotaxis	12/121	0.0371
GO:0071496	cellular response to external stimulus	22/327	0.0374
GO:0071243	cellular response to arsenic-containing substance	5/18	0.0377
GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	21/304	0.0377
GO:0032496	response to lipopolysaccharide	23/350	0.0378
GO:0030335	positive regulation of cell migration	30/520	0.0378
GO:0043065	positive regulation of apoptotic process	34/623	0.0382
GO:0045672	positive regulation of osteoclast differentiation	6/29	0.0403
GO:0140131	positive regulation of lymphocyte chemotaxis	5/19	0.0405
GO:0070372	regulation of ERK1 and ERK2 cascade	21/314	0.0409
GO:0072676	lymphocyte migration	8/57	0.042
GO:0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	7/42	0.0426
GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	23/364	0.0428
GO:0009896	positive regulation of catabolic process	25/408	0.0432
GO:0001817	regulation of cytokine production	34/636	0.0439

GO:0007159	leukocyte cell-cell adhesion	7/45	0.0444
GO:0050900	leukocyte migration	15/188	0.045
GO:2000147	positive regulation of cell motility	30/542	0.046
GO:0071260	cellular response to mechanical stimulus	9/77	0.0461
GO:0048525	negative regulation of viral process	10/94	0.0461
GO:0002687	positive regulation of leukocyte migration	12/133	0.047
GO:0032436	positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	9/78	0.0474
GO:0071407	cellular response to organic cyclic compound	27/469	0.0475
GO:0031341	regulation of cell killing	11/116	0.0481
GO:0002684	positive regulation of immune system process	46/962	0.0485
GO:0060326	cell chemotaxis	15/195	0.0489

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ18: Λίστα των σημαντικά εμπλουτισμένων όρων της GO (GO terms) για τα 187 γονίδια που επάγονται από το LPS και καταστέλλονται από τη συγχορήγηση της ένωσης AZD9567 σε κύτταρα RAW264.7.

Term id	Term Definition	Enrichment	Corrected pvalue
GO:0031622	positive regulation of fever generation	5/8	0.0005
GO:0031620	regulation of fever generation	5/9	0.0009
GO:0006954	inflammatory response	22/437	0.0025
GO:0031652	positive regulation of heat generation	5/12	0.0026
GO:2000503	positive regulation of natural killer cell chemotaxis	4/6	0.0035
GO:0001817	regulation of cytokine production	27/636	0.0036
GO:0031650	regulation of heat generation	5/14	0.0039
GO:0001819	positive regulation of cytokine production	20/410	0.0055
GO:2000501	regulation of natural killer cell chemotaxis	4/8	0.0057
GO:0002673	regulation of acute inflammatory response	7/45	0.0067
GO:0048525	negative regulation of viral process	9/94	0.0082
GO:0034097	response to cytokine	30/839	0.0083
GO:0001660	fever generation	3/4	0.0083
GO:0071222	cellular response to lipopolysaccharide	13/213	0.0086
GO:0002675	positive regulation of acute inflammatory response	6/30	0.0088
GO:0071219	cellular response to molecule of bacterial origin	13/218	0.0109
GO:0045071	negative regulation of viral genome replication	7/56	0.0111
GO:0050727	regulation of inflammatory response	16/331	0.0111
GO:0045785	positive regulation of cell adhesion	17/386	0.0124
GO:0050715	positive regulation of cytokine secretion	10/136	0.0128
GO:0071216	cellular response to biotic stimulus	13/241	0.0136
GO:0043903	regulation of symbiosis, encompassing mutualism through parasitism	12/208	0.0143
GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	16/364	0.0153
GO:0071356	cellular response to tumor necrosis factor	10/157	0.0155
GO:0032496	response to lipopolysaccharide	16/350	0.0156
GO:0034612	response to tumor necrosis factor	11/182	0.0159
GO:0043901	negative regulation of multi-organism process	12/224	0.0178
GO:0030593	neutrophil chemotaxis	7/74	0.0183
GO:0050707	regulation of cytokine secretion	11/192	0.0191
GO:0031663	lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	5/33	0.0192
GO:0022409	positive regulation of cell-cell adhesion	12/230	0.0205
GO:2000516	positive regulation of CD4-positive, alpha-beta T cell activation	5/34	0.0206
GO:1903708	positive regulation of hemopoiesis	11/197	0.0222
GO:0034341	response to interferon-gamma	9/133	0.0223
GO:1903901	negative regulation of viral life cycle	7/79	0.0225
GO:0006952	defense response	35/1243	0.0242
GO:1990266	neutrophil migration	7/83	0.0242

