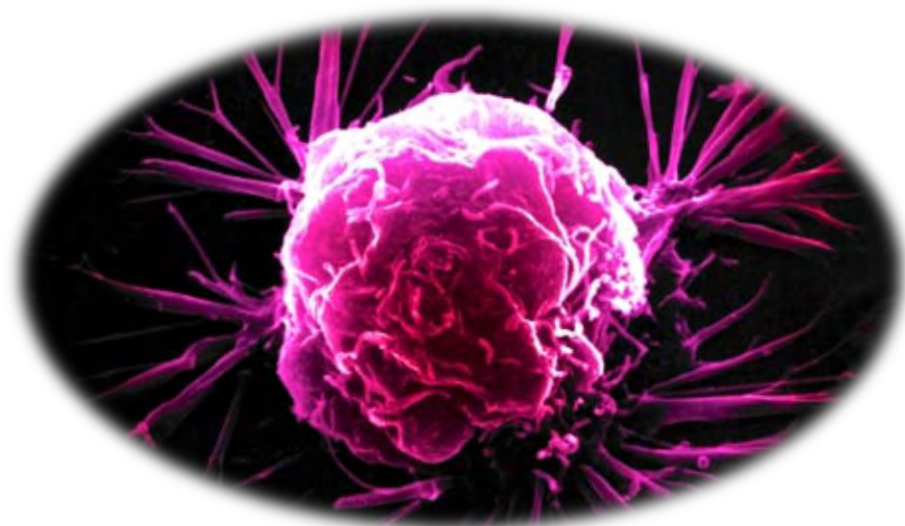


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ
ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΡΓΙΛΙΟΥ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΑΣΤΟΥ”**



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΗΜΟ: ΝΑΤΑΛΙΑ ΣΩΤΗΡΙΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΔΡ. ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ Γ. ΨΑΡΡΑ

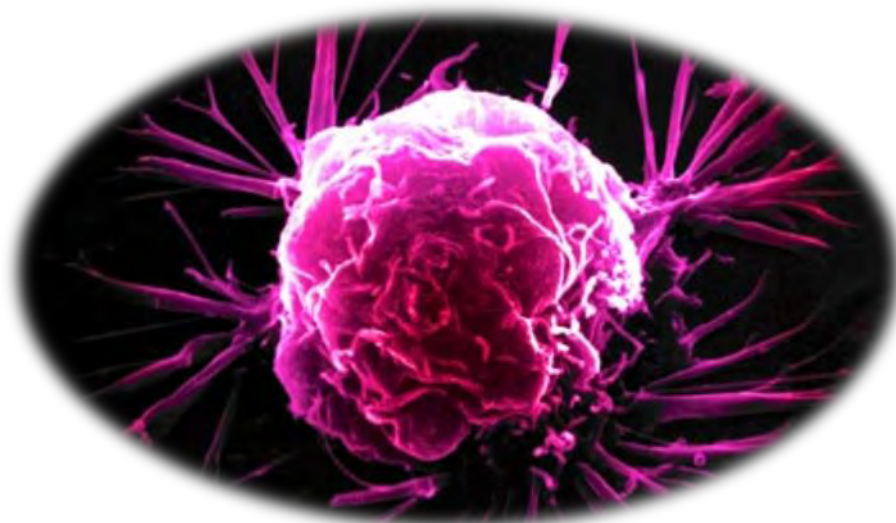
ΛΑΡΙΣΑ 2015

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEP. OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



DIPLOMA PROJECT

**“EVALUATION OF OESTROGENIC ACTION OF
ALUMINIUM COMPOUNDS IN BREAST
CANCER CELLS”**



NAME/SURNAME: NATALIA SOTERIOU

SUPERVISOR PROFESSOR: DR. ANNA- MARIA G. PSARRA

LARISSA 2015

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.

Λεωνίδας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.

Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας Βιοχημείας - Μεταβολισμού, ΤΒΒ, Π.Θ.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	
ABSTRACT	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	8
1.2 ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ-ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ.....	11
1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ.....	11
1.4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ	13
1.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ	16
A. ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ER	16
B. ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ER	17
C. ER-ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	18
D. ER-ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	19
1.6 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΡΟΛΟΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ	20
A. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	20
B. ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	21
C. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	21
D. ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	21
E. ΣΚΕΛΕΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	22
1.7 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ	22
1.8 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΜΑΣΤΟΣ	23
1.9 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	23
1.9.1 ΚΥΡΙΑ ΑΙΤΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	24
1.9.2 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΥΞΗΣΗ ΣΕ ER-POSITIVE ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	25
1.9.3 ER α ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	26
1.9.4 ER α - ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	27
1.9.5 ER β ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ	28
1.9.6 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΟΡΜΟΝΙΚΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ.....	28
1.10 ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	29
1.10.1 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	29
1.10.2 ΞΕΝΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	30
1.10.2.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΞΕΝΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	30
1.10.3 ΜΕΤΑΛΛΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	32
1.10.4 ALUMINIUM ΚΑΙ ΤΑ ΑΛΑΤΑ ΤΟΥ (ACH).....	33
1.10.5 ALUMINIUM, ACH ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	33
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	34
2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	34
2.2 ΥΛΙΚΑ.....	34
2.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	39
▪ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	39
▪ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	44

3. ΣΚΟΠΟΣ	57
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	58
4.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ MCF-7 ΚΑΙ MDA-MB-231	59
4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ACH ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΑΣΤΟΥ.....	61
4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ACH ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ mRNA ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΑΣΤΟΥ	65
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	69
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές και ειλικρινείς ευχαριστίες στην επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας κα. Άννα Μαρία Ψαρρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική της ομάδα, για την πολύτιμη βοήθεια της, τις γνώσεις που μου πρόσφερε, για την υπομονή της καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και για την έμπρακτη υποστήριξη της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, τον κ. Λεωνίδα Δημήτριο Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την κα. Σκαμνάκη Βασιλική Λέκτορα Βιοχημείας-Μεταβολισμού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ακόμα νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Βύρωνα Γοργογιέτα, που χωρίς την μεγάλη βοήθεια που μου πρόσφερε, την υποστήριξη του και την καλή συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στην ερευνητική ομάδα, δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Ευχαριστώ ακόμη τα μέλη της ερευνητικής μου ομάδας, την Λιάκου Ελένη, την Γεωργατζά Δήμητρα, την Παρούλα Κυλινδρή, την Βάσια Λάσχου για την βοήθεια τους και την όμορφη συνεργασία που είχαμε στο εργαστήριο αλλά και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου που πίστεψαν σε εμένα και με την συνεχή ηθική στήριξη τους με βοήθησαν να ολοκληρώσω ένα μεγάλο και σημαντικό κομμάτι της ζωής μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στη Λάρισα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς (ERα) και (ERβ) ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών και έχουν ρυθμιστική δράση στην μεταγραφή καθώς εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές διεργασίες στον ανθρώπινο οργανισμό. Η ER-επαγόμενη απόκριση εξαρτάται από το είδος του κυττάρου αλλά και από τον υπότυπο ER που παρουσιάζει την μεγαλύτερη έκφραση στο συγκεκριμένο είδος κυττάρων. Η μη φυσιολογική τους λειτουργία είναι δυνατό να οδηγήσει στην ανάπτυξη μεγάλου εύρους ασθενειών, μεταξύ αυτών και ο καρκίνος του μαστού στο γυναικείο φύλο.

Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι πολλές ουσίες που βρίσκονται στο περιβάλλον φαίνεται να έχουν ικανότητα πρόσδεσης στους υποδοχείς οιστρογόνων και να μιμούνται την δράση των οιστρογόνων. Πολλά μέταλλα διαθέτουν αυτή την μιμητική δράση, μεταξύ αυτών και το Αργίλιο. Το Αργίλιο και τα άλατα του (ACH) χρησιμοποιούνται ευρέως ως ενεργά αντιδρωτικά συστατικά στη βιομηχανία της κοσμετολογίας. Η συνεχής και μακροχρόνια χρήση τους υποπτεύεται ότι μπορεί να προβεί τοξική για τον ανθρώπινο οργανισμό και ότι εμπλέκονται στην όλο και αυξανόμενη εμφάνιση κρουσμάτων καρκίνου του μαστού.

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση της πιθανής οιστρογονικής δράσης των ενώσεων Αργιλίου, συγκεκριμένα των αλάτων του (ACH), καθώς επίσης και της πιθανής επίδρασής τους σε μηχανισμούς που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού. Μέσα από πειράματα ανοσοϊστοχημικής μελέτης επιβεβαιώσαμε ότι το ACH διαθέτει παρόμοια επίδραση με την E2 στη υποκυτταρική εντόπιση του ERβ, την μετακίνηση του πιθανόν στα μιτοχόνδρια, κάτι που υποδηλώνει την πιθανή οιστρογονική του δράση. Η μελέτη στόχευσε επίσης σε έλεγχο των επιδράσεων, τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο mRNA, του ACH σε πιθανά μόρια στόχους. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης και Real – Time PCR, δείχνουν ότι το ACH προκαλεί μικρή αύξηση στα επίπεδα του ERα τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο mRNA, καθώς και στα επίπεδα έκφρασης κάποιων γονιδίων στόχων του ERα, όπως α) το p53 τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης και β) της Κυκλίνη D1 σε επίπεδο mRNA. Αντίθετα το ACH δεν φαίνεται να έχει επίδραση τόσο σε επίπεδα πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδα mRNA στο c-Myc, γονίδιο στόχο του ERα. Έτσι λοιπόν συμπεραίνουμε ότι κάποιες από τις δράσεις του ACH, εν μέρει τουλάχιστον επιτελούνται μέσω του ERα, τόσο μέσω της αύξησης των επιπέδων του μορίου όσο και μέσω της ενεργοποίησης της μεταγραφικής του δραστηριότητας.

Είναι αναγκαία η επανάληψη κάποιων πειραμάτων για την επιβεβαίωση των ισχυρισμών μας αλλά και χρειάζονται περεταίρω μελέτες πάνω στις επιπτώσεις που προκαλεί το Αργίλιο γιατί εξακολουθούν να υπάρχουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με την μιμητική οιστρογονική δράση που διαθέτει και με ποιους μηχανισμούς επιτυγχάνεται η δράση αυτή.

ABSTRACT

Oestrogen receptors (ER α) and (ER β) belong to the superfamily of the steroid hormone receptors that function as both signal transducers and transcription factors to modulate expression of target genes and regulate many biological processes in the human organism. The ER-induced responses are cell type specific, largely correlating to ER subtype expression. Any dysregulation of ERs functions may lead to the development of a wide range of diseases, among them breast cancer in females.

It has been found that many compounds in the environment have been shown capable of binding to cellular oestrogen receptors and then mimicking the actions of physiological oestrogens. Certain metal ions have this mimetic activity, among them aluminium. The aluminium and aluminium chlorohydrate (ACH) are commonly used as antiperspirant active ingredients in the cosmetic industry. Continuous long-term use of antiperspirants containing aluminium may be toxic for the human body and enhance the risk of breast cancer.

The purpose of this study is to investigate the estrogenic effect of aluminium compounds, (ACH), and also the possible effects on the mechanisms involved in the regulation of the cell cycle in breast cancer cell lines. In immunohistochemistry experiments confirmed that the ACH has a similar effect to E2 in subcellular localization of ER β , possibly inducing translocation of ER β to the mitochondria, which suggests the possible estrogenic effect. The study also aimed to check the ACH effects in certain target molecules, at both protein and mRNA level. The results of Western blot analysis and Real - Time PCR, indicate that ACH causes a moderate increase in ER α protein and mRNA levels and also increased the expression levels of certain target genes of ER α , such as a) p53 both mRNA and protein levels, and b) Cyclin D1 mRNA level. ACH does not appear to affect both the levels of protein and mRNA levels in c-Myc, a ER α target gene. In conclusion, some of the actions of the ACH, are at least partially ER α mediated, both by increase in ER α level and by regulation of its transcriptional activity.

It is important to repeat some experiments and to continue our studies to confirm our results so that to further investigate the effects of Aluminium on endogenous oestrogen-regulated genes and to elucidate the mechanisms by which this effect is obtained.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

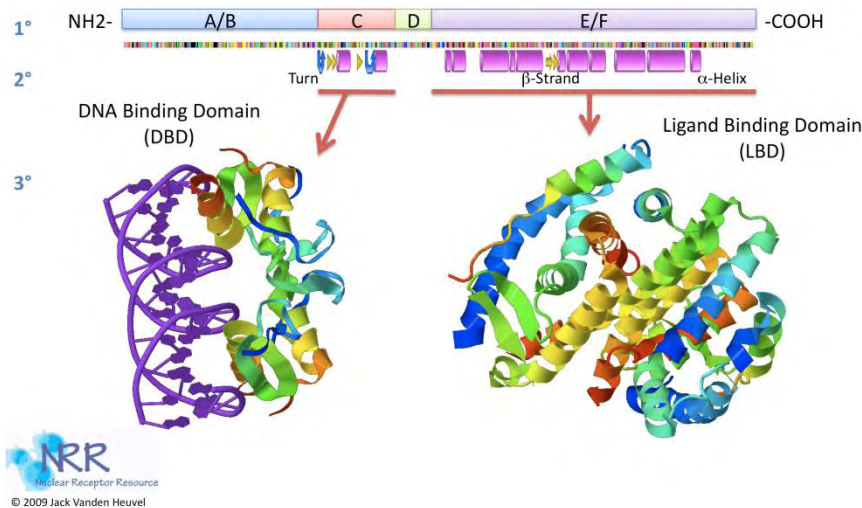
Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούνται από την σύνδεση μικρών λιπόφιλων μορίων. Αυτή η μεγάλη υπεροικογένεια κατέχει καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση, στην ανάπτυξη, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στην ρύθμιση του μεταβολισμού. Επιπλέον συσχετίζονται με πολλές ασθένειες όπως ο καρκίνος, καρδιακές νόσοι, μολύνσεις και άλλες ανωμαλίες στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων μπορούν να χαρακτηριστούν με βάση κοινά δομικά και λειτουργικά στοιχεία. Κύρια δομικά στοιχεία αποτελούν η ευμετάβλητη αμινοτελική περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφικής δραστηριότητας, μια πολύ καλά συντηρημένη κεντρική περιοχή δέσμευσης του DNA (DBD), που συγκροτείται από δύο δακτυλίου ψευδαργύρου και μια καρβοξυτελική περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (LBD).

Οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να διαχωριστούν σε Τύπου I και Τύπου II ανάλογα με το είδος του κυτταροπλασματικού συμπλόκου που σχηματίζουν με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP 90) και με την ενεργότητα που έχουν ως μονομερή, ομοδιμερή ή ετεροδιμερή (Jamshed R. Tata, 2002). Οι υποδοχείς Τύπου I αποτελούν τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει τους υποδοχείς οιστρογόνων, τους υποδοχείς ανδρογόνων, τους υποδοχείς προγεστερόνης, τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών και τους υποδοχείς αλατοκορτικοειδών. Αντίθετα, οι υποδοχείς Τύπου II χαρακτηρίζονται ως μη στεροειδή και περιλαμβάνουν τους υποδοχείς των θυρεοειδικών ορμονών, τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέως, τους υποδοχείς της Βιταμίνης D και τους υποδοχείς PPARα/β/γ.

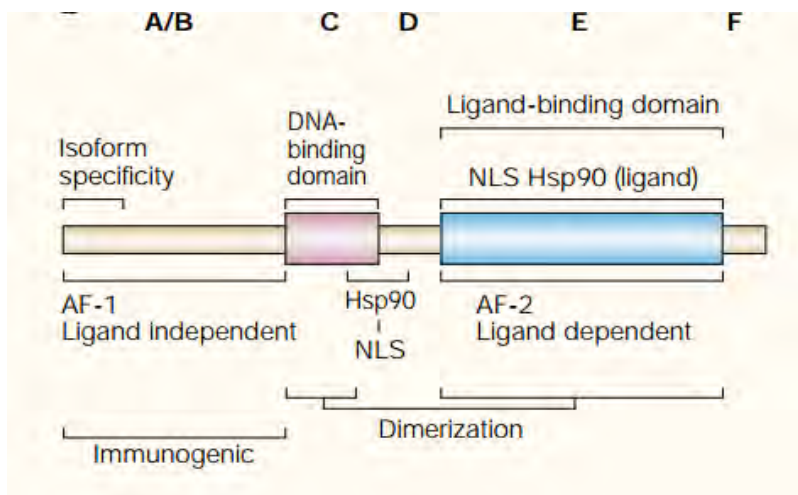
Η σύνδεση ενός μικρού λιπόφιλου μορίου στους υποδοχείς οδηγεί σε μια αλλαγή στη διαμόρφωση του υποδοχέα, η οποία, ανάλογα με τον Τύπο (I ή II), πυροδοτεί μια σειρά γεγονότων που τελικά οδηγούν σε αύξηση ή μείωση της γονιδιακής έκφρασης. Συγκεκριμένα, ο πυρηνικός υποδοχέας Τύπου I όταν απουσιάζει ο προσδέτης βρίσκεται σε ανενεργό σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsp 90 και Hsp56 στο κυτταρόπλασμα. Όταν ο υποδοχέας λαμβάνει το ορμονικό σήμα στο κυτταρόπλασμα, γίνεται ενεργός με τη σύνδεση της ορμόνης και μεταφέρεται στο πυρήνα. Η μεταφορά επιτυγχάνεται χάρις στο σήμα εντόπισης στο πυρήνα (NLS) που διαθέτει ο υποδοχέας. Εκεί, ο υποδοχέας αποσυνδέεται από τις HSP 90, σχηματίζει ομοδιμερή και συνδέεται στο γονίδιο-στόχο σε ένα στοιχείο απόκρισης ορμόνης (HRE). Το σύμπλεγμα πυρηνικού υποδοχέα/ DNA συγκεντρώνει άλλες πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφή του DNA σε mRNA. Το mRNA μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, η οποία ενδεχομένως να προκαλέσει αλλαγές στη λειτουργία του κυττάρου. Οι υποδοχείς τύπου II, σε αντίθεση με του τύπου I συγκρατούνται στον πυρήνα, ανεξάρτητα από τον προσδέτη που είναι συνδεδεμένος σε αυτούς. Αυτοί οι υποδοχείς συνδέονται ως ετεροδιμερή στο DNA. Χωρίς τον προσδέτη, οι υποδοχείς αυτοί συνδέονται με συγκαταστολείς ως σύμπλοκο και συγκρατούν το DNA σφικτά τυλιγμένο για να αποτραπεί η έκθεση του σε μεταγραφικούς παράγοντες. Με τον

προσδέτη προκαλεί διάσπαση του συμπλόκου με τον συγκαταστολέα, απελευθέρωση της χρωματίνης και στρατολόγηση πρωτεϊνών συνενεργοποιητών. Στη συνέχεια, επιπλέον μεταγραφικοί παράγοντες συγκεντρώνονται στο σύμπλοκο πυρηνικού υποδοχέα/DNA και μεταγράφουν το DNA σε mRNA.

Structure of NRs



Εικόνα 1. Δομική οργάνωση των πυρηνικών υποδοχέων. Πάνω: Σχηματικά η αλληλουχία των αμινοξέων (1D). Κάτω: 3D δομές των περιοχών DBD (προσδεμένο σε DNA) και LBD (προσδεμένο σε συνδέτη/ορμόνη). Οι δομές που απεικονίζονται είναι των υποδοχέων οιστρογόνων. Οι δομές της N-τελικής περιοχής (A/B), περιοχής άρθρωσης (D) και C-τελικής περιοχής (F) δεν έχουν ακόμη καθοριστεί πειραματικά, και γι' αυτό απεικονίζονται με κόκκινες, μωβ και πορτοκαλί διακεκομμένες γραμμές αντίστοιχα (Jack Vanden , 2009, http://nrresource.org/general_information/general_information.html).

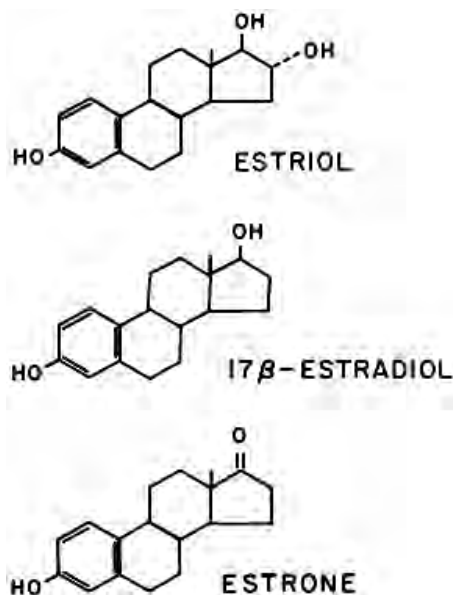


Εικόνα 2. Σημαντικές λειτουργίες του πυρηνικού υποδοχέα που συνδέονται με διαφορετικές επικράτειες του γονιδίου. (Jamshed R. Tata et al. 2002)

1.2 ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ-ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗ

Οι στεροειδείς ορμόνες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια οργανικών μορίων με ιδιαίτερο βιοχημικό ενδιαφέρον. Παραδείγματα στεροειδών αποτελούν η χοληστερίνη και πολλές ορμόνες όπως τα οιστρογόνα, η τεστοστερόνη, η προγεστερόνη και η κορτιζόλη. Οι στεροειδείς ορμόνες έχουν μεγάλο εύρος επιδράσεων στα κύτταρα, που περιλαμβάνουν ρυθμιστικές λειτουργίες σε διάφορα συστήματα του ανθρώπου, όπως είναι το αναπαραγωγικό σύστημα, κεντρικό νευρικό σύστημα και καρδιαγγειακό σύστημα (Carolyn M. et al. 2008).

Στην παρούσα εργασία δίνεται μεγαλύτερη έμφαση στα οιστρογόνα και στους μηχανισμούς δράσεώς τους που αναφέρονται και παρακάτω. Γενικά, τα οιστρογόνα είναι στεροειδείς ορμόνες υπεύθυνες για την ρύθμιση της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της λειτουργίας των ιστών-στόχων στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι λειτουργίες αυτές, συνήθως εξαρτώνται από την πρόσδεση των ορμονών στους αντίστοιχους προσδέτες τους. Κυριότερο οιστρογόνο αποτελεί η 17β-οιστραδιόλη (E₂). Οι μεταβολίτες της E₂, η οιστρόνη και η οιστριόλη είναι εξίσου σημαντικά βιολογικά μόρια, ωστόσο είναι ασθενέστεροι αγωνιστές ως προς την συγγένειά τους στους οιστρογονικούς υποδοχείς (Heldring et al. 2007).



Εικόνα 3. Χημική δομή της οιστριόλης, της 17β-οιστραδιόλης και της οιστρόνης (Robert A. et al. 2008).

1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και πιο συγκεκριμένα στους πυρηνικούς υποδοχείς Τύπου I. Τα διάφορα μέλη αυτής της κατηγορίας υποδοχέων χαρακτηρίζονται από μεταβλητότητα στην NH₂ τελική περιοχή τόσο στο μήκος όσο και στη περιεκτικότητά της αλληλουχίας σε αμινοξέα.

Η μεταγραφική λειτουργία του κυττάρου ρυθμίζεται κυρίως από τους υποδοχείς των στεροειδών ορμονών στο πυρήνα του κυττάρου. Για την επίτευξη της μεταγραφής του DNA πρέπει να πραγματοποιηθεί η αναγνώριση του γονιδίου-στόχου από τον υποδοχέα. Η πολύ συντηρημένη περιοχή DBD του υποδοχέα είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και την ειδική σύνδεση στο στοιχείο απόκρισης της ορμόνης (HRE). Τα αμινοξέα που είναι απαραίτητα για την αναγνώριση των HRE βρίσκονται στους δύο δακτυλίους ψευδαργύρου της DBD επικράτειας και επιτρέπουν τη σωστή σύνδεση με το DNA. Τα HREs σχηματίζονται κυρίως από δύο αντίγραφα μιας εξαμερούς αλληλουχίας. Η εξαμερής αλληλουχία που εμφανίζεται πιο συχνά είναι η AGGTCA (Jamshed R. et al. 2002). Οι υποδοχείς συνδέονται στη θέση HRE κυρίως ως διμερή, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται ομοδιμερή ή ετεροδιμερή μεταξύ μονομερή υποδοχέων.

Νέες μελέτες δείχνουν ότι οι περισσότεροι υποδοχείς στεροειδών ορμονών (ER,PR και AR), απουσία στεροειδών ορμονών εντοπίζονται κυρίως στο πυρήνα (Carolyn M. et al. 2008), (M. Jia et al. 2015). Εξάιρεση αποτελούν οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών και των αλατοκορτικοειδών οι οποίοι απουσία στεροειδών ορμονών εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsp56 και Hsp90 (Ana Aranda et al. 2001). Ακόμα, οι υποδοχείς αυτοί εκτός από το πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, εντοπίζονται και στα μιτοχόνδρια (Psarra et al 2008, Jia M. et al. 2015). Παρουσία στεροειδών ορμονών, οι υποδοχείς ενεργοποιούνται, απελευθερώνονται από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ, διμερίζονται και μετακινούνται στο πυρήνα. Στο πυρήνα, τα διμερή υποδοχέων προσδένονται στα συγγενή HRE και άλλες πρωτεΐνες συνεργοποιητές βοηθούν στην χαλάρωση της χρωματίνης και στην έναρξη της μεταγραφής.

Εκτός από το κλασσικό μονοπάτι ενεργοποίησης των υποδοχέων στεροειδών ορμονών εξαρτώμενο από τον προσδέτη, υπάρχει και ένας δεύτερος τρόπος ενεργοποίησης αυτών των υποδοχέων απουσία του προσδέτη. Οι περισσότερες από τις στεροειδείς ορμόνες που εισέρχονται στο κύτταρο από την κυκλοφορία του αίματος, μπορεί να βρίσκονται είτε σε ελεύθερη μορφή, είτε συνδεδεμένες με άλλες πρωτεΐνες του ορού. Τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα είναι συνδεδεμένα με την πρωτεΐνη δέσμησης SHBG (Steroid Hormone Binding Globulin). Στη κυτταρική μεμβράνη βρίσκεται ο υποδοχέας της SHBG πρωτεΐνης, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με μια αδενυλική κυκλάση. Η ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης από τον υποδοχέα της SHBG επάγει την αύξηση του cAMP, μέσω φωσφορυλίωσης του ATP, που με τη σειρά του ενεργοποιεί ένα καταρράκτη φωσφορυλίωσης μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Η PKA έχει την ικανότητα φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης του ERα και άλλων υποδοχέων στεροειδών ορμονών όταν αυτοί βρίσκονται στην μη δεσμευμένη από προσδέτη μορφή τους στον πυρήνα. Κατά συνέπεια, ενεργοποιείται η έναρξη της μεταγραφής ανεξάρτητη από τη δέσμευση στεροειδών ορμονών στους υποδοχείς τους.

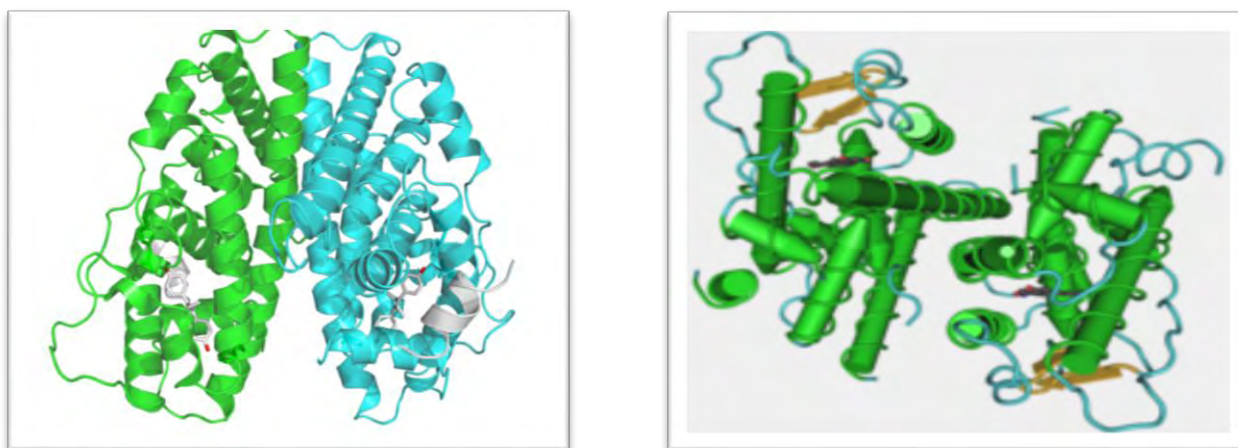
1.4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών και έχουν ρυθμιστική δράση στην μεταγραφή καθώς εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές διεργασίες. Οι βιολογικές επιδράσεις των οιστρογόνων μεσολαβούνται μέσω των ERs, α και β υποτύπων, οι οποίοι επιδρούν στην έκφραση γονιδίων-στόχων που περιέχουν στοιχεία EREs (Estrogen Response Elements) τα οποία εντοπίζονται στον υποκινητή των ελεγχόμενων από τα οιστρογόνα γονιδίων.

Οι υπότυποι ERα και ERβ είναι προϊόντα ξεχωριστών γονιδίων (ESR1 και ESR2 αντίστοιχα) τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Ωστόσο έχουν παρόμοιο βαθμό συγγένειας για την πρόσδεση της E₂ και προσδέονται στα ίδια DNA στοιχεία απόκρισης (Nina Heldring et al. 2007).

Όπως όλα τα μέλη των πυρηνικών υποδοχέων, έτσι και οι ERs μοιράζονται τρία βασικά κοινά δομικά στοιχεία:

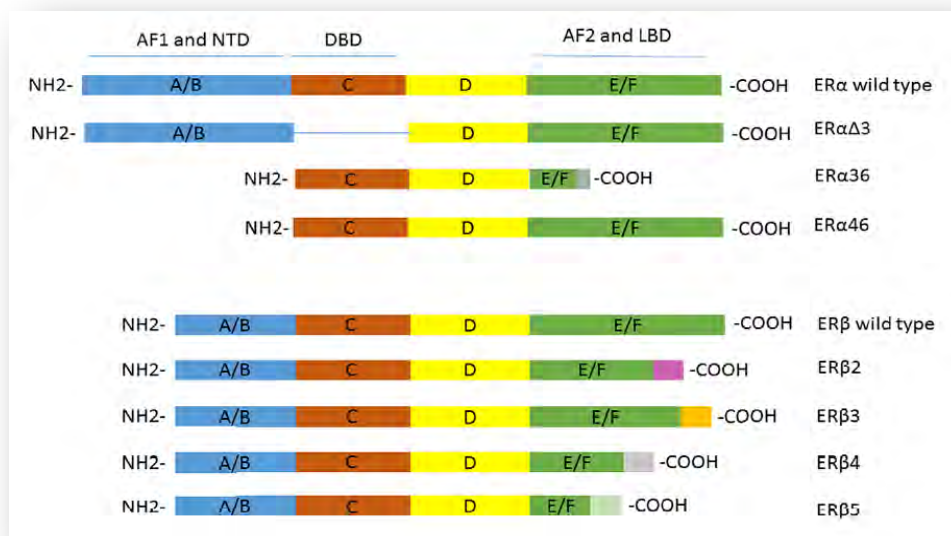
1. Η πολύ συντηρημένη κεντρική επικράτεια μεταξύ των ERα και ERβ, η DBD (DNA Binding Domain), η οποία εμπλέκεται στην αναγνώριση του γονιδίου-στόχου και στην πρόσδεση σε αυτό.
2. Η COOH-τελική περιοχή στην οποία γίνεται η σύνδεση του οιστρογόνου και ονομάζεται LBD (Ligand Binding Domain), έχει υδρόφοβο χαρακτήρα, δεν είναι συντηρημένη και χαρακτηρίζεται από υψηλή εξειδίκευση ως προς τον προσδέτη. Περιέχει επίσης το σήμα μετακίνησης του υποδοχέα προς τον πυρήνα (NLS).
3. Η NH₂-τελική περιοχή δεν χαρακτηρίζεται από υψηλή συντήρηση μεταξύ των ERα και ERβ, αλλά είναι σημαντική η μεγάλη μεταβλητότητα που παρουσιάζει στο μήκος και στην νουκλεοτιδική αλληλουχία.



Εικόνα 4. Δομή διμερούς της LBD επικράτειας του ERα (αριστερά) και ERβ (δεξιά).

Η μεταγραφική ενεργοποίηση διεκπεραιώνεται από δύο διακριτές περιοχές AF (Activation Functions). Η ιδιόσυστατα ενεργή AF-1 περιοχή εντοπίζεται στην NH₂-τελική περιοχή του υποδοχέα ενώ η εξαρτώμενη από προσδέτη AF-2 περιοχή εντοπίζεται στην COOH-τελική περιοχή. Η μεταγραφική δραστικότητα της AF-2 ενεργοποιείται μέσω της σύνδεσης της με τα οιστρογόνα, ενώ η μεταγραφική δραστικότητα της AF-1 ρυθμίζεται κυρίως από αυξητικούς παράγοντες που δρουν μέσω της οδού MAPK. Όταν ο υποδοχέας προσδέεται στο DNA, συγκροτούνται πρωτεϊνικά σύμπλοκα στις δύο περιοχές AF, που συν-ρυθμίζουν την μεταγραφή των γονιδίων (Nina Heldring et al. 2007). Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες συμπεριφέρονται σαν συν-ενεργοποιητές και επάγουν τη μεταγραφή των γονιδίων ενώ άλλες λειτουργούν σαν συν-καταστολείς και αναστέλλουν τη μεταγραφή των γονιδίων.

Σε αντίθεση με τον ERα, η περιοχή AF-1 του ERβ φαίνεται να έχει ασθενέστερη δράση. Επομένως η μεταγραφική ενεργοποίηση του ERβ βασίζεται κατά κύριο λόγο στην προσδετο-εξαρτώμενη AF-2 περιοχή (Delaunay et al., 2000). Επιπλέον, ο ERα αποτελεί πιο ισχυρό μεταγραφικό ενεργοποιητή από τον ERβ, αν και σε ιστούς που παρουσιάζεται έκφραση και των δύο υποδοχέων, πιθανόν ο ERβ να έχει ρόλο εξασθένησης του σήματος του ERα. Οι ERα και ERβ φαίνεται να αναγνωρίζουν παρόμοιες αλληλουχίες γονιδίων-στόχων, όμως διαφέρουν στην συγγένεια και στην εξειδίκευση της πρόσδεσης του προσδέτη (Zhenlin Bai et al. 2008).



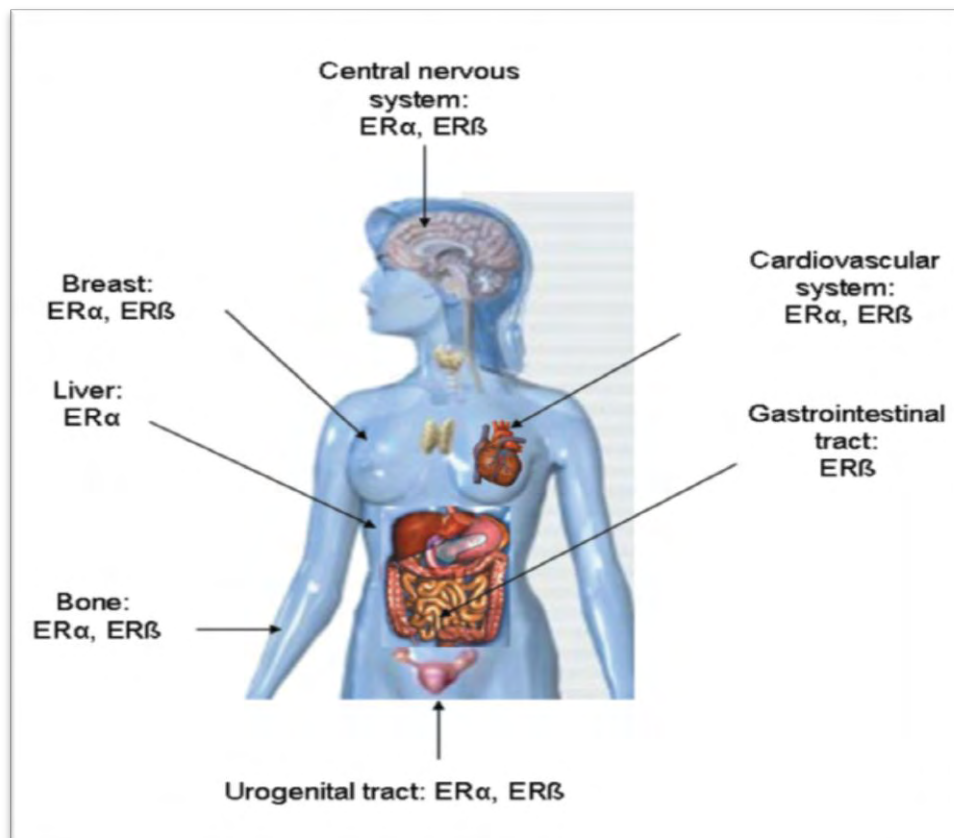
Εικόνα 5. Οι ισομορφές των οιστρογονικών υποδοχέων και οι γονιδιακές δομές τους (Jia M, et al. 2015).

Εκτός από τους υπότυπους ERα και ERβ, τα τελευταία χρόνια έχει ανακαλυφθεί ακόμα ένας νέος τύπος υποδοχέα που διαθέτει ικανότητες απόκρισης στα οιστρογόνα ο οποίος όμως ανήκει στη κατηγορία των «ορφανών» GPCR μεμβρανικών υποδοχέων και ονομάζεται GPR30. Ο GPR30 έχει ταυτοποιηθεί στις μεμβράνες καρκινικών κυττάρων μαστού, στο πλακούντα, στα οστά, στον εγκέφαλο, στις ωοθήκες, στον προστάτη, στο αγγειακό επιθήλιο

και σε ηπατικούς ιστούς (Zhenlin Bai et al. 2008). Η δράση του GPR30 είναι ανεξάρτητη από τους ERα και ERβ (Jie Cui et al. 2013). Επιπλέον, ο GPR30 είναι αντιπροσωπευτικός υποδοχέας για τις ταχύτατες κυτταρικές αποκρίσεις των οιστρογόνων. Έχει αποδειχθεί ότι ο GPR30 ρυθμίζει την φωσφορυλίωση των ERK1/2, προκαλεί την κινητοποίηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, την αύξηση του CAMP και τον σχηματισμό της PI3 κινάσης (Zhenlin Bai et al. 2008) .

Υπότυπος ER	Κατανομή στους ιστούς
ERα	Μήτρα, μαστός, επιδιδυμίδα, οστά, ήπαρ, νεφροί, λιπώδης ιστός, προστάτης, διάμεσα κύτταρα ωθηκών, κύτταρα Leydig
ERβ	Παχύ έντερο, όρχεις, μυελός των οστών, ενδοθήλιο αγγείων, πνεύμονες, ουροδόχος κύστη, επιθηλιακός ιστός του προστάτη, κοκκιώδη κύτταρα ωθηκών
GPR30	Μυελός των επινεφριδίων, νεφρική πύελος, ωθήκες

Πίνακας 1. Κατανομή υπότυπων ERs στους ιστούς (Jie Cui et al. 2013).



Εικόνα 6. Κατανομή οιστρογονικών υποδοχέων α και β στους διάφορους ιστούς στον άνθρωπο (Zhenlin B. et al. 2008).