GO:0002793	positive regulation of peptide secretion	14/306	0.0252
GO:0050714	positive regulation of protein secretion	13/277	0.0255
GO:0071621	granulocyte chemotaxis	7/81	0.0261
GO:0032675	regulation of interleukin-6 production	9/142	0.0265
GO:0060556	regulation of vitamin D biosynthetic process	3/9	0.0277
GO:1901623	regulation of lymphocyte chemotaxis	4/24	0.0281
GO:2000551	regulation of T-helper 2 cell cytokine production	3/10	0.0296
GO:0097530	granulocyte migration	7/92	0.0312
GO:0046635	positive regulation of alpha-beta T cell activation	6/63	0.0317
GO:0043122	regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	10/175	0.0318
GO:0002719	negative regulation of cytokine production involved in immune response	4/23	0.032
GO:0045069	regulation of viral genome replication	7/91	0.032
GO:0051222	positive regulation of protein transport	16/412	0.0328
GO:0022407	regulation of cell-cell adhesion	15/373	0.033
GO:0043900	regulation of multi-organism process	20/593	0.0332
GO:0031960	response to corticosteroid	10/189	0.0336
GO:0034114	regulation of heterotypic cell-cell adhesion	4/25	0.0343
GO:0009615	response to virus	12/262	0.0359
GO:0071347	cellular response to interleukin-1	7/96	0.0362
GO:0032648	regulation of interferon-beta production	5/46	0.0364
GO:0007159	leukocyte cell-cell adhesion	5/45	0.0379
GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	13/304	0.0386
GO:0043123	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	8/127	0.0387
GO:0031347	regulation of defense response	20/611	0.0392
GO:1902107	positive regulation of leukocyte differentiation	9/160	0.04
GO:0032649	regulation of interferon-gamma production	7/98	0.0408
GO:1903039	positive regulation of leukocyte cell-cell adhesion	10/195	0.0412
GO:0070555	response to interleukin-1	8/126	0.0413
GO:1904951	positive regulation of establishment of protein localization	16/430	0.0426
GO:0043922	negative regulation by host of viral transcription	3/12	0.0439
GO:0070372	regulation of ERK1 and ERK2 cascade	13/314	0.044
GO:0032103	positive regulation of response to external stimulus	16/447	0.0447
GO:0033993	response to lipid	26/906	0.0453
GO:2000108	positive regulation of leukocyte apoptotic process	4/29	0.0458
GO:0001818	negative regulation of cytokine production	11/238	0.0469
GO:0043372	positive regulation of CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation	4/30	0.0485
GO:0070098	chemokine-mediated signaling pathway	6/75	0.049
GO:0002791	regulation of peptide secretion	17/496	0.0494
GO:0071346	cellular response to interferon-gamma	7/106	0.0496
GO:0031349	positive regulation of defense response	13/322	0.0497

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ19: Λίστα των σημαντικά εμπλουτισμένων όρων της GO (GO terms) για τα 102 γονίδια που επάγονται από το LPS και καταστέλλονται τόσο από τη συγχρόνηση δεξαμεθαζόνης όσο και της ένωσης AZD9567 σε κύτταρα RAW264.7.