1.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

A. ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

1. Κλασικός τρόπος δράσης: Οιστρογόνο-εξαρτώμενος μηχανισμός δράσης για γονίδια με ERE στοιχεία

Οι υποδοχείς οιστρογόνων βρίσκονται σε απενεργοποιημένη μορφή συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες θερμικού σοκ στον πυρήνα, όταν ο προσδέτης τους απουσιάζει. Παρουσία οιστραδιόλης ο ER αποδεσμεύεται από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ και ενεργοποιείται. Η E2 δεσμεύεται στην LBD περιοχή του υποδοχέα με αποτέλεσμα την αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης του. Ο υποδοχέας διμερίζεται, αναγνωρίζει και κατευθύνεται προς τα γονίδια-στόχους, δηλαδή αυτά που περιέχουν ERE στοιχεία και προσδέεται εκεί μέσω της DBD περιοχής του. Για την ενεργοποίηση της μεταγραφικής λειτουργίας χρειάζεται να γίνει ανασυγκρότηση πρωτεϊνικών συμπλόκων μέσω των περιοχών ενεργοποίησης AF-1 και AF-2 όπως για παράδειγμα οι πρωτεΐνες CBP/p300 οι οποίες έχουν δραστηριότητα Ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών (HATs). Επομένως, παρατηρείται αλλαγή της διαμόρφωσης της χρωματίνης, μετατρέπεται σε μια αποπεριελυγμένη μορφή η οποία διευκολύνει την σύνδεση της RNA πολυμεράσης II για να ξεκινήσει η μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (Heldring et al. 2007). Με αυτό τον τρόπο οι υποδοχείς των οιστρογόνων μπορούν να ρυθμίσουν άμεσα την γονιδιακή έκφραση, είτε με επαγωγή είτε με καταστολή.

2. Οιστρογόνο-εξαρτώμενος μηχανισμός δράσης για γονίδια χωρίς ERE στοιχεία

Οι συνδεδεμένοι με τον προσδέτη ERs μπορούν να προσδεθούν σε οιστρογόνο-εξαρτώμενα γονίδια είτε άμεσα στα ERE στοιχεία, είτε έμμεσα με την βοήθεια μεταγραφικών παραγόντων σε γονίδια-στόχους που δεν διαθέτουν ERE στοιχεία (Heldring et al. 2007). Το μονοπάτι της έμμεσης γονιδιακής ρύθμισης προϋποθέτει τις κατάλληλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Οι ERs αλληλεπιδρούν με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες διαμέσου μιας επικοινωνίας «crosstalk», επηρεάζοντας την λειτουργία τους χωρίς να είναι άμεσα προσδεδεμένοι στο DNA. Μερικοί μεταγραφικοί παράγοντες είναι οι εξής: η SP-1 (Stimulating Protein-1), η AP-1 (Activator Protein-1), ο NF-κB (Nuclear Factor) και οι c-jun/fos (Jie Cui et al. 2013). Οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδέονται στα γονίδια χωρίς στοιχεία ERE, σε ειδικές περιοχές ενεργοποίησης όπως είναι τα στοιχεία απόκρισης AP-1 ή σε SP-1 μοτίβα επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας CG (Heldring et al. 2007).

Η έκφραση του 35% των γονιδίων του ανθρώπου με σημαντικό βιολογικό ρόλο, ρυθμίζεται μέσω αυτού του έμμεσου μηχανισμού δράσης των ERs. Τελευταίες μελέτες που έχουν γίνει, υποθέτουν εκτεταμένη αλληλεπίδραση μεταξύ AP-1 και ER σε επίπεδο γονιδιώματος (Jie Cui et al. 2013). Παρουσία οιστρογόνων, φαίνεται να επάγεται η μεταγραφική δράση του ERα μέσω του AP-1 στοιχείου απόκριση, ενώ ο ERβ βρέθηκε να μην έχει κάποια επίδραση μέσω του αυτού του στοιχείου (Chunyan Zhao et al. 2008).

Οι υποδοχείς ERα και ERβ έχουν διαφορετικές μεταγραφικές επιδράσεις στην ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της Κυκλίνης D1. Ο ERα παρουσία οιστρογόνων, επάγει την έκφραση της Κυκλίνης D1 σε αντίθεση με τον ERβ, ο οποίος παρουσιάζει κατασταλτική επίδραση. Όμως, τόσο ο ERα όσο και ο ERβ, επάγουν την έκφραση της Κυκλίνης D1 ως απόκριση της παρουσίας αντιοιστρογόνων (Chunyan Zhao et al. 2008). Οι επιδράσεις εντοπίστηκαν σε CRE στοιχεία απόκρισης (cAMP response element) στον υποκινητή του γονιδίου της Κυκλίνης D1 (Chunyan Zhao et al. 2008). Επίσης έχει βρεθεί ότι η έκφραση της Κυκλίνης D1 ρυθμίζεται μέσω της αλληλεπίδρασης του ER και του μεταγραφικού παράγοντα SP-1 σε μοτίβα επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας CG του υποκινητή του γονιδίου της Κυκλίνης D1 (Linda Bjornstrom et al. 2005).

3. Μηχανισμός δράσης ανεξάρτητος από οιστρογόνα, επαγόμενος από άλλους παράγοντες

Εκτός από τα οιστρογόνο-εξαρτώμενα μονοπάτια δράσης των ERs, έχουν περιγραφεί ορισμένοι μηχανισμοί που φαίνεται να είναι ανεξάρτητοι της πρόσδεσης οιστρογόνων στους υποδοχείς τους (Chunyan Zhao et al. 2008). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι ERs μπορούν να ενεργοποιηθούν από μια μεγάλη ποικιλία παραγόντων όπως οι αυξητικοί παράγοντες EGF και IGF-1, από νευροδιαβιβαστές όπως η ντοπαμίνη αλλά και από άλλους ενεργοποιητές ενδοκυτταρικών μονοπατιών. Οι παράγοντες ενεργοποιούν διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τους ERs και μπορούν να επάγουν την σύνδεση τους με άλλους συνενεργοποιητές. Στη συνέχεια οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς διμερίζονται και προσδένονται μέσω της DBD περιοχής στα γονίδια-στόχους για να ρυθμίσουν την έκφραση τους. Βρέθηκε ότι οι κινάσες ERK1/2, οι MAPK, η PKA και η PKC έχουν την ικανότητα φωσφορυλίωσης των ERs (Jie Cui et al. 2013). Πιο συγκεκριμένα οι MAPK κινάσες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τον ERβ όπου μέσω των AF-1 και AF-2 περιοχών ενεργοποίησης, ο υποδοχέας συνδέεται με τον συνενεργοποιητή SRC-1 για επαγωγή ενεργοποίησης της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων (Chunyan Zhao et al. 2008). Ακόμα ένα παράδειγμα του μηχανισμού δράσης αποτελεί η ενεργοποίηση του ERα από τον EGF παράγοντα. Ο EGF επάγει την φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο της Ser 118 της επικράτειας AF-1. Ομοίως η PKA μπορεί να φωσφορυλιώσει το κατάλοιπο Ser 236 της περιοχής DBD του ERα, ρυθμίζοντας έτσι τον διμερισμό του υποδοχέα και την ενεργοποίηση της μεταγραφής (Jie Cui et al. 2013).

B. ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Οιστρογόνο-εξαρτώμενος, που μεσολαβείται από τη πλασματική μεμβράνη μηχανισμός δράσης

Η μη γενωμική δράση συνδέεται με τις στεροειδή ορμόνες και την ενεργοποίηση μεγάλης ποικιλίας πρωτεϊνικών κινασών. Αποτελεί έναν εναλλακτικό μηχανισμό δράσης

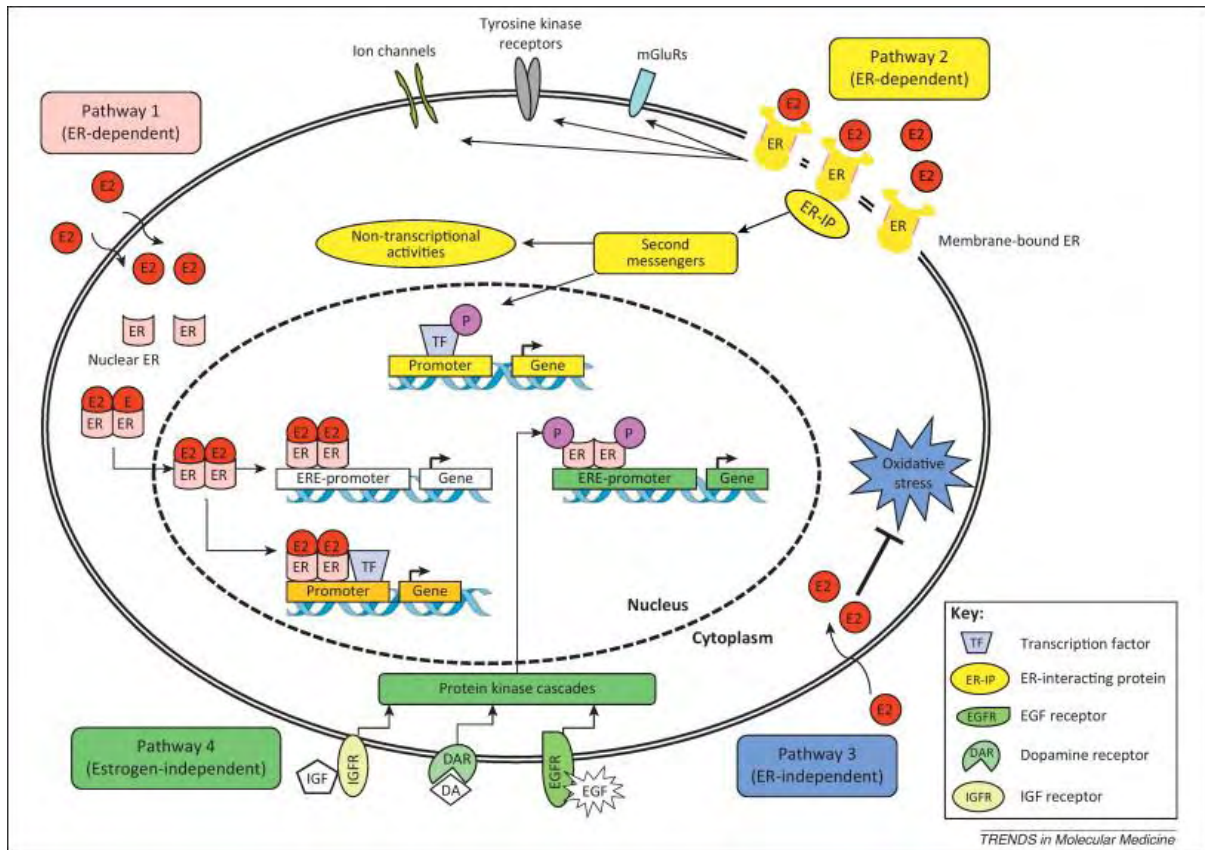
οιστρογονικών υποδοχέων που ξεκινά από την πλασματική μεμβράνη ή από το κυτταρόπλασμα. Αυτός ο μηχανισμός είναι υπεύθυνος για τις απίστευτα γρήγορες δράσεις των οιστρογόνων, οι οποίες έχουν πιο γρήγορους ρυθμούς και διαφέρουν από την μεταγραφική διαδικασία (Jie Cui et al. 2013).

Κάποιοι ερευνητές προτείνουν ότι οι μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων επάγονται από μεμβρανικούς ERs (ERα και ERβ). Οι ERα και ERβ δεν έχουν επικράτεια πρόσδεσης στην πλασματική μεμβράνη, ωστόσο η εντόπιση τους εκεί ίσως να οφείλεται σε μετα-μεταφραστική τροποποίηση παλμυτυλίωση του COOH-τελικού άκρου στην συντηρημένη επικράτεια LBD(Li L. et al. 2003), (Acconcia F. et al. 2004). Συγκεκριμένα ο ERα όταν συνδέεται στην πλασματική μεμβράνη διαμέσου της επικράτειας LBD, φαίνεται να ενεργοποιεί τα μη γενωμικά μονοπάτια σηματοδότησης μέσω της οιστραδιόλης (Linda Bjornstrom et al., 2005). Η οιστραδιόλη ενεργοποιεί τον μεμβρανικό ERα και επάγει την αλληλεπίδραση του με G πρωτεΐνες και την Src κινάση, η οποία μέσω φωσφορυλίσεων ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK. Άλλος τρόπος ενεργοποίησης του MAPK μονοπατιού είναι η αλληλεπίδραση του ERα με τον IGF-I υποδοχέα. Επιπλέον, παρουσία οιστραδιόλης, ο ERα διεγείρει αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του ασβεστίου και ενεργοποιεί την αδενυλική κυκλάση, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του cAMP που τελικά οδηγεί στην ενεργοποίηση του PI3-K μονοπατιού. Το μονοπάτι PI3-K βρέθηκε να ενεργοποιείται σε ενδοθηλιακά κύτταρα, σε καρκινικά κύτταρα μαστού και σε ηπατικά κύτταρα. Τα οιστρογόνα, μπορούν να συνδεθούν στον GPR30 υποδοχέα, ο οποίος βρίσκεται στη πλασματική μεμβράνη, ανήκει στην κατηγορία των «ορφανών» GPCR υποδοχέων και ενεργοποιεί ταχύτατα το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K και το μονοπάτι των MAPK κινασών (Elizabeth Murphy et al. 2011). Τα μονοπάτια αυτά, καταλήγουν να ενεργοποιούν τους ERs αλλά και άλλους συν-ενεργοποιητές με φωσφορυλίωση.

C. ER-ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ

Παρόλο που οι περισσότερες βιολογικές δράσεις των οιστρογόνων ασκούνται από τους οιστρογονικούς υποδοχείς, τα οιστρογόνα φαίνεται να έχουν αντιοξειδωτική δράση καταστέλλοντας το οξειδωτικό stress και μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου από τους οιστρογονικούς υποδοχείς (Jie Cui et al. 2013)(βιβλιογραφία). Το οξειδωτικό stress αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA. Οι ROS σχηματίζονται κυρίως στα μιτοχόνδρια ως προϊόν της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την κυτταρική αναπνοή.

Τα οιστρογόνα έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν τις ενζυμικές ενεργότητες και να αλληλεπιδρούν με μη στεροειδή υποδοχείς με σκοπό την προστασία των κυττάρων από πιθανές βλάβες. Περιορίζουν αποτελεσματικά την απελευθέρωση των ROS από τα μιτοχόνδρια χάρις τον φαινολικό Α δακτύλιο, χαρακτηριστικό που δίνει την αντιοξειδωτική δράση στα οιστρογόνα κυρίως στα νευρικά κύτταρα, παρέχοντας έτσι, μια νευροπροστατευτική λειτουργία (Jie Cui et al. 2013).



Εικόνα 7. Σηματοδοτικά μονοπάτια οιστρογονικών υποδοχέων που ενεργοποιούνται από την οιστραδιόλη (τροποποίηση από Jie Cui et al. 2013).

D. ER-MΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Το μιτοχόνδριο αποτελεί το σημαντικότερο οργανίδιο του κυττάρου για την παραγωγή ενέργειας και για την προώθηση της απόπτωσης. Οι μιτοχονδριακές λειτουργίες ρυθμίζονται από μια μεγάλη ποικιλία μορίων, τα οποία μπορεί να είναι είτε ενδοκυτταρικά είτε εξωκυτταρικά. Σε πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια αρκετοί πυρηνικοί υποδοχείς, εκ των οποίων οι οιστρογονικοί υποδοχείς και πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο Nf-κB, AP-1, CREB και η p53 (Psarra et al. 2007). Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν σε κυτταρικούς τύπους όπου έχουν μεγάλη ανάγκη ενέργειας για την διεκπεραίωση των βιολογικών τους λειτουργιών (Chen J. et al. 2008).

Τα οιστρογόνα αποτελούν σημαντικά αντί-αποπτωτικά σήματα για πολλά είδη κυττάρων, μεταξύ αυτών και τα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε MCF-7 καρκινικά κύτταρα μαστού, έδειξαν ότι η χορήγηση 17β-οιστραδιόλης επάγει την μετακίνηση των οιστρογονικών υποδοχέων προς τα μιτοχόνδρια (Psarra et al. 2007). Στο μιτοχονδριακό DNA περιλαμβάνονται αλληλουχίες παρόμοιες με τις αλληλουχίες των ERE στοιχείων απόκρισης των γονιδίων του πυρήνα. Σ' αυτές τις αλληλουχίες φαίνεται ότι προσδένονται οι οιστρογονικοί υποδοχείς και επάγουν την μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν κυρίως ένζυμα που εμπλέκονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (Psarra et al. 2007).

Επομένως, ισχυρίζεται ότι το οιστρογόνο-επαγόμενο μονοπάτι σηματοδότησης των οιστρογονικών υποδοχέων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην αναστολή της απόπτωσης αλλά και στην πρόκληση βλαβών στο μιτοχονδριακό DNA μέσω των ROS που παράγονται κατά την κυτταρική αναπνοή στα μιτοχόνδρια (Chen J. et al. 2008).

1.6 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΡΟΛΟΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς ελέγχουν μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών βιολογικών διεργασιών σε ιστούς όπου εκφράζονται στον ανθρώπινο οργανισμό και είναι υπεύθυνοι για την καλή λειτουργία τους. Ωστόσο έχουν ενοχοποιηθεί για πάρα πολλές ασθένειες ως αποτέλεσμα της μη φυσιολογικής τους σηματοδότησης τόσο στις γυναίκες όσο και στους άντρες. Φαίνεται να εμπλέκονται σε πάρα πολλές μορφές καρκίνου, σε μεταβολικές διαταραχές, σε καρδιακές νόσους, σε διάφορες μολύνσεις, στην οστεοπόρωση και έχει επιδράσεις στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.

A. Αναπαραγωγικό σύστημα

Στο γυναικείο φύλο, διαφέρει τόσο η κατανομή όσο και οι ρόλοι των ERα και ERβ στους μαστικούς αδένες από άτομο σε άτομο. Η παρουσία του ERα στα μαστικά κύτταρα είναι υπεύθυνη για τον οιστρογόνο-επαγόμενο πολλαπλασιασμό του επιθηλίου και για την μετέπειτα διαφοροποίησή του. Ο ERβ αδυνατεί να επάγει οιστρογόνο-εξαρτώμενη ανάπτυξη στους μαστικούς αδένες απουσία του ERα (Elizabeth Anderson et al. 2002). Επιπλέον η παρουσία των οιστρογόνων είναι απαραίτητη για την γονιμότητα καθώς εμπλέκονται στην διαδικασία της ωορρηξίας, της εμφύτευσης του εμβρύου στη μήτρα, κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης και για την γέννηση του βρέφους. Πιστεύεται ότι ο ERα επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ ο ERβ επάγει τη διαφοροποίηση του ωοθηλακίου. Τα οιστρογόνα εντοπίστηκαν να έχουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή και ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού και του καρκίνου των ωοθηκών, όπως επίσης και η υπερέκφραση κάποιον από τους συν-ενεργοποιητές των ERs (Francesca C. Et al. 2012) .

Στο ανδρικό φύλο, τα οιστρογόνα είναι απαραίτητα για την σωστή λειτουργία των όρχεων. Ωστόσο η έκθεση στα οιστρογόνα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μπορεί να προκαλέσει διαταραχές τόσο στη δομή όσο και στην λειτουργία τους. Μεγάλη έκφραση εμφανίζει ο ERβ στο ουρογεννητικό σύστημα και στους όρχεις, σε αντίθεση με την χαμηλή έκφραση του ERα ο οποίος είναι απαραίτητος κυρίως για την ανδρική γονιμότητα (Maria F. Et al. 2009).

B. Καρδιαγγειακό σύστημα

Τα οιστρογόνα έχουν πλειοτροπικές δράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα. Μερικές από τις πολλές επιδράσεις των οιστρογόνων περιλαμβάνουν την ρύθμιση της αγγειακής λειτουργίας, της φλεγμονώδους απόκρισης, του μεταβολισμού, της ευαισθησίας της ινσουλίνης και την επιβίωση των μυοκυττάρων της καρδιάς και των βλαστικών κυττάρων (Elizabeth Murphy et al. 2011). Οι επιδράσεις των οιστρογόνων επιτυγχάνονται μέσω των μη γενωμικών μηχανισμών σηματοδότησης των ERs. Για παράδειγμα, ο ERα μπορεί να ενεργοποιήσει το μονοπάτι σηματοδότησης PI3K. Επιπλέον μπορεί να επάγει αύξηση της έκφρασης της συνθάση του μονοξειδίου του Αζώτου. Φαίνεται ότι και το μονοπάτι PI3K αλλά και το ένζυμο συνθάση του μονοξειδίου του Αζώτου δρουν αθροιστικά και έχουν σημαντικό καρδιοπροστατευτικό (Elizabeth Murphy et al. 2011). Η έλλειψη οιστρογόνων από τον οργανισμό έχει συνδεθεί με την αύξηση των καρδιαγγειακών παθήσεων καθώς έχουν την ικανότητα της ρύθμισης των φαινομένων εγκεφαλικού επεισοδίου και της επιληψίας.

C. Ανοσοποιητικό σύστημα

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς παρουσιάζουν έκφραση στα πρωτογενή λεμφικά όργανα και στα διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Συγκεκριμένα, ο ERα είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του θύμου αδένου και στα δύο φύλα, ενώ ο ERβ πιθανόν να είναι υπεύθυνος για την ρύθμιση της παραγωγής των Β κυττάρων στον μυελό των οστών. Οι οιστρογόνο-επαγόμενες δράσεις των ERs ενισχύουν τη σωστή ανάπτυξη και ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα οιστρογόνα πιστεύεται ότι έχουν καθοριστικό ρόλο στα αυτοάνοσα νοσήματα. Σημαντικό στοιχείο της ρύθμισης των ανοσοαποκρίσεων αποτελεί η ισορροπία της συγκέντρωσης των οιστρογόνων με τα ανδρογόνα τόσο στο γυναικείο όσο και στο ανδρικό φύλο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα οιστρογόνα ενισχύουν ενώ η τεστοστερόνη καταστέλλει την ανοσοαπάντηση (Konstantin Y. Et al. 2013).

D. Κεντρικό νευρικό σύστημα

Τα οιστρογόνα εκτός των άλλων, επιδρούν και στον εγκέφαλο, επηρεάζουν τις γνωστικές λειτουργίες, τον συντονισμό των κινήσεων και το πόνο και έχουν νευροπροστατευτικό ρόλο. Δρουν ως ισχυροί νευροτροφικοί παράγοντες κατά την διάρκεια της ανάπτυξης αλλά και μετά την ενηλικίωση. Επιπλέον, τα οιστρογόνα μπορούν να διαφοροποιήσουν την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην διαδικασία της απόπτωσης και στην αναγέννηση των νευροαξόνων. Τα σχετικά επίπεδα των ERs διαφέρουν μεταξύ των

διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου, με αυξημένα επίπεδα του ERα σε σχέση με τον ERβ στον υπόκαμπο, στον υποθάλαμο και στον φλοιό (Catherine S. Et al. 1999). Η οιστρογονική δράση στον εγκέφαλο ασκείται μέσω ER-εξαρτώμενους και ER-ανεξάρτητους μηχανισμούς δράσης, οι οποίοι εμπλέκονται στην ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων αλλά και στη ρύθμιση των μη γενωμικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος όπως τα μονοπάτια cAMP/PKA και MAPK. Υπάρχει ο ισχυρισμός ότι τα οιστρογόνα μπορούν να δρουν προστατευτικά ως προς την ασθένεια του Alzheimer, του Parkinson και της σχιζοφρένειας μέσα από την προστατευτική ικανότητα τους ως προς τον κυτταρικό θάνατο και μέσω της ενίσχυσης της αναγέννησης των νευρικών κυττάρων και της ενίσχυσης των γνωστικών λειτουργιών του εγκεφάλου (Bruce s. Et al. 1999).

Ε. Σκελετικό σύστημα

Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα οιστρογόνα στον μεταβολισμό και την ομοιοστάση των οστών, επιδρώντας ευεργετικά στην ανάπτυξη του σκελετού αλλά και στην διαφοροποίηση των οστών. Οι οιστρογόνο-επαγόμενες δράσεις ανάπτυξης του σκελετού πραγματοποιούνται από τον ERα, αντίθετα ο ERβ δρα κατά τη διάρκεια της εφηβείας περιορίζοντας την ανάπτυξη των οστών στο γυναικείο φύλο. Ακόμα, τα οιστρογόνα ρυθμίζουν διάφορους παράγοντες με σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των οστών. Στο γυναικείο φύλο, υπάρχει άμεση σύνδεση της ανάπτυξης της οστεοπόρωσης με την επακόλουθη μείωση των επιπέδων των οιστρογόνων στο αίμα κατά την εμμηνόπαυση. Οι άντρες με μη λειτουργικούς ERs ή χωρίς την ικανότητα σύνθεσης οιστρογόνων, αποτελούν ευπαθή πληθυσμό για ανάπτυξη οστεοπόρωσης (Peter P. et al. 2008).

1.7 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Οι υποδοχείς ERα και ERβ πιθανόν να επιφέρουν αντίθετα αποτελέσματα όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την απόπτωση. Τα οιστρογόνα μέσω του ERα διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο μαστό, στη μήτρα και την ανάπτυξη του προστάτη με αποτέλεσμα να υπάρχει αυξημένο ρίσκο για καρκινογένεση. Αντιθέτως, σε πολλές μελέτες γίνεται υπόθεση ότι ο ERβ καταστέλλει την κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διεγείρει την διαφοροποίηση των κυττάρων του προστάτη, του μαστικού αδένου, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και των βλαστοκυττάρων του μυελού των οστών. Σε άλλες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε καρκινικά κύτταρα μαστού και παχέος εντέρου, βρέθηκε ότι ο ERβ πιθανόν να έχει ρόλο καταστολέα της καρκινογένεσης μέσω μηχανισμού ανεξάρτητου από τα οιστρογόνα που έχει ως τελικό αποτέλεσμα την μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ο μοριακός μηχανισμός της ενεργοποίησης του ERβ παραμένει άγνωστος μέχρι στιγμής. Ο ERβ εκτός από τη δράση ως καταστολέας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, φαίνεται να επιδρά και στην διαδικασία της απόπτωσης με

μηχανισμό επαγωγής της έκφρασης της πρωτεΐνης FasL, η οποία αποτελεί προ-αποπτωτική πρωτεΐνη σε ωθητικά επιθηλιακά κύτταρα (Konstantin Y. et al. 2013).

Έχει βρεθεί ότι η E2 επάγει την έκφραση του αντί-αποπτωτικού γονιδίου Bcl-2 μέσω μηχανισμού επαγωγής της έκφρασης σε ωθητικά επιθηλιακά κύτταρα. Ο μηχανισμός πιθανόν να πραγματοποιείται από τον ERα, αφού έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση του ERα σε νευρικά κύτταρα έχει νευροπροστατευτική δράση. Σε μία άλλη in vitro μελέτη επιθηλιακών κυττάρων, βρέθηκε ότι η E2 επάγει την κυτταρική επιβίωση μέσω του ERα, ενώ παράλληλα ο ERβ προωθεί τον κυτταρικό θάνατο με μη γενωμικό μηχανισμό μεταγωγής σήματος από τους ERα και ERβ (Konstantin Y. et al. 2013).

Αυτά τα στοιχεία υποστηρίζουν ότι ο ERβ γενικά έχει προ-αποπτωτική επίδραση, ενώ ο ERα έχει αντί-αποπτωτική δράση. Η ER-επαγόμενη απόκριση εξαρτάται από το είδος του κυττάρου αλλά και από τον υπότυπο ER που παρουσιάζει την μεγαλύτερη έκφραση στο συγκεκριμένο είδος κυττάρων (Konstantin Y. et al. 2013).

1.8 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΜΑΣΤΟΣ

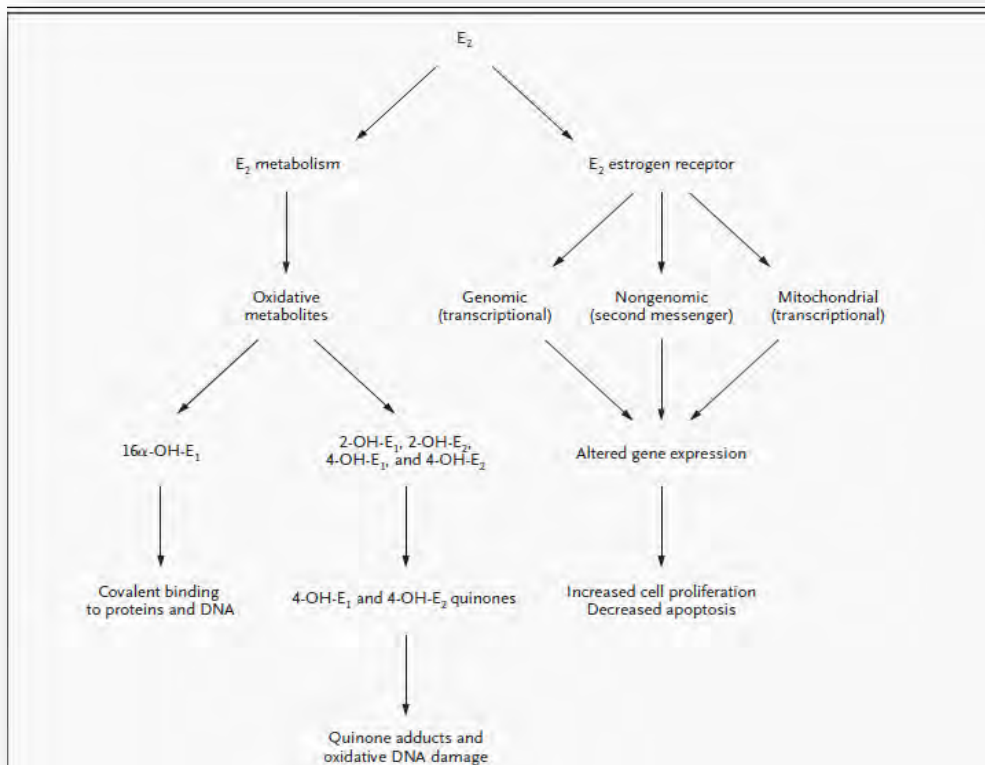
Σε φυσιολογικό μαστικό αδένα, οι οιστρογονικοί υποδοχείς είναι απαραίτητοι για την μορφογένεση των ιστών. Στις ενήλικες γυναίκες ο ERα έχει έκφραση <10% στα επιθηλιακά κύτταρα, ενώ ο ERβ εκφράζεται σε ποσοστό 70-80% στα επιθηλιακά κύτταρα αλλά και στα ανοσοκύτταρα του μαστού. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο ERβ, δεν είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του μαστού αλλά χρειάζεται για τη τελική διαφοροποίηση και την διατήρηση της οργάνωσης του επιθηλιακού ιστού (Prasenjit Dey et al. 2013). Παρόλο της χαμηλής έκφρασης του, ο ERα φαίνεται να αποτελεί το μόριο κλειδί για τις επιδράσεις της οιστραδιόλης στο φυσιολογικό μαστικό αδένα (Elizabeth Anderson et al. 2002).

1.9 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο όρος «καρκίνος του μαστού» αναφέρεται στην ανάπτυξη κακοήθους όγκου στην περιοχή του μαστού. Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί σήμερα το πιο διαδεδομένο είδος καρκίνου για το γυναικείο φύλο, καθώς το 27,8% του γυναικείου πληθυσμού διαγιγνώσκεται με αυτή την ασθένεια. Η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου σε άρρνες είναι υπαρκτή αλλά πολύ μικρή. Είναι γνωστό ότι ο καρκίνος του μαστού στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ορμονο-εξαρτώμενος. Οι ορμόνες έχουν την ικανότητα να διεγείρουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (Zhenlin Bai et al. 2008).

Τα οιστρογόνα θεωρείται ότι προάγουν την νεοπλασματική ανάπτυξη αφενός μέσω αύξησης των παραγόντων που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αφετέρου

μέσω της μείωσης των παραγόντων που τον καταστέλλουν. Επιπρόσθετα αναστέλλουν την απόπτωση μέσω της αύξησης της έκφρασης αντί-αποπτωτικών γονιδίων, όπως για παράδειγμα το bcl-2 (Στυλιανός Τσαγκαράκης, Κλινική Ογκολογία, Κεφ. 7). Επίσης, η αύξηση του ρυθμού της κυτταρικής διαίρεσης, μειώνει τη πιθανότητα επιδιόρθωσης των σφαλμάτων της DNA πολυμεράσης με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλάξεων στο DNA. Έτσι, η δράση των οιστρογόνων στα κύτταρα μπορεί να οδηγήσει στην εγκαθίδρυση νέων μεταλλάξεων στο γονιδίωμα αλλά και την αναπαραγωγή αυτών.



Εικόνα 8. Οιστρογόνο-επαγόμενα μονοπάτια που οδηγούν στην καρκινογένεση (James D. Et al. 2006).

1.9.1 Κύρια αίτια ανάπτυξης καρκίνου του μαστού

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, η σταδιακή κατανόηση των οποίων οδηγεί στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση της νόσου.

Ο καρκίνος του μαστού μπορεί να προκύψει σε οποιαδήποτε ηλικία μετά την εφηβεία αλλά τα ποσοστά αυξάνονται όσο αυξάνονται και οι ηλικιακές κλίμακες. Οι περισσότερες περιπτώσεις παρουσιάζονται μετά από την ηλικία των 50 ετών, ενώ είναι σπάνιος σε γυναίκες ηλικίας κάτω των 35 ετών (5% των περιπτώσεων), με εξαίρεση τις γυναίκες που έχουν κληρονομική προδιάθεση. Βρέθηκε ότι το 5 - 10% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού σχετίζεται με παράγοντες κληρονομικότητας. Ωστόσο, κάποια γονίδια τα οποία

έχουν υποστεί μεταλλάξεις, έχουν προσδιοριστεί ως παράγοντες που συμβάλλουν στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Μερικά από αυτά είναι το BRCA1, BRCA2, TP53 και ERBB2.

Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού είναι ανάλογος με τα επίπεδα των κυκλοφορούντων οιστρογόνων και το χρονικό διάστημα έκθεσης σε αυτά (Στυλιανός Τσαγκαράκης, Κλινική Ογκολογία, Κεφ. 7). Στατιστικά στοιχεία υποδηλώνουν ότι γυναίκες με πρόωμη έναρξη της εμμηνούρσης (πριν από το 12ο έτος της ηλικίας τους) ή με καθυστερημένη εμμηνόπαυση (μετά τα 55) αντιμετωπίζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Επίσης, η λήψη οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση έχει συσχετιστεί με αυξημένα ποσοστά εμφάνισης της νόσου. Η παχυσαρκία και η αύξηση του σωματικού βάρους αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού καθώς αυξάνει τα επίπεδα των οιστρογόνων. Η παραγωγή των οιστρογόνων στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση γίνεται κυρίως μέσα σε λιπώδη ιστό, γεγονός που οφείλεται στη αυξημένη δράση του ενζύμου αρωματάση, το οποίο συμμετέχει στο μεταβολικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης της E2, και εντοπίζεται κυρίως στον λιπώδη ιστό.

Επιπλέον, οι γυναίκες που βρίσκονται σε εγκυμοσύνη υπόκεινται σε ορμονικές θεραπείες. Η έκθεση σε οιστρογόνα κατά την ενδομήτρια ζωή είναι ικανή να διπλασιάσει το κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, η δράση τους φαίνεται να είναι αναστρέψιμη αφού ο σχετικός κίνδυνος μειώνεται μετά από κάποια χρόνια μετά τη διακοπή της χορήγησής τους.

1.9.2 Οιστρογόνα και κυτταρική αύξηση σε ER-positive καρκίνο του μαστού

Έχει δειχθεί ότι τα οιστρογόνα διεγείρουν την κυτταρική ανάπτυξη στο καρκίνο του μαστού. Η δράση τους επιτυγχάνεται χάρις την μεγάλη αύξηση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G0/G1, δηλαδή των κυττάρων που εισέρχονται τον κυτταρικό κύκλο. Η μιτογόνο δράση των οιστρογόνων ασκείται μέσω της σύνθετης ρύθμισης της μεταγραφικής λειτουργίας, της έκφρασης δηλαδή, πολλών γονιδίων. Σε καρκίνο μαστού πρώιμου σταδίου επάγεται μέσω του κλασσικού γενωμικού μηχανισμού η έκφραση αυξητικών παραγόντων και η έκφραση γονιδίων που περιέχουν ERE στοιχεία στον υποκινητή τους. Επιπρόσθετα, πραγματοποιείται ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που δεν περιέχουν ERE στοιχεία με μηχανισμούς αλληλεπίδρασης των ER με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο c-Jun. Μελέτες που έγιναν σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων μαστού, έδειξαν οιστρογόνο-επαγόμενη η έκφραση γονιδίων όπως το γονίδιο της Κυκλίνης D1, μέσω της αλληλεπίδρασης της AP-1 και του ER. Μερικά από τα γονίδια που έχουν μιτογόνο δράση περιλαμβάνουν αυτά των αυξητικών παραγόντων, των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων, των πρωτεασών, των κυκλινών και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cdks) (N. Platet et al. 2004).

1.9.3 ERα και καρκίνος του μαστού

Ο ERα παρουσιάζει πολύ μεγάλη έκφραση από τα πρώτα μόλις στάδια ης καρκινογένεσης, σε ποσοστό γύρω στο 50-80% των περιπτώσεων ασθενών καρκίνου του μαστού. Εκφράζεται τόσο στα πορογενή όσο και στα λοβιακά καρκινώματα. Με τη βοήθεια ERα knock-out πειραμάτων σε ποντίκια, αποδείχθηκε ότι ο ERα προωθεί την καρκινογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Στις διαδικασίες αυτές εμπλέκονται τα σηματοδοτικά μονοπάτια MAPK και PI3K/Akt που στόχο έχουν την φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του ERα. Η μεγάλη έκφραση του ERα, αποδεικνύεται σημαντική, γιατί διευκολύνει την μετατροπή των μηχανισμών δράσης από οιστρογόνο-εξαρτώμενους σε οιστρογόνο-ανεξάρτητους στα επιθηλιακά κύτταρα καρκίνου του μαστού (Francesca Cirillo et al. 2013).

Θεραπεία με αντί-οιστρογόνα εφαρμόζεται σε ασθενείς ERα-positive καρκίνο του μαστού. Τα αντί-οιστρογόνα είναι συναγωνιστικοί αναστολείς των οιστρογόνων και αναστέλλουν την μιτογόνο τους δράση στο καρκίνο του μαστού. Τα αντί-οιστρογόνα ονομάζονται και εκλεκτικοί τροποποιητές των οιστρογονικών υποδοχέων ή SERMs και περιλαμβάνουν την Ταμοξιφαίνη, Ραλοξιφένη, Τορεμιφένη, αναστολείς του ενζύμου αρωμάτωση, ICI κ.α. . Η Ταμοξιφαίνη αποτελεί το πιο αποτελεσματικό αντί-οιστρογόνο και με την μεγαλύτερη εφαρμογή στους ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Ωστόσο μόνο το 70% των ασθενών ανταποκρίνεται στη θεραπεία με Ταμοξιφαίνη και παρουσιάζονται διάφορες παρενέργειες σε άλλους ιστούς όπως για παράδειγμα στο ενδομήτριο και στο καρδιαγγειακό σύστημα (M. Jia et al. 2015).