Term id	Term Definition	Enrichment	Corrected pvalue
GO:2000503	positive regulation of natural killer cell chemotaxis	4/6	0.0009
GO:0031620	regulation of fever generation	4/9	0.002
GO:0006954	inflammatory response	17/437	0.0026
GO:0001660	fever generation	3/4	0.0032
GO:0031652	positive regulation of heat generation	4/12	0.0032
GO:1903708	positive regulation of hemopoiesis	11/197	0.0034
GO:0031650	regulation of heat generation	4/14	0.0047
GO:0034612	response to tumor necrosis factor	10/182	0.0052
GO:0034097	response to cytokine	23/839	0.0066
GO:0045785	positive regulation of cell adhesion	14/386	0.0075
GO:2000516	positive regulation of CD4-positive, alpha-beta T cell activation	5/34	0.0077
GO:0071356	cellular response to tumor necrosis factor	9/157	0.0081
GO:0048525	negative regulation of viral process	7/94	0.009
GO:0070555	response to interleukin-1	8/126	0.011
GO:1902107	positive regulation of leukocyte differentiation	9/160	0.0112
GO:0034341	response to interferon-gamma	8/133	0.0119
GO:0071347	cellular response to interleukin-1	7/96	0.0122
GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	12/304	0.0127
GO:0030593	neutrophil chemotaxis	6/74	0.0132
GO:0001819	positive regulation of cytokine production	14/410	0.0141
GO:0002719	negative regulation of cytokine production involved in immune response	4/23	0.0141
GO:1901623	regulation of lymphocyte chemotaxis	4/24	0.0143
GO:0071346	cellular response to interferon-gamma	7/106	0.0157
GO:1902105	regulation of leukocyte differentiation	11/279	0.0171
GO:0034114	regulation of heterotypic cell-cell adhesion	4/25	0.0182
GO:0050727	regulation of inflammatory response	12/331	0.0188
GO:0071621	granulocyte chemotaxis	6/81	0.019
GO:2000551	regulation of T-helper 2 cell cytokine production	3/10	0.02
GO:1903706	regulation of hemopoiesis	13/390	0.0205
GO:0002718	regulation of cytokine production involved in immune response	6/82	0.0212
GO:0043903	regulation of symbiosis, encompassing mutualism through parasitism	9/208	0.0212
GO:1903039	positive regulation of leukocyte cell-cell adhesion	9/195	0.0234
GO:1990266	neutrophil migration	6/83	0.0234
GO:0001817	regulation of cytokine production	17/636	0.0242
GO:2000514	regulation of CD4-positive, alpha-beta T cell activation	5/58	0.025

GO:0045071	negative regulation of viral genome replication	5/56	0.0255
GO:0043922	negative regulation by host of viral transcription	3/12	0.0256
GO:2000108	positive regulation of leukocyte apoptotic process	4/29	0.0265
GO:0030155	regulation of cell adhesion	17/656	0.0276
GO:0022407	regulation of cell-cell adhesion	12/373	0.029
GO:0045639	positive regulation of myeloid cell differentiation	6/94	0.0293
GO:0071345	cellular response to cytokine stimulus	18/720	0.0316
GO:0097530	granulocyte migration	6/92	0.0319
GO:0043901	negative regulation of multi-organism process	9/224	0.033
GO:0031915	positive regulation of synaptic plasticity	3/14	0.0334
GO:0043122	regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	8/175	0.0344
GO:0009612	response to mechanical stimulus	9/222	0.036
GO:0042035	regulation of cytokine biosynthetic process	6/98	0.0364
GO:1903037	regulation of leukocyte cell-cell adhesion	10/274	0.0366
GO:0022409	positive regulation of cell-cell adhesion	9/230	0.0369
GO:2000403	positive regulation of lymphocyte migration	4/38	0.0392
GO:0043491	protein kinase B signaling	4/39	0.0392
GO:0002548	monocyte chemotaxis	4/35	0.04
GO:0042509	regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein	5/69	0.0405
GO:0048661	positive regulation of smooth muscle cell proliferation	6/109	0.0407
GO:0044130	negative regulation of growth of symbiont in host	3/18	0.0414
GO:0031649	heat generation	3/16	0.0419
GO:0071674	mononuclear cell migration	4/40	0.0419
GO:0070098	chemokine-mediated signaling pathway	5/75	0.0423
GO:0048247	lymphocyte chemotaxis	4/43	0.0429
GO:0097529	myeloid leukocyte migration	6/111	0.043
GO:0046638	positive regulation of alpha-beta T cell differentiation	4/45	0.0453
GO:0032655	regulation of interleukin-12 production	4/47	0.0456
GO:0070372	regulation of ERK1 and ERK2 cascade	10/314	0.0463
GO:0046425	regulation of receptor signaling pathway via JAK-STAT	7/160	0.0483
GO:0043370	regulation of CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation	4/46	0.0483
GO:1903901	negative regulation of viral life cycle	5/79	0.0485
GO:1904892	regulation of receptor signaling pathway via STAT	7/164	0.0488
GO:0002761	regulation of myeloid leukocyte differentiation	6/123	0.0494

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ20: Λίστα των σημαντικά εμπλουτισμένων όρων της GO (GO terms) για τα 1145 νέα γονίδια που ρυθμίζονται διαφορεικά μόνο από το συνδυασμό της δεξαμεθαζόνης με το LPS σε κύτταρα RAW264.7.