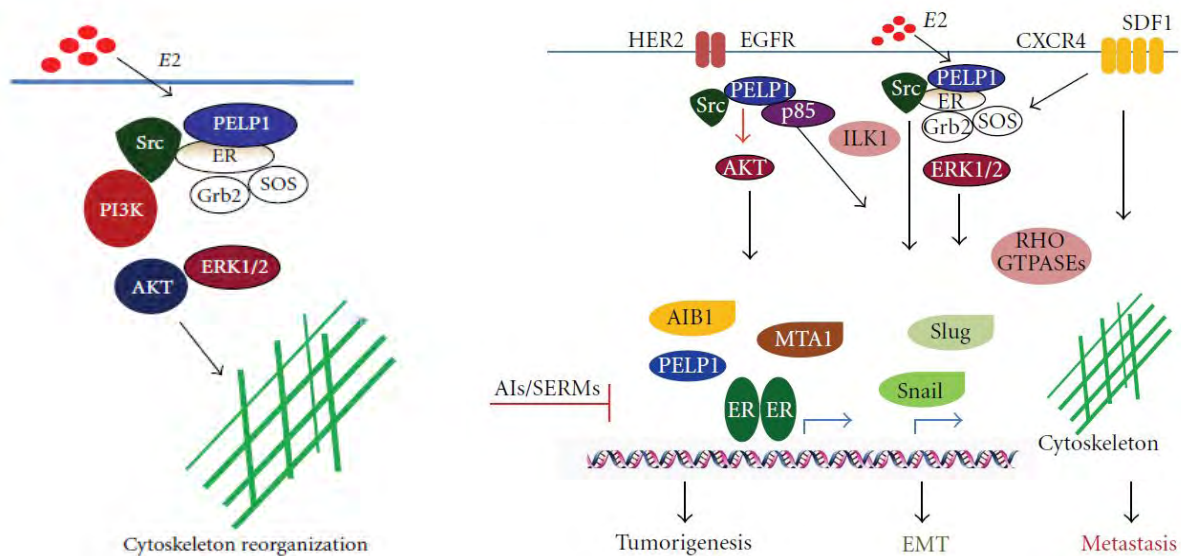
Η επαγωγή των επιδράσεων του ERα προϋποθέτει την σύνδεση με ένα προσδέτη. Μελέτες έδειξαν, παρουσία E2 ο ERα ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στο κυτταρικό κύκλο και συγκεκριμένα ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου c-myc, p45, Κυκλίνη D και το γονίδιο της Κυκλίνης E. Ο ERα μέσω της DBD περιοχής, αλληλεπιδρά με το ERE στοιχείο αλλά και με την πρωτεΐνη AP-1 στον υποκινητή του γονιδίου c-myc, προκαλώντας με αυτό τον τρόπο επαγωγή της έκφρασης «up-regulation» του παράγοντα αυτού. Η αναστολή του ERα με τη χορήγηση της Ταμοξιφαίνης προκαλεί μείωση της έκφρασης της Κυκλίνης D1 και του c-myc, το οποίο καταστέλλει τη πρωτεΐνη bcl-2, η οποία έχει ρόλο επιβίωσης στα κύτταρα, έτσι αυξάνεται ο κυτταρικός θάνατος (Prasenjit Dey et al. 2013).

Μελέτες έδειξαν ότι ο ERα μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει με ταχύτερους ρυθμούς την έκφραση του πρώτο-ογκογονιδίου c-fos σε καρκινικά κύτταρα μαστού παρουσία E2 ή αυξητικών παραγόντων. Έχει βρεθεί ότι ο ERα, σε αυτήν την περίπτωση, πρέπει να έρθει σε επαφή με την SP-1 περιοχή πλούσια σε CG, καθοδικά της παλίνδρομης ERE αλληλουχίας στον υποκινητή του πρώτο-ογκογονιδίου c-fos. Το πρώτο-ογκογονίδιο αυτό εκφράζει την πυρηνική πρωτεΐνη c-fos η οποία φυσιολογικά εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και του κυτταρικού μετασχηματισμού. Η πρωτεΐνη c-fos αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη c-jun, σχηματίζοντας το ετεροδιμερές σύμπλοκο της πρωτεΐνης-1 ενεργοποίησης της μεταγραφής η οποία μπορεί να προσδεθεί σε ειδικές περιοχές σε γονίδια-στόχους ρυθμίζοντας την έκφραση τους. Επίσης έχει ταυτοποιηθεί ότι

η πρωτεΐνη c-fos ρυθμίζει την έκφραση παραγόντων, υπεύθυνων για την είσοδο του κυττάρου στο κυτταρικό κύκλο όπως είναι η Κυκλίνη D1 (Marcello Maggiolini et al. 2004).

1.9.4 ERα-σηματοδότηση και Μετάσταση καρκίνου

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται οι ER και πραγματοποιούνται εκτός του πυρήνα, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην προώθηση της κυτταρικής μετανάστευσης και τελικά της μετάστασης στο καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα η «εκτός του πυρήνα» σηματοδότηση του ERα, επάγει την ενεργοποίηση διαφόρων κινάσων όπως η Src, η MAPK, η PI3K, η PKC κ.α. Πολλές από αυτές τις κινάσες εμπλέκονται στα μονοπάτια που προωθούν την μετάσταση στο καρκίνο του μαστού. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι ο μεμβρανικός ERα αλληλεπιδρά με τους αυξητικούς παράγοντες IGF-1 R, EGFR και με τον HER2. Αυτή η αλληλεπίδραση παίζει ρόλο στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Οποιαδήποτε δυσλειτουργία του μηχανισμού του στα ERα καρκινικά κύτταρα του μαστού, μπορεί να παγιδεύσει τον ERα στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα να επάγει συνεχή ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω MAPK και τελικά να έχει σοβαρές επιπτώσεις όπως είναι η αλλοίωση του κυτταροσκελετού, η ενίσχυση της κυτταρικής μετανάστευσης, διαδικασίες που οδηγούν τελικά στην μετάσταση (Sudipa Saha R. et al. 2011).



Εικόνα 9. Σχηματική παρουσίαση του E2-επαγόμενου μηχανισμού πρόκλησης αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού (αριστερά) και την ορμονική ρύθμιση της μετάστασης (δεξιά) (Sudipa Saha R. Et al. 2011).

1.9.5 ERβ και καρκίνος του μαστού

Σε φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, ο ERβ εκφράζεται σε ποσοστό 80%. Αυτό δεν συμβαίνει κατά την εξέλιξη καρκίνου του μαστού, γεγονός που οφείλεται σε υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου του υποδοχέα, προκαλώντας έτσι την απενεργοποίηση του. Σε in vitro μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε καρκινικά κύτταρα μαστού, βρέθηκε ότι ο ERβ αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση. Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού επιτυγχάνεται μέσω της αναστολής των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK και PI3K αλλά και μέσω της ρύθμισης της έκφρασης παραγόντων υπεύθυνων για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και για την απόπτωση. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο ERβ επάγει τη ανασυγκρότηση του πρωτεασώματος και την επακόλουθη αποικοδόμηση του ERα, αναστέλλοντας έτσι την ενεργότητά του (M. Jia et al. 2015).

Ωστόσο, σε μία άλλη μελέτη που έγινε πάνω σε διάφορες κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, υποστηρίζεται ότι η έκφραση του ERβ συνδέεται με την αυξημένη έκφραση της ιντερλευκίνης 8, η οποία ανήκει στην κατηγορία των κυτοκινών και παίζει ρόλο στην αύξηση της αγγειογένεσης και της μετάστασης σε καρκινώματα (Chen et al. 2011). Χρειάζονται πολλές ακόμα μελέτες για να εξακριβωθεί η έκφραση και ο ρόλος του ERβ γιατί μέχρι στιγμής οι απόψεις διίστανται.

1.9.6 Καρκίνος του Μαστού και ανθεκτικότητα σε ορμονικές θεραπείες

Το κύριο πρόβλημα αντιμετώπισης του ER-positive καρκίνου του μαστού είναι η ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν οι ασθενείς στις χορηγούμενες θεραπείες. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες στρατηγικές αναστολής της οιστρογονικής δράσης μέσω των ERs. Μερικές από αυτές είναι η χορήγηση των SERMs όπως η Ταμοξιφαίνη, η οποία έχει εξειδικευμένη δράση ανταγωνιστή των ERs στο μαστό ή οι αναστολείς του ενζύμου αρωματάση, που στοχεύουν στη αναστολή της βιοσύνθεσης των οιστρογόνων. Παρόλο που παρουσιάζεται μείωση στην εξέλιξη της ασθένειας, εξακολουθούν να υπάρχουν ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία, περίπου μία στις τέσσερις γυναίκες (Prasanna G Alluri et al. 2014).

Η ενεργοποίηση ERs μέσω της σηματοδότησης των αυξητικών παραγόντων και πρωτεϊνικών κινασών εμπλέκεται στην ανθεκτικότητα του οργανισμού ως προς την ενδοκρινική θεραπεία που υποβάλλεται. Επιπλέον, πιθανολογείται ότι οι μεταλλάξεις των οιστρογονικών υποδοχέων οι οποίες εγκαθιδρύονται μετά από κύκλο ορμονικής θεραπείας, είναι μία ακόμα αιτία για την ανθεκτικότητα του οργανισμού προς τις ενδοκρινικές θεραπείες κατά του καρκίνου του μαστού. Συγκεκριμένα ενοχοποιούνται οι μεταλλάξεις του γονιδίου *ESR1* στην LBD περιοχή σε περιπτώσεις μετάστασης του καρκίνου του μαστού. Επιπλέον παρατηρήθηκε υπερέκφραση οιστρογόνο-επαγόμενων

γονιδίων σε καρκινώματα που εμφανίζουν μεταλλάξεις του γονιδίου *ESR1*. Με βάση αυτά τα στοιχεία, πιθανολογείται ότι η σηματοδότηση μέσω των ERs είναι ενεργή και προσδίδει ανθεκτικότητα ως προς τις ορμονικές θεραπείες (Prasanna G Alluri et al. 2014).

1.10 ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

1.10.1 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

Τα οιστρογόνα ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των στεροειδών ορμονών. Όπως όλες οι στεροειδείς ορμόνες, τα οιστρογόνα περνούν εύκολα την κυτταρική μεμβράνη. Τα οιστρογόνα κυκλοφορούν στο αίμα και των δύο φύλων αλλά βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας και προωθούν την ανάπτυξη των γυναικείων δευτερευόντων φυλετικών χαρακτηριστικών.

Τα οιστρογόνα αποτελούν πολύ σημαντικούς για τη φυσιολογία του οργανισμού παράγοντες που ασκούν τις δράσεις τους μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων. Ο πρωταρχικός τους ρόλος συνιστάται στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση και λειτουργία των ιστών του αναπαραγωγικού συστήματος, περιλαμβανόμενων των μαστών, της μήτρας, του κόλπου και των ωοθηκών στις γυναίκες και των όρχεων, της επιδιδυμίδας και του προστάτη στους άνδρες (Εμμανουήλ Ξυδάκης, Κλινική Ογκολογία, Κεφ.57).

Οι ωοθήκες, ο πλακούντας, ο φλοιός των επινεφριδίων και τα κύτταρα Leydig των όρχεων είναι τα φυσιολογικά μέρη σύνθεσης των οιστρογόνων και έχουν ως πρόδρομο μόριο τους την χοληστερόλη (Stefan Silbernagl et al. 2010). Συγκεκριμένα, στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες τα οιστρογόνα εκκρίνονται σε μεγάλα ποσά από τις ωοθήκες, ενώ στις μετεμμηνοπαυσιακές παράγονται από τη μετατροπή των ανδρογόνων, που σχηματίζονται στα επινεφρίδια και τις ωοθήκες, σε οιστρογόνα, με την επίδραση του ενζύμου αρωματάση. Η μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα λαμβάνει χώρα σε πολλούς φυσιολογικούς ιστούς, όπως στο λιπώδη ιστό, τους μυς, το ήπαρ και τον εγκέφαλο, καθώς και στα νεοπλασματικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού. Τα κυριότερα οιστρογόνα στον ορό είναι η 17β-οιστραδιόλη και η οιστρόνη (Εμμανουήλ Ξυδάκης, Κλινική Ογκολογία, Κεφ.57).

Κατά τον μεταβολισμό των οιστρογόνων παράγονται ουσίες που ενοχοποιούνται για άμεση μεταλλαξιογόνο δράση (όπως η 3,4-estradiol-quinone, που συνδέεται με τις βάσεις γουανίνη και αδερίνη της έλικας του DNA, ενεργοποιεί μια γλυκοσιδάση και οδηγεί σε σημειακές μεταλλάξεις) καθώς και ρίζες οξυγόνου που προκαλούν οξειδωτική βλάβη στο DNA. Αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μεταβολίτες αυτοί έχουν ρόλο στην έναρξη αλλά και στη διατήρηση της νεοπλασματικής διεργασίας, δεν έχει ακόμα αποδειχθεί η συμμετοχή τους στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο (Στυλιανός Τσαγκαράκης, Κλινική Ογκολογία, Κεφ. 7)

1.10.2 ΞΕΝΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

Τα ξενοοιστρογόνα αποτελούν ένα είδος «ξένων ορμονών» που μιμούνται τις δράσεις των οιστρογόνων. Αποτελούνται από φυσικά ή συνθετικά χημικά συστατικά. Τα συνθετικά ξενοοιστρογόνα συνήθως χρησιμοποιούν βιομηχανικά συστατικά, όπως το PCB ή το BPA, τα οποία έχουν οιστρογονική δράση σε ζωντανούς οργανισμούς. Η ιδιότητα τους αυτή πιθανόν να οφείλεται στο φαινολικό δακτύλιο που έχουν στο μόριο τους. Τα φυσικά ξενοοιστρογόνα περιλαμβάνουν τα φυτοοιστρογόνα τα οποία παράγονται στα φυτά.

Τα ξενοοιστρογόνα θεωρούνται κλινικά πολύ σημαντικά, χάρις τις ικανότητες τους να μιμούνται τις δράσεις των ενδογενών οιστρογόνων. Οι οργανισμοί εκτίθενται σε μεγάλο βαθμό στα ξενοοιστρογόνα, τα οποία βρίσκονται σε διάφορα προϊόντα που καταναλώνουμε ή μου ερχόμαστε σε επαφή, ή ακόμα και στο περιβάλλον (P. D. Darbre, 2005). Για αυτό το λόγο έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση πρώιμης ήβης και άλλων διαταραχών στο αναπαραγωγικό σύστημα.

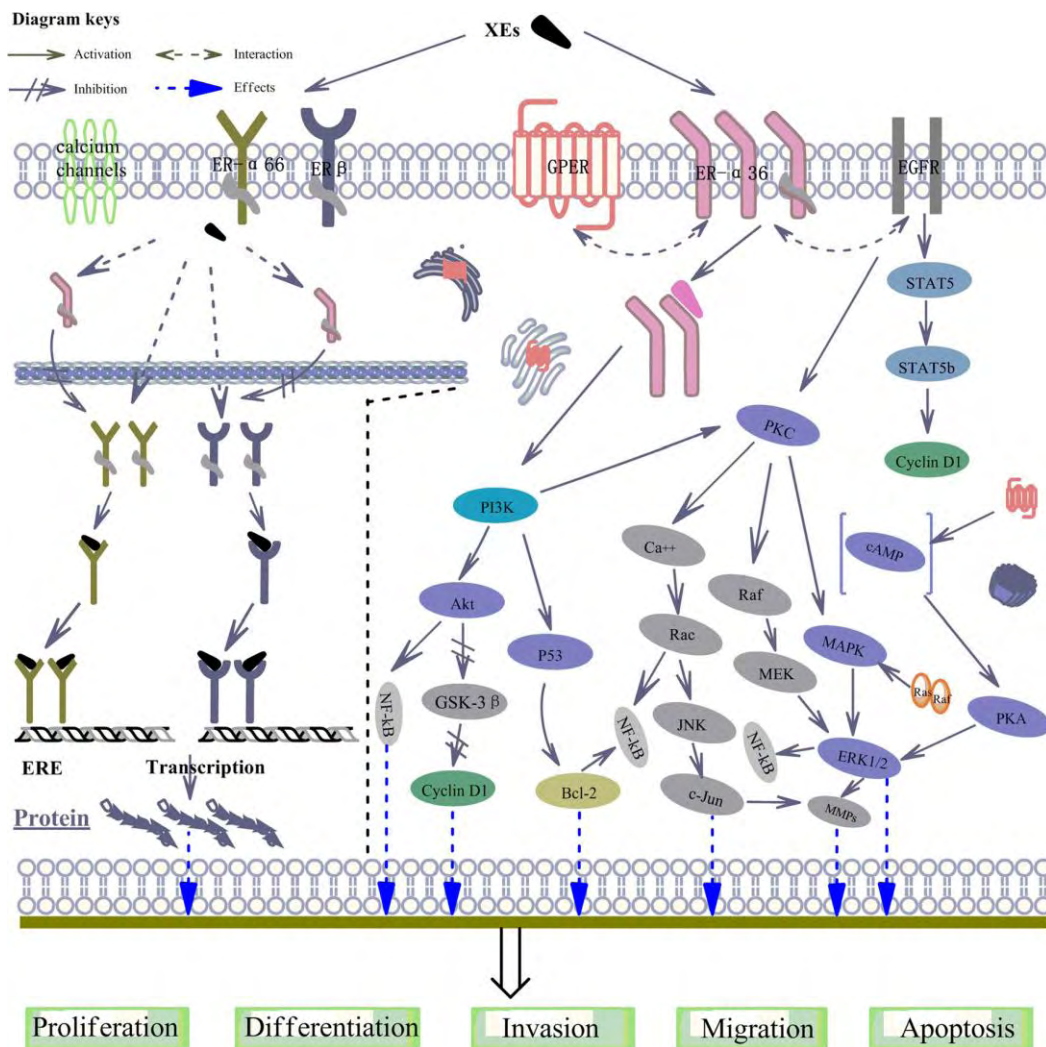
Τα χημικά αυτά που μιμούνται τα οιστρογόνα χρησιμοποιούνται σε πολλά προϊόντα. Μερικά από αυτά είναι: 4-MBC (αντηλιακά), Hydroxy-anisole butyrate, BHA, E320 (διατήρηση τροφών), Atrazine (για την καταστροφή των αγριόχορτων), Bisphenol-A (Δισφαινόλη Α, χρησιμοποιείται σε πλαστικά μπουκάλια, δοχεία τροφίμων και κονσέρβες), PCB (πρόσθετο χρωμάτων, μελανιών και πλαστικών), Parabens (καλλυντικά, λουσιόν, οδοντόκρεμες, προϊόντα ξυρίσματος κλπ), Phthalates (φθαλάτες, βρίσκονται σε καλλυντικά, αρώματα, ζελέ μαλλιών, λακ, βερνίκια νυχιών, ενυδατικές κρέμες, εντομοκτόνα, είδη καθαριότητας οικιακής χρήσης, συσκευασίες τροφίμων κλπ).

Στην παρούσα εργασία θα αναφερθούμε περαιτέρω στα μεταλλοοιστρογόνα, μια υποκατηγορία των ξενοοιστρογόνων και πιο συγκεκριμένα στο Αργίλιο και την οιστρογονική δράση του στα καρκινικά κύτταρα του μαστού.

1.10.2.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΞΕΝΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Οι οιστρογονικές επιδράσεις των ξενοοιστρογόνων μπορούν να επιτευχθούν είτε από γενωμικά είτε από μη γενωμικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος και να επιφέρουν κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του μαστού (Jun Liu et al. 2015). Όταν τα καρκινικά κύτταρα του μαστού εκτεθούν στα ξενοοιστρογόνα, ενεργοποιείται άμεσα μία μεμβρανική ισομορφή του ERα που διεγείρει κυρίως μη γενωμικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος όπως MAPK/ERK και PI3/Akt. Η ισομορφή του ERα ονομάζεται ER-α36 και εμφανίζει απώλεια των περιοχών AF-1 και AF-2 σε σχέση με τον wild type ERα. Ο ER-α36 δεν εντοπίζεται στα φυσιολογικά κύτταρα μαστού αλλά μόνο στα ήδη ERα-positive και ERα-negative καρκινικά κύτταρα του μαστού. Συγκεκριμένα εμφανίζει μεγαλύτερη έκφραση σε ERα-negative καρκινικά κύτταρα του μαστού (MDA-MB-231, MDA-MB-436) (Jun Liu et al. 2015).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα ξηνοιστρογόνα επάγουν την γονιδιακή μεταγραφή μέσω ειδικής σύνδεσης με τους ERs. Το σύμπλοκο XE/ER έχει την ικανότητα ρύθμισης της μεταγραφής μέσω της αλληλεπίδρασης του με γονίδια που περιέχουν ERE στοιχεία απόκρισης στον υποκινητή τους. Επίσης, τα XE μπορούν να επάγουν ενεργοποίηση κινασών που προκαλούν καταρράκτες φωσφορυλιώσεων και τελικά να επηρεάσουν τόσο την μεταγραφική λειτουργία αλλά και την παραγόμενη πρωτεΐνη. Ο μεμβρανικός ER-α36 συνήθως επάγει την ενεργοποίηση των μονοπατιών μεταγωγής σήματος MAPK/ERK και PI3/Akt τα οποία είναι εξίσου σημαντικά για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά και για την κυτταρική επιβίωση μέσω της απόπτωσης. Οποιαδήποτε βλάβη παρουσιαστεί στον κυτταρικό κύκλο ή στο μηχανισμό της απόπτωσης αποτελεί κομβικό σημείο για την καρκινογένεση στο μαστό (Jun Liu et al. 2015).