Term id	Term Definition	Enrichment	Corrected pvalue
GO:0006730	one-carbon metabolic process	12/28	0.0004
GO:0007059	chromosome segregation	40/252	0.0009
GO:0022402	cell cycle process	83/732	0.0011
GO:1901136	carbohydrate derivative catabolic process	24/124	0.0021
GO:0000280	nuclear division	39/260	0.0025
GO:0000278	mitotic cell cycle	59/494	0.0028
GO:0098813	nuclear chromosome segregation	32/202	0.0031
GO:1903047	mitotic cell cycle process	51/411	0.0039
GO:0051301	cell division	55/449	0.0046
GO:0048285	organelle fission	40/289	0.0046
GO:0046653	tetrahydrofolate metabolic process	9/21	0.0048
GO:1902969	mitotic DNA replication	5/6	0.005
GO:0140014	mitotic nuclear division	23/133	0.0056
GO:0002831	regulation of response to biotic stimulus	44/350	0.0064
GO:0000819	sister chromatid segregation	22/124	0.0064
GO:0043900	regulation of multi-organism process	65/593	0.0073
GO:0007346	regulation of mitotic cell cycle	55/487	0.0073
GO:0045088	regulation of innate immune response	37/277	0.0082
GO:0001775	cell activation	61/561	0.0083
GO:0006564	L-serine biosynthetic process	4/4	0.0091
GO:0006760	folic acid-containing compound metabolic process	9/26	0.0094
GO:0002833	positive regulation of response to biotic stimulus	30/212	0.0095
GO:0032101	regulation of response to external stimulus	88/902	0.0119
GO:0002703	regulation of leukocyte mediated immunity	31/224	0.0123
GO:0050715	positive regulation of cytokine secretion	22/136	0.0123
GO:0002274	myeloid leukocyte activation	20/113	0.0126
GO:0045321	leukocyte activation	53/474	0.0131
GO:0031347	regulation of defense response	64/611	0.0139
GO:0050777	negative regulation of immune response	23/148	0.0139
GO:0010564	regulation of cell cycle process	62/583	0.0141
GO:0007049	cell cycle	107/1176	0.0149
GO:0031348	negative regulation of defense response	29/213	0.0149
GO:0002474	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	11/42	0.0153
GO:0035999	tetrahydrofolate interconversion	6/13	0.0167
GO:0001819	positive regulation of cytokine production	46/410	0.017

GO:0050707	regulation of cytokine secretion	27/192	0.0176
GO:0019882	antigen processing and presentation	16/85	0.0177
GO:0000070	mitotic sister chromatid segregation	17/97	0.0182
GO:0050776	regulation of immune response	80/842	0.0194
GO:0042558	pteridine-containing compound metabolic process	9/32	0.0201
GO:0006563	L-serine metabolic process	5/9	0.0204
GO:0001817	regulation of cytokine production	64/636	0.0207
GO:0034656	nucleobase-containing small molecule catabolic process	7/21	0.0228
GO:0042116	macrophage activation	10/42	0.0228
GO:0007051	spindle organization	20/126	0.0231
GO:0045089	positive regulation of innate immune response	26/189	0.0232
GO:0043902	positive regulation of multi-organism process	39/337	0.0232
GO:0002376	immune system process	171/2086	0.0235
GO:0019262	N-acetylneuraminate catabolic process	4/6	0.0236
GO:0032103	positive regulation of response to external stimulus	48/447	0.0244
GO:0045787	positive regulation of cell cycle	40/356	0.0244
GO:0043901	negative regulation of multi-organism process	28/224	0.0252
GO:0034121	regulation of toll-like receptor signaling pathway	12/59	0.026
GO:0007052	mitotic spindle organization	13/67	0.0267
GO:0051726	regulation of cell cycle	87/955	0.027
GO:1903039	positive regulation of leukocyte cell-cell adhesion	25/195	0.0271
GO:0006261	DNA-dependent DNA replication	16/95	0.0273
GO:0048260	positive regulation of receptor-mediated endocytosis	11/55	0.0276
GO:0000724	double-strand break repair via homologous recombination	14/82	0.0285
GO:0002704	negative regulation of leukocyte mediated immunity	11/53	0.029
GO:0002682	regulation of immune system process	118/1399	0.0293
GO:0042270	protection from natural killer cell mediated cytotoxicity	4/7	0.0301
GO:0000725	recombinational repair	14/83	0.0309
GO:0002706	regulation of lymphocyte mediated immunity	23/175	0.0313
GO:0045953	negative regulation of natural killer cell mediated cytotoxicity	6/18	0.0313
GO:0006260	DNA replication	22/165	0.0315
GO:0140013	meiotic nuclear division	20/142	0.0321
GO:0002697	regulation of immune effector process	41/384	0.0325
GO:0006310	DNA recombination	24/188	0.0338