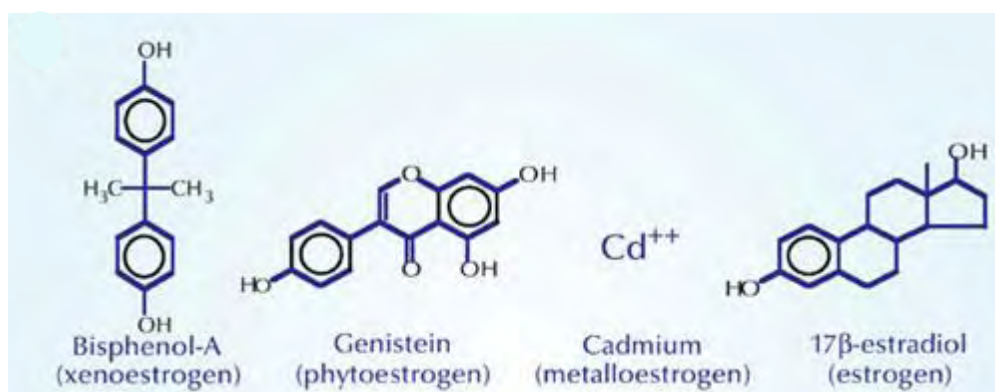
Εικόνα 10. Στο σχεδιάγραμμα φαίνονται οι οιστρογονικές επιδράσεις και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τα ξηνοιστρογόνα (Jun Liu et al. 2015).

1.10.3 ΜΕΤΑΛΛΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

Τελευταίες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα ξενοιστρογόνα, έδειξαν ότι ορισμένα μεταλλικά ιόντα έχουν την ικανότητα πρόσδεσης στους οιστρογονικούς υποδοχείς και να έχουν οιστρογονικές επιδράσεις στα κύτταρα. Η ομάδα των μεταλλικών ιόντων, αποτελεί μια τάξη ανόργανων ξενοιστρογόνων που ονομάζονται μεταλλοιστρογόνα (P. D. Dabre, 2006).

Όπως είναι ευρέως γνωστό, ο μηχανισμός δράσης των οιστρογονικών υποδοχέων ξεκινά με την αλληλεπίδραση των οιστρογόνων με τους υποδοχείς τους. Οι ERs είναι μεταγραφικοί παράγοντες που έχουν δομή από δακτυλίους ψευδαργύρου, άρα η λειτουργία τους εξαρτάται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και μετάλλων. Η DBD αποτελείται από δύο δακτυλίους ψευδαργύρου, όπου το κάθε άτομο ψευδαργύρου συνδέεται με δύο κατάλοιπα κυστεΐνης. Τα οιστρογόνα προσδέονται στην LBD περιοχή, ενεργοποιείται ο υποδοχέας και ακολουθεί ο διμερισμός του και η πρόσδεση του στα γονίδια-στόχους που περιέχουν ERE στοιχεία απόκρισης (P. D. Dabre 2006).

Έρευνες μελέτης των μεταλλοιστρογόνων, έδειξαν ότι τα μέταλλα συνδέονται στους οιστρογονικούς υποδοχείς μέσω μηχανισμού αντικατάστασης του ψευδαργύρου με αποτέλεσμα τη τροποποίηση της ικανότητας της περιοχής DBD να προσδέεται στα ERE στοιχεία απόκρισης. Διαφορετικά, τα μεταλλοιστρογόνα είναι ικανά να προσδεθούν εξειδικευμένα στην LBD περιοχή του ER, μπλοκάροντας έτσι την σύνδεση της οιστραδιόλης στην συγκεκριμένη επικράτεια. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι τα μεταλλοιστρογόνα δεν ανταγωνίζονται την δράση της οιστραδιόλης στην γονιδιακή ρύθμιση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά την ενισχύουν (P. D. Dabre 2006).



Εικόνα 11. Χημικές δομές ξενοιστρογόνων, φυτοοιστρογόνων, μεταλλοιστρογόνων και οιστρογόνων (<http://www.medscape.com/>).

1.10.4 ALUMINIUM ΚΑΙ ΤΑ ΑΛΑΤΑ ΤΟΥ-ΥΔΡΟΞΥ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΑΡΓΙΛΙΟ (ALUMINUM CHLORHYDRATE, ACH)

Το Aluminium ανήκει στην οικογένεια των μεταλλοιστρογόνων και το συναντάμε σε μια μεγάλη κλίμακα εφαρμογών όπως σε διάφορες βιομηχανίες παραγωγής προϊόντων κοσμετολογίας ή ακόμα και σε πρόσθετα τροφίμων (Ali V. Et al. 2010). Τα άλατα του Aluminium ή αλλιώς Aluminum Chlorhydrate (ACH) αποτελούν τα συστατικά των αντιδρωτικών καλλυντικών (Darbre, 2005).

Επικρατεί ο ισχυρισμός ότι τα αντιδρωτικά καλλυντικά που περιέχουν τα άλατα ACH και χρησιμοποιούνται ευρέως στην περιοχή κάτω από τον ώμο και στην περιοχή του μαστού, εμπλέκονται στην όλο και αυξανόμενη εμφάνιση κρουσμάτων καρκίνου του μαστού. Τα αντιδρωτικά καλλυντικά που περιέχουν τα άλατα ACH, αποσκοπούν στην εφαρμογή φραγμών στους πόρους του ιδρώτα, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η διαφυγή του προς την επιφάνεια του δέρματος πιθανόν μέσω του σχηματισμού «φυσικού πώματος» (Darbre, 2005). Έτσι απορροφάται από τη επιδερμίδα και δίσταται στους παρακείμενους ιστούς καθώς και στο αίμα. Ωστόσο, το Aluminium είναι γνωστό ότι έχει τοξικές επιδράσεις στον οργανισμό. Όταν δεν ακολουθεί καλό ξέπλυμα της περιοχής εφαρμογής των αντιδρωτικών καλλυντικών, παραμένουν άλατα ACH στην περιοχή. Επαναλαμβανόμενη εφαρμογή για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, ενισχύει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού ή νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι το Alzheimer. Επιπλέον η εφαρμογή των αντιδρωτικών καλλυντικών αμέσως μετά το ξύρισμα αυξάνει δραματικά τον κίνδυνο της καρκινογένεσης (Ali V. Et al. 2010).

Όπως έχει προαναφερθεί, τα μεταλλοιστρογόνα έχουν την ικανότητα να μιμούνται τις δράσεις των ενδογενών οιστρογόνων του οργανισμού. Έτσι και το Aluminium μπορεί να δεσμεύεται τόσο στους πυρηνικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, όσο και στους μεμβρανικούς και να επάγει την μεταγραφή γονιδίων στόχων που περιέχουν ERE στοιχεία απόκρισης στον υποκινητή τους. (Ali V. Et al. 2010).

1.10.5 ALUMINUM, ALUMINUM CHLORHYDRATE (ACH) ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η καρκινογενετική δράση του Aluminium συνδέεται άμεσα με την ικανότητα της μίμησης των οιστρογονικών λειτουργιών (Ali V. Et al. 2010). Τα άλατα ACH διεγείρουν την έκφραση γονιδίων που περιέχουν ERE στοιχεία απόκρισης στον υποκινητή τους. Το γεγονός αυτό, δίνει το έναυσμα στα κύτταρα του μαστού για επαναλαμβανόμενες κυτταρικές διαιρέσεις, αυξάνοντας ταυτοχρόνως τον αριθμό των λαθών κατά την αντιγραφή με αποτέλεσμα την εγκαθίδρυση μεταλλάξεων σε γονίδια που σχετίζονται με το καρκίνο και την επακόλουθη εξέλιξη του καρκίνου του μαστού.

Σε πρόσφατες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF7 και αποσκοπούσαν στην εξακρίβωση της έκφρασης γονιδίων επαγόμενη από τα άλατα ACH, βρέθηκε ότι το Aluminium έχει την ικανότητα αύξησης της έκφρασης γονιδίων που περιέχουν ERE στοιχεία απόκρισης στον υποκινητή τους, παρουσία και απουσία E2 (A. Farasani et al. 2015).

Ωστόσο, η οιστρογονική δράση του Aluminium αλλά και των αλάτων ACH στον καρκίνο του μαστού δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως καθώς παραμένουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με τους μηχανισμούς δράσης τους.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

- Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYS™
- Laminar Flow Hood Tel Star AV-30/70
- Incubator: New Brunswick (an Eppendorf Company) Galaxy 170S
- Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss Optronic Germany
- Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: Entrofriger- BLII/ PS Selecta®
- Μικροσκόπιο φθορισμού: LEICA DM 2000
- Ψυχόμενη κάμερα φθορισμού: OPTIMOS Q IMAGING
- Φυγόκεντρος Helme Z36HK
- Συσκευή ηλεκτροφόρισης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell
- Συσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot
- Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S
- Μηχάνημα εμφάνισης W.B και gel: FluoChemE/ ProteinSimple
- Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak
- Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων από την κάμερα φθορισμού: Q Capture Pro v.7.05™
- DNA/RNA UV-CLEANER UVC/T-AR (BIOSAN)
- Mastercycler gradient (Eppendorf)
- Stratagene MX 3005

2.2 ΥΛΙΚΑ

- i. Χημικά:
 - ACH 50% (Sigma)
 - Acrylamide/Bis acrylamide 40 % (Bio-Rad)
 - APS (Sigma)
 - Bradford protein assay (Bio-Rad)
 - BSA (Sigma)

- CaCl₂(Merck)
- CHCl₃ (AppliChem)
- MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen)
- HOECHST 33342 (Sigma)
- DMSO (Sigma)
- DTT (SERVA)
- EDTA (Panreac)
- ECL A +ECL B (Pierce)
- E2(Sigma)
- FBS Gibco® (Life Technologies - Invitrogen) *
- FUGENE (PROMEGA)
- HCl (Merck)
- ICI (SIGMA)
- KCl (Merck)
- KH₂PO₄ (Merck)
- L-Glutamine (Life Technologies - Invitrogen)
- Na₂HPO₄ (Merck)
- NaCl (Panreac)
- NaHCO₃ (Merck)
- NaOH (Merck)
- ONPG (Sigma)
- PMSF (SERVA)
- PVA (Sigma)
- RQ1 RNase-Free DNase kit (Promega)
- SDS (SIGMA)
- Skimmed milk powder (Regilait)
- SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen)
- SYBR Select Master Mix kit (Applied Biosystem)
- TEMED (Research Organics)
- Trypsin-EDTA 5% 10× (Gibco)
- Tween 20 (Euroclone)
- Trizol, TRI Reagent (SIGMA)
- Αιθανόλη (Panreac και Merck)
- Αιθανόλη 80% (SIGMA)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- Ισοπροπανόλη (SIGMA)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών Pageruler™ Prestained Protein Ladder (ThermoScientific Fermentas)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών Pageruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)

- Μεθανόλη (Merck)
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης Whatman (Protran)
- Πενικιλίνη-Στρεπταμυκίνη (Invitrogen)
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων ×5 ή Lysis Buffer ×5 (Promega)

ii. Θρεπτικά Υλικά:

- Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 4,5 g/mol Glucose και 1g/mol Glucose (Life Technologies - Invitrogen)
- Opti-MEM® (Life Technologies - Invitrogen)

Περιεκτικότητες των θρεπτικών μέσων:

DMEM 4,5 g/mol Glucose & DMEM 1 g/mol Glucose_: 10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S

iii. Διαλύματα:

- **PMSF 200 mM:**

Για την παρασκευή 2 mL PMSF 200 mM διαλύονται 0.07 gr PMSF σε 2 mL ισοπροπανόλης. Γίνεται ο διαμοιρασμός του σε aliquots των 200 µL και αποθηκεύονται στους -20 °C.

Με αραιώση 10 % σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20 mM.

- **Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (Sonication Buffer):**

Αποτελείται από 20 mM Tris pH 7.5, 0.5 % Triton X-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA και αποθηκεύεται στους 4 °C. Σε 1 mL από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 0.5 µL PMSF 20 mM (20 °C), 10 µL αναστολείς των πρωτεασών και 2 µL DTT 1 M (20 °C). Η DTT χρησιμεύει ως αναγωγικός παράγοντας.

- **Διάλυμα Bradford:**

Stock 5x. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1x, αραιωμένο με ddH₂O. Η αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford είναι 1:1000.

- **Sample Buffer 4x:**

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

- **Tris 20 mM pH 7.5:**

Σε πλαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf (1.5 mL) αναμειγνύονται 20 μL stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 (4 °C) με 980 μL ddH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε R.T.

- **Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:**

Για την παρασκευή 0.2 L διαλύματος ζυγίζονται 36,342 gr Tris τα οποία διαλύονται σε dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 12 N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **TEMED:**

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

- **APS 10 %:**

Παρασκευάζεται διαλύοντας 100 mg APS σε 1 mL ddH₂O. Αποθηκεύεται στους -20 °C και κατά τη διάρκεια χρήσης του παραμένει τοποθετημένο σε πάγο (4 °C).

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρισης (Running Buffer) 10×:**

Ζυγίζονται 30.3 gr Tris base και 144.00 gr γλυκίνης τα οποία διαλύονται σε όγκο 1 L ddH₂O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε R.T. (Ornstein, 1964; Davis, 1964).

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρισης (Running Buffer) 1×:**

Για την παρασκευή του R.B. 1× αραιώνονται 100 mL R.B. 10× σε 900 mL dH₂O (αναλογία 1:9). Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε αναλογία 0.1 %. (Laemmli, 1970). Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10×:**

Αποτελείται από 100ml Running Buffer 10×, 200ml MeOH και 5ml SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH₂O. Το διάλυμα φόρτωσης αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10×:**

Αποτελείται από 91 mM Na₂HPO₄, 17 mM NaH₂PO₄ και 1500 mM NaCl. Αποθηκεύεται σε R.T.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1×:**

Το stock buffer PBS 10× αραιώνεται σε κατάλληλο όγκο dH₂O ή ddH₂O και προστίθεται Tween-20 σε αναλογία 1 %. Αποθηκεύεται σε R.T.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (Sodium Phosphate buffer solution):**

Παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1 M pH 7.5 με ανάμειξη κατάλληλων όγκων από τα stock διαλύματα μονοβασικού NaH_2PO_4 0.2 M και διβασικού Na_2HPO_4 0.2 M. Τα stock διαλύματα παρασκευάζονται με διαλύτη το H_2O , κάνοντας τους κατάλληλους υπολογισμούς για τη μάζα της χημικής ένωσης που απαιτείται.

- **Διαλύματα για εμφάνιση σήματος:**

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα της Kodak. Αποτελείται από ένα διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Τα εκάστοτε διαλύματα παρασκευάζονται με ανάμειξη 1 : 3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε dH_2O .

iv. Πρωτογενή αντισώματα:

- Αντίσωμα έναντι ERα από κόνικλο, G20 (Santa Cruz)
- Αντίσωμα έναντι ERβ από κόνικλο, H150 (Santa Cruz)
- Αντίσωμα έναντι β- ακτίνης από επίμου (Sigma)
- Αντίσωμα έναντι Bcl-2 από επίμου, 2876 (Cell Signaling)
- Αντίσωμα έναντι p53 (DOKA)
- Αντίσωμα έναντι c-myc, 5605 (Cell Signaling)
- Αντίσωμα έναντι ERβ (IHC) MCA, (Serotec)
- Αντίσωμα έναντι ERα (IHC) MC20 (Santa Cruz)

v. Δευτερογενή αντισώματα:

- Αντίσωμα έναντι mouse IgG-HRP (Jackson Laboratories)
- Αντίσωμα έναντι rabbit IgG-HRP (Pierce Antibodies).
- Αντίσωμα έναντι goat IgG-HRP (Pierce Antibodies)
- Αντίσωμα για IHC α-R Alexa 488 (Santa Cruz)

vi. Αναλώσιμα:

- Σωληνάρια για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (cryovials ή cryotubes)
- Ειδικές φιάλες για ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων (Flasks)
- Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 mL, 50 mL)
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorfs (1.5 mL, 2.0 mL)
- Πιπέττες ορολογικές - Serological (2, 5, 10 και 25 mL)
- Ρύγχοι (0.2-10 μL , 20-200 μL και 100-1000 μL)
- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6x και 24x wells
- Καλυπτρίδες coverslips
- Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου
- Αιμοκυτταρόμετρο για μέτρηση κυττάρων, Neubauer
- Αυτόματος πιπεταδόρος

vii. Εκκινητές:

Μόριο	Εταιρία	Αλληλουχίες
GAPDH	Invitrogen	R: AGTCCTTTCCACGATACCAAAGT F: CATGAGAGTATGACAACAGCCT
ERα	Invitrogen	R: CCAATCATCAGGATCTCTAGCC F: TGATCCTACCAGACCCTTCAGT
ERβ	Invitrogen	R: AAGATGTAGAGCGGGCCTTT F: GCATGACAGATTCTACCACTCC
c-myc	Invitrogen	R: GCACAAGAGTTCCGTAGCTG F: CTGCAATGATACCGCGAGAC
c-fos	Invitrogen	R: AGTGACCGTGGGAATGAAGT F: GCTTCAACGCAGACTACGAG
Κυκλίνη D1	Invitrogen	R: GCATTTTGGAGAGGAAGTGTTT F: GTGGCCTCTAAGATGAAGGAGA
p53	Invitrogen	R: TCCGTCCCAGTAGATTACCACT F: AGGAAATTTGCGTGTGGAGTAT

viii. Κυτταρικές σειρές:

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν κατά κύριο λόγο δυο τύπου καρκινικές κυτταρικές σειρές, ιστού από αδένα μαστού. Αυτές ήταν οι:

- MDA-MB-231
- MCF-7

2.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ

▪ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

i. ΞΕΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι κυτταρικές σειρές που διαθέτουμε φυλάσσονται σε βαθιά κατάψυξη: είτε σε θερμοκρασία -80°C ή σε υγρό άζωτο, -120°C . Η διαδικασία του ξεπαγώματος είναι κοινή και για τις δύο θερμοκρασίες φύλαξης.

Αρχικά πρέπει να προετοιμαστούν τα πάντα προκειμένου μόλις ξεπαγώσει το vial να τοποθετηθούν τα κύτταρα στο θρεπτικό και να έρθουν κατά το δυνατόν σε λιγότερη επαφή με το DMSO το οποίο υπήρχε κατά τη φύλαξή τους.

Έχοντας ξεπαγώσει, βγάλε, και τοποθετήσει με λασκαρισμένα τα καπάκια, στο hood, όλα τα θρεπτικά, τοποθετούμε 4 ml θρεπτικού υλικού DMEM 4,5 g/mol Glucose σε δοκιμαστικό σωλήνα Falcon των 15 ml. Επιπλέον, βγάζουμε μία νέα φλάσκα καλλιέργειας, ανοίγουμε ελαφρώς το καπάκι και τοποθετούμε κάθετα στο hood. Κατόπιν, εξάγεται το cryovial από την κατάψυξη και τοποθετείται εντός του υδατόλουτρου. Δεν αφήνουμε το cryovial, αλλά το κρατάμε, προσέχοντας το νερό να μην έρχεται σε επαφή με το καπάκι αλλά ταυτόχρονα να καλύπτει τον μεγαλύτερο όγκο του παγωμένου περιεχομένου.

Μετά την πάροδο μερικών λεπτών (συνήθως 3-4 min) το περιεχόμενο του cryovial υγροποιείται και φαίνεται εντός του μία μικρή ποσότητα πάγου. Στη φάση αυτή, το βγάζουμε γρήγορα από τα υδατόλουτρο, σκουπίζουμε και ψεκάζουμε με αιθανόλη 70%. Αμέσως, το τοποθετούμε στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar flow hood). Εκεί, τοποθετούμε άμεσα το vial σε στατώ και ανοίγουμε γρήγορα και κάθετα το καπάκι του, προσέχοντας να μην έρθει σε επαφή η αιθανόλη με τα κύτταρα. Κατόπιν με σιφώνιο των 2 ml παίρνουμε το περιεχόμενο και το τοποθετούμε στον δοκιμαστικό σωλήνα με τα 4 ml θρεπτικού.

Το 15άρι falcon με το θρεπτικό και τα κύτταρα φυγοκεντρείται για 5 min σε 1000 rpm και σε θερμοκρασία άνω των 20°C (20-25°C). Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης γράφουμε τα στοιχεία των κυττάρων στη φλάσκα (όνομα κυτταρικής σειράς, ημερομηνία παγώματος και ξεπαγώματος, passage).

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο αναρροφάται με γυάλινη πιπέτα Pasteur και κατόπιν το ίζημα επαναδιαλύεται καλά, σε 5 ml θρεπτικού μέσου, DMEM 1 g/mol Glucose (low Glucose) -για τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία. Τέλος, το επαναδιαλυτοποιημένο περιεχόμενο λαμβάνεται με 5άρα ή 10άρα πιπέτα και τοποθετείται στη φλάσκα. Εκεί, γίνεται ξανά ήπια επαναδιαλυτοποίηση και κλείνοντας τη φλάσκα, βγάζουμε οριζόντια από το hood, την τοποθετούμε στο μικροσκόπιο και εξετάζουμε τη μορφή των ξεπαγωμένων κυττάρων. Μετά τη μικροσκοπική παρατήρηση, τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο, σε συνθήκες 37°C και 5.0 % CO₂.

ii. ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, η θρυψίνη επιδρά σπάζοντας τους δεσμούς μεταξύ των κυττάρων και τις διάφορες προσκολλήσεις που κάνουν τα κύτταρα στην επιφάνεια της φλάσκας. Αυτό είναι αναγκαίο σε περιπτώσεις κορεσμού (πλήρους κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας), σε περιπτώσεις πολλών και μεγάλων συσσωματωμάτων αλλά και πριν από τους περισσότερους χειρισμούς που απαιτείται η χρήση ή η μεταφορά κυττάρων. Η κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα passage.

Ξεπαγώνει η θρυψίνη και τα θρεπτικά υλικά και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 37°C . Αφαιρείται με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό που υπάρχει στη φλάσκα και τοποθετείται 1-1,5 ml θρυψίνη. Η φλάσκα κλείνει και με ήπιες κινήσεις, επιδιώκουμε όλα τα κύτταρα να διαβρέχονται από θρυψίνη. Παρατηρούμε γρήγορα στο μικροσκόπιο. Τοποθετούμε άμεσα τη φλάσκα στον επωαστικό κλίβανο για 1- 2 λεπτά. Βγάζουμε αμέσως μετά το πέρας (συνήθως του πρώτου λεπτού), εξετάζουμε στο μικροσκόπιο: ιδανικό είναι όλα τα κύτταρα – μεμονωμένα ή σε συσσωματώματα, να επιπλέουν. Αν αυτό δεν συμβαίνει, μπορούμε να ταρακουνήσουμε ελαφρά τη φλάσκα και να ξανά παρατηρήσουμε ή να τοποθετήσουμε για μισό λεπτό και πάλι στον κλίβανο. Προσέχουμε ιδιαίτερα τον χρόνο έκθεσης των κυττάρων στη θρυψίνη, γιατί η παρατεταμένη πρωτεόλυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροτοξική δράση.

Κατόπιν, τοποθετείται η φλάσκα σε όρθια θέση στο hood και προστίθενται σε αυτή 4 ml θρεπτικού μέσου, τα οποία και σταματούν τη δράση της θρυψίνης. Έπειτα, όλο το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε falcon των 15ml και φυγοκεντρείται (5min 1000rpm, 20-25 °C).

Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης, γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται περαιτέρω ή επανατοποθετούνται στη φλάσκα ανάπτυξης.

iii. ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ξεπαγώνουμε τα συστατικά που θα χρειαστούμε και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 37°C. Αυτά είναι, FBS, θρυψίνη και τα θρεπτικά που χρησιμοποιούμε. Ετοιμάζουμε παράλληλα και δύο κινούριους σωλήνες για το πάγωμα των κυττάρων σε βαθειά κατάψυξη- cryovial. Πάνω στα δύο cryovial γράφουμε τα στοιχεία των κυττάρων που πρόκειται να παγώσουμε (όνομα, ημ/νια, passage). Συνήθως παγώνουμε δύο- δύο cryovial αλλά αυτό εξαρτάται κι από το συνολικό αριθμό των κυττάρων που έχουμε, από το αν και πόση ποσότητα ανακαλλιέργεια θα βάλουμε και λοιπά.

Υπολογίζουμε πόσα ml από το FBS χρειαζόμαστε (για δύο cryovial και ανακαλλιέργεια). Ξεκινάμε και κάνουμε τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, όπως αυτή περιγράφηκε στην παραπάνω παράγραφο. Μόλις τελειώσει η φυγοκέντριση, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύεται στην ποσότητα του βόειου ορού που έχει υπολογιστεί προηγουμένως. Κατόπιν, σε κάθε cryovial τοποθετούνται 0,9 ml FBS με τα κύτταρα. Το υπόλοιπο, επανατοποθετείται στη φλάσκα και συμπληρώνεται (έως τα 5ml) DMEM Low Glucose. Η φλάσκα επανατοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο. Γενικά, προσέχουμε να τακτοποιήσουμε όλες τις «εκκρεμότητες» στο γύρω χώρο πριν προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα του παγώματος.

Μόλις είμαστε έτοιμοι, τοποθετούμε 0,1 ml DMSO (εξαιρετικά κυτταροτοξικό), κλείνουμε άμεσα το cryovial και με συνεχόμενη ανάδευση πάνω- κάτω, τοποθετούμε σε κατάψυξη, κατά το γρηγορότερο δυνατόν. Τέλος, σημειώνεται σε κατάλληλο αρχείο, η θέση του/ των cryovial.

iv. ΜΕΤΡΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

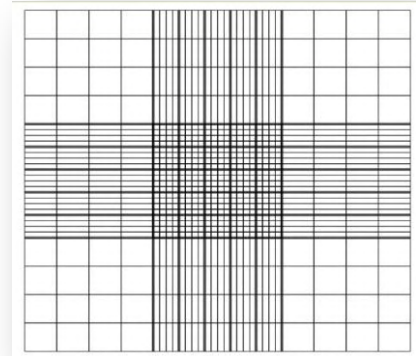
Για τους μετέπειτα χειρισμούς των κυττάρων (πχ. στρώσιμο σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6x και 24x wells), για να προστεθούν ουσίες και κατόπιν συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος να μετρηθεί με ανοσολογικές μεθόδους η κυτταρική απόκριση, για μετέπειτα εξέταση με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές (IHC) και λοιπά, απαιτείται μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού και ισόποση τοποθέτησή του σε well plate.

Κατά τη διαδικασία λοιπόν του μετρήματος του κυτταρικού πληθυσμού, ξεκινάμε με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης. Μετά την επαναδιαλυτοποίηση (που στην περίπτωση της μέτρησης πρέπει να είναι κατά το δυνατόν τέλεια), παίρνουμε 10μL (με κατάλληλη πιπέτα)

από τα κύτταρα και τα εισάγουμε εντός της καλυπτρίδας στο αιμοκυτταρόμετρο neubaueer (φαίνεται στην εικόνα αριστερά).

Κατόπιν τοποθετούμε την πλάκα neubaueer στο μικροσκόπιο. Εκεί, εστιάζουμε στα τεταρτημόρια και ξεκινάμε να μετράμε για κάθε ένα τα κύτταρα που βρίσκονται εκεί.

Όπως, φαίνεται και στην εικόνα δεξιά, αρχικά εστιάζουμε στο σταυρό και κατόπιν από το κέντρο του μπορούμε να ξεχωρίσουμε τα τεταρτημόρια (αλλά και να προσανατολιστούμε). Συνήθως το 1^ο πάνω αριστερά τεταρτημόριο, ονομάζεται Α, το αμέσως διπλανό του Β, κάτω από το Β είναι το Γ και αριστερά του Γ (δηλ. κάτω από το Α) είναι το Δ. έτσι, η μέτρηση γίνεται από το Α→Δ. Για κάθε τεταρτημόριο, σημειώνεται ο αριθμός των κυττάρων που βρέθηκε. Κατόπιν, βγαίνει ο μέσος όρος των κυττάρων ανά τεταρτημόριο: $\mu.o. = (A+B+\Gamma+\Delta)/4$ και αυτός έπειτα πολλαπλασιάζεται με 10.000. Έτσι, ξέρουμε κατά προσέγγιση τον κυτταρικό πληθυσμό που διαθέτουμε, ανά ml.



Έπειτα, για να υπολογιστούν τα ml (από το επαναδιαλυτοποιημένο κυτταρικό ίζημα της φυγοκέντρησης)- και έχοντας ήδη υπολογίσει ανάλογα με το τι θα κάνουμε μετά, το συνολικό πληθυσμό που χρειαζόμαστε, κάνουμε το εξής:

«διαιρούμε→ (κύτταρα που θέλουμε)/ (κύτταρα που έχουμε)»

Η διαίρεση αυτή μας δίνει τον όγκο που πρέπει να πάρουμε από το falcon που περιέχει τα κύτταρα, προκειμένου να συνεχιστεί η πειραματική διαδικασία η οποία επιτελείται. Επειδή, συνήθως έχει περάσει αρκετή ώρα από την πρώτη επαναδιαλυτοποίηση, αυτή γίνεται εκ νέου, ώστε ο κυτταρικός πληθυσμός να είναι ομοιογενής στο θρεπτικό.

Ο όγκος που λαμβάνεται, τοποθετείται σε νέο falcon, προκειμένου να φυγοκεντρηθεί (όμοια, 5 λεπτά 1000rpm 20-25°C) εκ νέου -μόνο ο κυτταρικός πληθυσμός που θα χρησιμοποιηθεί εν συνεχεία, τα υπόλοιπα κύτταρα συνήθως επιστρέφονται για ανακαλλιέργεια.

Ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που επιτελείται, μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, επαναδιαλυτοποιούμε στην υπολογισμένη ποσότητα θρεπτικού και μοιράζουμε στα wells που θα χρειαστούμε.

Στην περίπτωση, που απαιτείται η μελέτη του αποτελέσματος της κυτταρικής αποκρίσεως με ανοσοϊστοχημεία, έχει προηγηθεί το στρώσιμο καλυπτρίδων (coverslips) εντός των wells στο plate. Μετά την τοποθέτηση των καλυπτρίδων, που γίνεται στον χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών, το plate παραμένει στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής, ανοιχτό

και υπό τη δράση του UV light, για τουλάχιστον μισή ώρα, προκειμένου να είναι πλήρως αποστειρωμένο. Η πλάκα που φέρει καλυπτρίδες, κατά τη διαδικασία του στρωσίματος αντιμετωπίζεται όμοια με αυτή που δε φέρει.

Τέλος, μετά την τοποθέτηση των κυττάρων εντός των πηγαδιών, το plate κλείνει και γίνεται μία περιφερική κίνηση προκειμένου να είναι ομοιόμορφη η κατανομή των κυττάρων εντός των πηγαδιών. Προσοχή, να μην γίνεται έντονη ανακίνηση, διότι λόγω στατικού ηλεκτρισμού τα κύτταρα τείνουν να συγκροτούν συσσωματώματα στο κέντρο. Πριν, τοποθετηθούν στον επωαστικό κλίβανο, εξετάζεται η εικόνα τους μικροσκοπικά.

ν. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η προσθήκη ουσιών, είναι ένας από τους λόγους που επιλέγεται η τοποθέτηση των κυττάρων σε πλάκες με (πηγαδάκια well plates). Ουσιαστικά, σε κάθε πηγαδάκι προστίθεται μία διαφορετική χημική ουσία, ενώ σε κάποιο από τα wells δεν τοποθετείται ουσία (control) και σε κάποιο άλλο τοποθετείται η φυσική ουσία (ως θετικός μάρτυρας). Κατόπιν, εφόσον τα κύτταρα επωάζονται με τις ουσίες για συγκεκριμένο χρόνο, αυτές αφαιρούνται και γίνεται λύση και συλλογή τους με απώτερο σκοπό την περαιτέρω μελέτη (συνέχεια εργασίας εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών). Η τελευταία διαδικασία είναι αποκαλείται harvesting.

Κατά την παρούσα μελέτη η ουσία η οποία μελετήθηκε ήταν το άλας του αργιλίου, συγκεκριμένα ACH, το οποίο έχει φανεί να έχει οιστρογονική δράση. Έτσι, ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η E2 (17β-οιστραδιόλη) και ως αρνητικός μάρτυρας το ICI 182,780 (7α,17β-(9-((4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl)nonyl)estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol) το οποίο και δρα ως αγωνιστής του υποδοχέα των οιστρογόνων.

Παρακάτω, παρουσιάζεται ένα παράδειγμα για την προσθήκη των συγκεκριμένων ουσιών, σε 6x well plate (2ml / well)+1 well από άλλο well plate :

Πρώτα γίνεται παρασκευή των επιθυμητών συγκεντρώσεων από τα stock που διατίθενται.

Για το ACH, υπάρχει σε αρχικό stock 7,5 M και έχει τελική συγκέντρωση ίση με 10^{-4} M. Άρα, σε 990 μl ddH₂O προστίθενται 150 μl ACH και αναδεύονται καλά. Η τωρινή συγκέντρωση ισούται με 1 M. Από το ACH (1M) αραιώνονται 100 μl σε 900 μl δις απεσταγμένου ύδατος. Η τελική συγκέντρωση τώρα είναι 0,1 M.

Η E2 βρίσκεται σε απόθεμα σε συγκέντρωση 10^{-6} M και έχει τελική συγκέντρωση ίση με 10^{-9} M. Η οιστραδιόλη, έχει ως διαλύτη την αιθανόλη.

Το ICI είναι σε απόθεμα 10^{-3} M και τοποθετείται σε συγκέντρωση 10^{-6} M. Διαλύτης του είναι το DMSO.

Επομένως:

Well No1: Control, 2ml DMEM cis +2μl EtOH 100% +2 μl DMSO

Well No2: E2, 2ml DMEM cis +2 μ l E₂(10⁻⁶M)+ 2 μ l DMSO

Well No3: ACH, 2ml DMEM cis +2 μ l EtOH+ 2 μ l ACH (10⁻¹ M) +2 μ l DMSO

Well No4: E2+ACH, 2ml DMEM cis +2 μ l E₂(10⁻⁶M)+ 2 μ l ACH (10⁻¹ M) +2 μ l DMSO

Well No5: ICI, 2ml DMEM cis +2 μ l EtOH +2 μ l ICI (10⁻³M)

Well No6: E2+ICI, 2ml DMEM cis +2 μ l E₂(10⁻⁶M) +2 μ l ICI (10⁻³M)

Well No7: ACH+ICI, 2ml DMEM cis +2 μ l EtOH+2 μ l ACH (10⁻¹M) +2 μ l ICI (10⁻³M)

Μετά την τοποθέτησή τους, τα well plates τοποθετούνται εκ νέου στον επωαστικό κλίβανο και παραμένουν εκεί για 2-3 ή 4-5 μέρες.



Μετά το πέρας των δεδομένων ημερών γίνεται απόξεση (Harvesting) και λύση των κυττάρων.

Κατά τη διαδικασία της απόξεσης από το πηγαδάκι, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, γίνεται μία πλύση με PBS 1X, άμεσα και κατόπιν τοποθετείται το Lysis Buffer 1X. Ολόκληρη η πλάκα εξάγεται από τον χώρο των κυτταροκαλλιεργειών και τοποθετείται για μισή ώρα σε ψυχρό θάλαμο υπό ανάδευση. Μόλις, επέλθει το μισάωρο- εφόσον έχουν ετοιμαστεί άδεια erpendorfs (ένα για το κάθε πηγαδάκι), το περιεχόμενο των wells αποξάινεται με ειδικό εργαλείο ή με το τιπ της πιπέτας. Το LB συλλέγεται με τα κύτταρα στα erpendorfs. Μετά από αυτό μπορεί να γίνει αμέσως φυγοκέντρηση (15.000 rpm, 5min, 4 °C) και κατόπιν λύση με υπερήχους και μέτρηση συνολικής πρωτεΐνης, με τη μέθοδο Bradford, ή να φυλαχθούν τα δείγματα σε βαθιά κατάψυξη (-80 °C) και να προχωρήσουμε παρακάτω σε δεύτερο χρόνο.

▪ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

- i. ΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (SONICATION) ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ (ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD)

Κατά τη διαδικασία του sonication, ουσιαστικά, θέλουμε να επιτύχουμε κατά το δυνατόν μεγαλύτερη λύση των κυττάρων. Συνήθως, επαναλαμβάνουμε 5 κύκλους όπου τα κυτταρικά περιεχόμενα εκτίθενται για 1'' στους υπερήχους που εκπέμπονται από την αντίστοιχη συσκευή (Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S). Οι κύκλοι απέχουν μεταξύ τους διάστημα ίσο με μισό λεπτό.

Εφόσον ολοκληρωθούν οι δεδομένοι κύκλοι, τα δείγματα είναι πλέον έτοιμα για περαιτέρω επεξεργασία. Στην προκειμένη περίπτωση, γίνεται μέτρηση του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου, με τη μέθοδο Bradford. Αυτό αποσκοπεί στον μετέπειτα υπολογισμό της ποσότητας από τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθεί για να γίνει ηλεκτροφόριση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Η μέθοδος Bradford έχει βασική αρχή την αλλαγή της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία υπό όξινες συνθήκες, μπορεί από την καφέ-κόκκινη να μετατραπεί στη μπλε μορφή της, προσδεδεμένη με τις πρωτεΐνες που εμπεριέχονται στο προς εξέταση διάλυμα. Η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα 595nm.

Πρακτικά, ετοιμάζονται τόσοι δοκιμαστικοί σωλήνες όσα και τα δείγματα που διαθέτουμε +1 ακόμη, που θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό, για το μηδενισμό του φωτομέτρου. Επειδή, το απόθεμα του αντιδραστηρίου Bradford που διατίθεται στο εργαστήριο είναι 5X, χρησιμοποιώντας το νόμο της αραίωσης προκύπτει το επιθυμητό 1X. Από αυτό, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται 1ml αντιδραστηρίου Bradford και κατόπιν σχεδόν παράλληλα σε όλα, 1μL από το κάθε δείγμα. Μετά από άμεσο vortex, τα δείγματα τοποθετούνται σε σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Μόλις ολοκληρωθεί ο χρόνος αντίδρασης, τα δείγματα αφαιρούνται από το σκοτάδι και φωτομετρούνται στα 595nm, μετά από μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου με το τυφλό.

Η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος υπολογίζεται από τον τύπο $y=0,0345x+0,01$, όπως αυτός προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA, που έγινε στο εργαστήριο.