GO:0061982	meiosis I cell cycle process	16/103	0.0342
GO:0098586	cellular response to virus	8/32	0.0343
GO:0002684	positive regulation of immune system process	85/962	0.0352
GO:0002832	negative regulation of response to biotic stimulus	14/84	0.0353
GO:0090068	positive regulation of cell cycle process	29/244	0.0356
GO:0007088	regulation of mitotic nuclear division	22/168	0.0365
GO:0006259	DNA metabolic process	58/608	0.0376
GO:0009615	response to virus	30/262	0.0382
GO:0032102	negative regulation of response to external stimulus	38/358	0.0385
GO:0003333	amino acid transmembrane transport	13/76	0.0392
GO:0015807	L-amino acid transport	11/58	0.0402
GO:0050870	positive regulation of T cell activation	23/180	0.0412
GO:1903037	regulation of leukocyte cell-cell adhesion	31/274	0.0413
GO:0044281	small molecule metabolic process	121/1484	0.0413
GO:0050714	positive regulation of protein secretion	31/277	0.0416
GO:0006865	amino acid transport	16/109	0.0426
GO:0032652	regulation of interleukin-1 production	13/80	0.0432
GO:0002707	negative regulation of lymphocyte mediated immunity	9/43	0.0435
GO:0051276	chromosome organization	84/962	0.0442
GO:0019883	antigen processing and presentation of endogenous antigen	8/34	0.0447
GO:0002819	regulation of adaptive immune response	23/188	0.0448
GO:0050863	regulation of T cell activation	32/291	0.0449
GO:0015804	neutral amino acid transport	8/35	0.045
GO:0042454	ribonucleoside catabolic process	5/16	0.0452
GO:0045124	regulation of bone resorption	9/44	0.0455
GO:0009069	serine family amino acid metabolic process	8/37	0.046
GO:0007127	meiosis I	15/100	0.0467
GO:0032675	regulation of interleukin-6 production	19/142	0.0469
GO:0009262	deoxyribonucleotide metabolic process	7/28	0.0473
GO:0032651	regulation of interleukin-1 beta production	11/64	0.0478
GO:0002428	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class Ib	7/30	0.0487
GO:0098656	anion transmembrane transport	26/225	0.0488
GO:0001910	regulation of leukocyte mediated cytotoxicity	14/95	0.0493
GO:0044282	small molecule catabolic process	33/308	0.0499

Συμπληρωματικός Πίνακας ΣΠ21: Λίστα των σημαντικά εμπλουτισμένων όρων της GO (GO terms) για τα 302 νέα γονίδια που ρυθμίζονται διαφορετικά μόνο από το συνδυασμό της ένωσης AZD9567 με το LPS σε κύτταρα RAW264.7.

Term id	Term Definition	Enrichment	Corrected pvalue
GO:0016570	histone modification	19/352	0.0006
GO:0016569	covalent chromatin modification	19/359	0.0011
GO:0018205	peptidyl-lysine modification	14/267	0.0023
GO:0006473	protein acetylation	10/140	0.004
GO:0016573	histone acetylation	9/113	0.0042
GO:0051276	chromosome organization	30/962	0.0044
GO:0043543	protein acylation	10/182	0.0054
GO:0018393	internal peptidyl-lysine acetylation	9/117	0.006
GO:0006325	chromatin organization	22/666	0.0066
GO:0043412	macromolecule modification	59/2754	0.0071
GO:0018023	peptidyl-lysine trimethylation	4/26	0.0081
GO:0031648	protein destabilization	5/46	0.0082
GO:0006289	nucleotide-excision repair	5/49	0.01
GO:0019219	regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	74/3685	0.0103
GO:1903506	regulation of nucleic acid-templated transcription	66/3218	0.0113
GO:1900118	negative regulation of execution phase of apoptosis	3/13	0.0118
GO:0006884	cell volume homeostasis	4/30	0.0125
GO:2001141	regulation of RNA biosynthetic process	66/3226	0.0134
GO:0031326	regulation of cellular biosynthetic process	76/3861	0.0139
GO:0009889	regulation of biosynthetic process	77/3937	0.0139
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	69/3463	0.0146
GO:0090304	nucleic acid metabolic process	41/1786	0.015
GO:0010556	regulation of macromolecule biosynthetic process	73/3719	0.0173
GO:0043967	histone H4 acetylation	5/57	0.0185
GO:0033554	cellular response to stress	34/1427	0.0191
GO:0001541	ovarian follicle development	5/66	0.0191
GO:1903322	positive regulation of protein modification by small protein conjugation or removal	7/131	0.0193
GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	81/4250	0.0205
GO:2000112	regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	69/3588	0.021
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	109/6057	0.0218
GO:0080182	histone H3-K4 trimethylation	3/15	0.0224
GO:1903508	positive regulation of nucleic acid-templated transcription	35/1560	0.0233
GO:0044265	cellular macromolecule catabolic process	20/722	0.0247
GO:0043170	macromolecule metabolic process	97/5406	0.026
GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templated	62/3165	0.0263
GO:0044267	cellular protein metabolic process	62/3167	0.0264

GO:1902680	positive regulation of RNA biosynthetic process	35/1561	0.0265
GO:0070647	protein modification by small protein conjugation or removal	20/738	0.0272
GO:0044237	cellular metabolic process	115/6647	0.0278
GO:0034773	histone H4-K20 trimethylation	2/6	0.0285
GO:0009057	macromolecule catabolic process	21/811	0.0294
GO:0015698	inorganic anion transport	7/146	0.0308
GO:0006996	organelle organization	58/3000	0.0321
GO:0008585	female gonad development	6/111	0.0321
GO:0046483	heterocycle metabolic process	48/2374	0.0323
GO:0031647	regulation of protein stability	10/272	0.0349
GO:0006259	DNA metabolic process	17/608	0.0352
GO:0006281	DNA repair	13/411	0.0363
GO:0043966	histone H3 acetylation	4/50	0.0366
GO:0044238	primary metabolic process	114/6621	0.0368
GO:0010226	response to lithium ion	3/25	0.0369
GO:0033683	nucleotide-excision repair, DNA incision	2/8	0.0378
GO:0009792	embryo development ending in birth or egg hatching	19/717	0.0383
GO:0045935	positive regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	38/1811	0.0384
GO:0010468	regulation of gene expression	76/4148	0.0387
GO:0006139	nucleobase-containing compound metabolic process	45/2237	0.0398
GO:0046545	development of primary female sexual characteristics	6/116	0.0403
GO:0018193	peptidyl-amino acid modification	20/788	0.0422
GO:0051254	positive regulation of RNA metabolic process	35/1653	0.0429
GO:0000055	ribosomal large subunit export from nucleus	2/9	0.0435
GO:0006725	cellular aromatic compound metabolic process	48/2434	0.0436
GO:0001832	blastocyst growth	3/26	0.0448
GO:0000956	nuclear-transcribed mRNA catabolic process	5/87	0.045
GO:2001020	regulation of response to DNA damage stimulus	8/201	0.0468
GO:0043506	regulation of JUN kinase activity	5/88	0.0478
GO:0070167	regulation of biomineral tissue development	5/92	0.0491
GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process	15/540	0.05