Τα δεδομένα αναλύονται με τη βοήθεια του προγράμματος excel, παρέχοντας τελικώς την ακριβή σύσταση των δειγμάτων για την ηλεκτροφόριση.

ii. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ- ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Μετά τον υπολογισμό της σύστασης των δειγμάτων που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, προχωρούμε στην παρασκευή τους. Τα δείγματα ηλεκτροφόρισης περιέχουν τα εξής:

- Total cell extract
- Tris HCl pH 7,5
- SB 4X 20μl (σταθερή ποσότητα)

* Οι υπόλοιποι όγκοι καθορίζονται ανάλογα με την πρωτεϊνική συγκέντρωση του κυτταρικού εκχυλίσματος, ο τελικός όγκος είναι 80μl

Μετά την ετοιμασία τους, τα δείγματα φόρτωσης παραμένουν στον πάγο. Παράλληλα ξεκινάμε την κατασκευή της πηκτής πολύ-ακρυλαμίδης. Πρωτίστως, παρασκευάζεται η γέλη διαχωρισμού (separating gel), η σύσταση της οποίας περιλαμβάνει τα εξής (περιεκτικότητας 10%):

ddH ₂ O	2,425 ml
1,5 M Tris HCl pH= 8,8	1,25ml
SDS 10%	50μl
Bis Acr. 40%	1,25ml
Temed	2.5 μl
APS 10%	25 μl

Για να ξεκινήσουμε την όλη διαδικασία, πρέπει να έχει ετοιμαστεί και στηθεί η συσκευή κατασκευής του gel. Ουσιαστικά, πρέπει να εφαρμοστούν και να κλείσουν σωστά τα δύο τζάμια, να τοποθετηθούν στη βάση τους και να γίνει έλεγχος για τυχόν διαρροή. Είναι επίσης σημαντικό, κατά την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού να μπουν τα συστατικά με τη σειρά που παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα. Τα τελευταία τρία συστατικά, απαιτείται να εισαχθούν κατά το δυνατόν ταυτόχρονα.

Μόλις ετοιμαστεί το gel, αναδεύεται και άμεσα, εγχύεται μεταξύ των δύο τζαμιών. Ταυτόχρονα, στην πάνω περιοχή μένει ένα κενό 2-3 εκατοστών για να τοποθετηθεί σε δεύτερο χρόνο το gel προσκόλλησης. Στο κενό εκείνο τοποθετείται ισοπροπανόλη, προκειμένου να διατηρηθεί υγρό, κατά το χρόνο πήξης του υπόλοιπου όγκου του. Ο χρόνος πήξης είναι περίπου μισή ώρα.

ddH ₂ O	2,025 ml
Tris HCl pH= 6,8	0,21ml
SDS 10%	25 μl
Bis Acr.40%	0,25 ml
Temed	2,0 μl
APS 10%	12,5 μl

Με
την

πάροδο του χρόνου πήξης, ξεκινάμε τη δημιουργία του gel προσκόλλησης, η σύσταση του οποίου είναι η ακόλουθη:

Κατά την δημιουργία του gel αυτού, πριν εισαχθούν τα τρία τελευταία συστατικά, που είναι άκρως σημαντικό να μπουν σχεδόν ταυτόχρονα και το gel να εισαχθεί στη βάση του, αφαιρείται η ισοπροπανόλη από το πάνω μέρος του διαχωριστικού gel, με απόχυσή της στο πλάι. Κατόπιν, τοποθετούνται τα τρία τελευταία συστατικά, γίνεται γρήγορα ομογενοποίηση και τέλος αποχύνεται το νέο gel στα τζαμάκια στη βάση, προκειμένου να πήξει και παράλληλα να κολλήσει με το gel διαχωρισμού. Αμέσως μόλις αποχυθεί το υγρό gel, εισάγονται τα χτενάκια που θα δημιουργήσουν τα πηγαδάκια φόρτωσης. Ο χρόνος πήξεως είναι 30 λεπτά της ώρας.

Ενώ αναμένεται η ολοκλήρωση της αντίδρασης πολυμερισμού της ακρυλαμίδης, ενεργοποιούμε τη συσκευή Heat Blocker, ρυθμίζοντας τη θερμοκρασία στους 95°C. Παράλληλα, στήνουμε και τη συσκευή ηλεκτροφόρισης, στήνοντας την ειδική κασετίνα και κατόπιν γεμίζοντας εξωτερικά με διάλυμα ηλεκτροφόρισης (δεύτερης χρήσης). Εφόσον, έχει πήξει το gel, τα τζαμάκια εξάγονται από τη βάση τους και τοποθετούνται στην κασετίνα που έχουμε εισάγει στη συσκευή ηλεκτροφόρισης. Έπειτα, αφαιρείται το χτενάκι, προκειμένου να ετοιμαστούν τα πηγαδάκια. Μόλις όλα αυτά ετοιμαστούν, γεμίζουμε ως το χείλος, εντός της κασετίνας με φρέσκο διάλυμα ηλεκτροφόρισης.

Σε επόμενο στάδιο, εξάγουμε τα δείγματα από τον πάγο και τα τοποθετούμε στο Heat Blocker (5min ή 3min ανάλογα με το αν έχουν υποστεί ξανά θέρμανση ή όχι).

Τέλος, τα δείγματα υπόκεινται σε ελαφρό spin για χρόνο 3'' και κατόπιν, φορτώνονται στα πηγαδάκια. Ο όγκος φόρτωσης για τα δείγματα είναι 15 μl και παράλληλα, σε παρακείμενο πηγαδάκι, φορτώνονται 1 μl δείκτη γνωστού μοριακού βάρους.

Μετά την ολοκλήρωση της φόρτωσης των δειγμάτων, τοποθετείται προσεχτικά, το καπάκι με τα ηλεκτρόδια της συσκευής. Είναι πολύ σημαντικό, τα χρώματα των επαφών (μαύρο και κόκκινο) και των ηλεκτροδίων να ταυτίζονται. Ενεργοποιείται και ρυθμίζεται το τροφοδοτικό ρεύματος στα 0,02 mA. Ξεκινάμε την εφαρμογή της τάσης. Το gel αφήνεται να «τρέξει» για όσο χρόνο χρειαστεί.

Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία, απενεργοποιείται το τροφοδοτικό και γίνονται οι προετοιμασίες για να γίνει ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

iii. ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΙΣΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΑΦΟΡΑ

Καθώς ολοκληρωθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρισης ξεκινάει το επόμενο στο βήμα, στο οποίο γίνεται η εξισορρόπηση, δηλαδή η εμβάπτιση της μεμβράνης, των σφουγγαριών, των χαρτιών whatman, καθώς και του gel, στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς για 10 λεπτά. Πρακτικά, σε δοχείο που χωράει τη μεμβράνη, τα χαρτιά whatman και τα σφουγγαράκια, τοποθετείται φρέσκο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και εμβαπτίζονται όλα τα παραπάνω μέσα σε αυτό.

Παρομοίως, σε δεύτερο δοχείο, τοποθετείται χρησιμοποιημένο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και εμβαπτίζεται εντός του το gel. Μετά το πέρας του δεκαλέπτου, στήνεται η κασετίνα στην οποία θα τοποθετηθούν τα περιεχόμενα των δύο δοχείων.

Κατά το στήσιμο αυτής της κασετίνας, εργαζόμαστε ως εξής:

Η κασετίνα τοποθετείται ανοιχτή, με την μαύρη πλευρά προς τα κάτω και την άσπρη προς τα πάνω. Στην κάτω πλευρά, τοποθετείται πρωτίστως, ένα σφουγγαράκι, όχι πολύ στραγγισμένο και έπειτα δύο χαρτιά whatman. Παίρνοντας το δεύτερο χαρτί whatman από το διάλυμα, επιχειρείται η ταυτόχρονη «αλίευση» και της μεμβράνης, η οποία τοποθετείται

ακριβώς πάνω από το δεύτερο χαρτί. Κατόπιν το gel τοποθετείται ακριβώς πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, προσέχοντας όσο γίνεται να είναι ευθυγραμμισμένο με αυτή αλλά και όλες οι περιοχές που έχουν μπάντες να εφάπτονται στη μεμβράνη. Μετά, τοποθετούνται εκ νέου δύο χαρτιά whatman. Σημαντικό είναι, σε κάθε βήμα από την τοποθέτηση της μεμβράνης και έπειτα να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην πλήρη εφαρμογή των αντικειμένων μεταξύ τους, διότι η ύπαρξη φυσαλίδων, θα έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη κενών σημείων στη μεμβράνη. Τέλος, τοποθετείται και το δεύτερο σφουγγαράκι, κλείνοντας την κασετίνα πολύ προσεκτικά και τοποθετώντας τη στη συσκευή που θα γίνει η ηλεκτρομεταφορά.

Η συσκευή αυτή είναι πολύ σημαντικό να είναι βυθισμένη σε πάγο γιατί είναι επικίνδυνο, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται από την εφαρμογή της τάσης και από το κύκλωμα που δημιουργείται κατά την ηλεκτρομεταφορά, ενδέχεται να καεί το gel και η μεμβράνη. Έχοντας, λοιπόν, ήδη τοποθετήσει την παγοκύστη εντός της συσκευής, τοποθετούμε την κασετίνα με συγκεκριμένη φορά και κατόπιν γεμίζουμε όλο το δοχείο με φρέσκο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς. Τοποθετείται τέλος, το καπάκι με τα ηλεκτρόδια, προσέχοντας να γίνει στη σωστή πλευρά η εφαρμογή και ενεργοποιείται το τροφοδοτικό. Η διαδικασία αυτή, απαιτεί τάση ίση με 0.35 A και χρόνο πραγματοποίησης 70 λεπτά.

iv. BLOCKING ME ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΤΟ ΠΡΩΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ

Μόλις επέλθει ο χρόνος ηλεκτρομεταφοράς, το τροφοδοτικό απενεργοποιείται και η μεμβράνη (που πλέον φέρει τις πρωτεΐνες που είχαν ηλεκτροφορηθεί), τοποθετείται εντός PBST 1x προκειμένου να σημειωθεί ο δείκτης γνωστού μοριακού βάρους με μολύβι, και να μαρκαριστεί παράλληλα και η «καλή» της πλευρά, δηλαδή στη πλευρά που έχουν αποτυπωθεί οι πρωτεΐνες. Με αυτό τον τρόπο, η μεμβράνη εκτός των άλλων έχει πλυθεί με PBST 1x για μία φορά.

Στη συνέχεια, έπεται το επόμενο βήμα, το οποίο έχει ως σκοπό την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων από τα αντισώματα που εμπεριέχονται στο γάλα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα εμφάνισης ψευδούς θετικού αποτελέσματος (ή μεγάλου Background), λόγω μη ειδικής σύνδεσης του αντισώματος (που θα εφαρμοστεί). Η διαδικασία αυτή, περιλαμβάνει την επώαση της μεμβράνης (μία ώρα υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου), σε γάλα, 10%.

Παρασκευάζεται το διάλυμα του γάλακτος, αραιώνοντας δέκα μέρη σκόνης γάλακτος σε 100 μέρη PBST 1x και αναδεύοντας καλά για να γίνει η ομογενοποίησή του.

Μετά την πάροδο της μίας ώρας επώασης, γίνεται μία πλύση με PBST 1x και κατόπιν τοποθετείται η μεμβράνη στο πρώτο αντίσωμα. Σε αυτό το βήμα, το αντίσωμα που πρόκειται να επωαστεί η μεμβράνη, έχει ήδη βγει από τους -20°C και έχει τοποθετηθεί σε πάγο, προκειμένου να ξεπαγώσει ομαλά. Ενώ λοιπόν αυτό έχει ξεπαγώσει, αναδεύεται ομαλά για να ομογενοποιηθεί και κατόπιν ετοιμάζεται το σακουλάκι στο οποίο θα εισαχθεί η μεμβράνη για να επωαστεί με το αντίσωμα. Πρακτικά, η μεμβράνη περικλύζεται ρηθικά

μεταξύ δύο νάιλον διαφανειών από τρία μέρη και πριν κλείσει και από το τέταρτο μέρος, εισάγεται σε αυτή την αυτοσχέδια σακούλα, το αντίσωμα. Κατόπιν, κλείνεται με θερμοκόλληση και από την τέταρτη πλευρά, τοποθετείται σε μεγάλο τριβλίο και εισάγεται στο coldroom (4°C), όπου θα παραμείνει εκεί υπό ανάδευση, για overnight επώαση.

Την επόμενη μέρα, το αντίσωμα μαζεύεται στο σωληνάκι (falcon) στο οποίο βρισκόταν, και η μεμβράνη πλένεται πέντε φορές με PBST 1x , προκειμένου να προετοιμαστεί για την προσθήκη του δεύτερου αντισώματος. Οι πλύσεις (5 πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία, σε R.T και υπό ανάδευση), έχουν ως σκοπό να διώξουν την περίσσεια του αντισώματος και επομένως να μείνει στη μεμβράνη μόνο ότι έχει δέσει ειδικά, δηλαδή στους συγκεκριμένους επίτοπους, για τους οποίους φτιάχτηκε και προστέθηκε το αντίσωμα.

v. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ -WESTERN BLOT

Το δεύτερο αντίσωμα προστίθεται, όντας ειδικό έναντι κάποιων επιτόπων του πρώτου αντισώματος (συνήθως το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά σταθερές περιοχές επιτόπων IgG του πρωτογενούς αντισώματος και είναι ειδικό του ζώου από το οποίο έχει παραχθεί). Επιπλέον, είναι χημικά προσδεδεμένο με κατάλληλο προσδέτη (HRP), που επιτρέπει την ανίχνευσή του. Εφόσον, λοιπόν, έχουν λάβει χώρα οι πλύσεις από την επώαση του πρώτου αντισώματος, γίνεται η ίδια διαδικασία για την προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος. Ο χρόνος επώασης για το δεύτερο αντίσωμα είναι περίπου μία ώρα και 20 λεπτά.

Ενώ αφαιρείται το δευτερογενές αντίσωμα, γίνονται εκ νέου 4X πλύσεις με PBST 1X, διάρκειας 5 min η κάθε μία. Κατόπιν, ετοιμάζεται η κασετίνα προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης Western.

Η μεμβράνη τοποθετείται σε γυάλινη επιφάνεια και διαβρέχεται με τα διαλύματα ECL A και ECL B, τα οποία ουσιαστικά είναι αυτά που επιτρέπουν την εμφάνιση του σήματος. Γίνεται ανάμειξη κατάλληλου όγκου των δύο σε αναλογία 1:1 και με το διάλυμα αυτό επωάζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για 3 min (σκοτάδι, R.T.). Ακολούθως, η μεμβράνη τοποθετείται εντός μιας πλαστικής διαφανούς μεμβράνης σε μία ειδική κασέτα που δεν επιτρέπει τη διέλευση του φωτός.

Κατόπιν, έπεται η διαδικασία της εμφάνισης σήματος, η οποία λαμβάνει χώρα στο σκοτεινό θάλαμο εμφάνισης. Εκεί, ετοιμάζεται κατάλληλα ο χώρος ούτως ώστε να είναι δυνατή η πραγματοποίηση όλων των κινήσεων σε απόλυτο σκοτάδι.

Η διαδικασία περιλαμβάνει, την τοποθέτηση κατάλληλου μήκους film εντός τη κασετίνας και την επαφή του με τη μεμβράνη για τον ανάλογο χρόνο που απαιτείται. Έπειτα, το film εξάγεται από τη κασετίνα και εμβαπτίζεται διαδοχικά σε διάλυμα developer υπό ανάδευση για περίπου 1 min, ξεπλένεται ελαφρώς σε νερό και αμέσως τοποθετείται σε διάλυμα σταθεροποίησης σήματος fixer (ομοίως υπό ανακίνηση για χρονική διάρκεια περίπου ενός λεπτού). Μετά την ολοκλήρωση της εμβάπτισης του film στο fixer, αυτό ξεπλένεται σε νερό

και κατόπιν εξετάζεται το αποτέλεσμα της εμφάνισης. Αναλόγως του αποτελέσματος επαναλαμβάνουμε, εκθέτοντας το film για διαφορετικό χρονικό διάστημα στη μεμβράνη.

vi. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ (IHC)

Με την ανοσοϊστοχημική μελέτη, επιτρέπεται ο προσδιορισμός μορίων τοπικά, μέσα στον ιστό ή το κύτταρο που μελετάται με τη χρήση συγκεκριμένων, φθοριζόντων αντισωμάτων, ειδικά για κυτταρικά οργανίδια αλλά και για τα υπό μελέτη μόρια. Η αρχή της διαδικασίας, λαμβάνει χώρα στην αίθουσα των κυτταροκαλλιιεργειών, όπου πριν από την προσθήκη των κυττάρων στα ειδικά πηγαδάκια, τοποθετούνται καλυπτρίδες (coverslips). Μετά την τοποθέτησή τους, οι καλυπτρίδες αφήνονται για τουλάχιστον μισή ώρα υπό την ακτινοβολία του UV. Κατόπιν της αποστείρωσης, όλες οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα είναι όμοιες με εκείνες που αναλύθηκαν παραπάνω, για τη μέτρηση και το στρώσιμο των κυττάρων, την ενδεχόμενη παροδική διαμόλυνση και την προσθήκη ουσιών. Επιπλέον, όλοι οι κυτταρικοί χειρισμοί (αλλαγή θρεπτικού μέσου, φύλαξη, μικροσκοπική παρατήρηση), γίνονται κατά πανομοιότυπο τρόπο, είτε υπάρχουν είτε όχι καλυπτρίδες.

Εφόσον λοιπόν, έχουν γίνει όλοι οι απαραίτητοι πειραματικοί χειρισμοί, προκειμένου να εξεταστούν τα δείγματα ανοσοϊστοχημικά, απαιτείται ο χειρισμός τους με μία συγκεκριμένη μεθοδολογία, που περιλαμβάνει τη μονιμοποίηση (fixation), την προσθήκη πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων, και εν τέλη την προσκόλλησή των καλυπτρίδων σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες και την εξέταση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Συγκεκριμένα, η παραλλαγή στους χειρισμούς αρχίζει, στο στάδιο της προσθήκης των ουσιών, ενώ το βασικό επερώτημα είναι αν απαιτείται η χρώση και η παρατήρηση των μιτοχονδρίων, ή όχι. Εάν, όντως στη μελέτη πρέπει να συμπεριληφθούν και εικόνες από τα μιτοχόνδρια, τότε στα μίγματα που παρασκευάζονται για τις ουσίες, εισάγεται μαζί και η κόκκινη χρωστική των μιτοχονδρίων, CMX ROS. Ο ελάχιστος χρόνος επαφής της χρωστικής με τα ζώντα κύτταρα είναι τριάντα λεπτά.

Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα η διαδικασία της μονιμοποίησης. Από το στάδιο αυτό και έπειτα, δεν απαιτούνται στείρες συνθήκες, γι' αυτό και συνήθως εργαζόμαστε εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών. Η διαδικασία, περιλαμβάνει δύο συνεχόμενες πλύσεις με κρύο PBS 1X και κατόπιν την προσθήκη παγωμένης μεθανόλης (συνήθως βρίσκεται σε βαθιά κατάψυξη στους

-80°C), τόση όση να καλύπτει όλη την επιφάνεια (περίπου 500 μl). Τα δείγματα, τοποθετούνται στους -20°C, σε ευθεία θέση, για διάστημα 10 min. Κατόπιν, αναρροφάται η μεθανόλη. Εάν στα δείγματα είχε προστεθεί η κόκκινη μιτοχονδριακή χρωστική CMX ROS, απαιτείται και άμεση προσθήκη ακετόνης (κατά τον ίδιο τρόπο) και η άφεση τους σε θερμοκρασία -20°C για 3min.

Εάν, έχει χρησιμοποιηθεί ακετόνη: με την πάροδο των 3 min, αναρροφούμε την ακετόνη και αφήνουμε τις καλυπτρίδες (περι 20 δευτερολέπτων), προκειμένου η περίσσεια της να εξατμιστεί. Λόγο της υψηλής διαβρωτικής δράσης της ακετόνης προσθέτουμε PBS 1X και μεταφέρουμε τις καλυπτρίδες σε νέα, μη διαβρωμένα πηγαδάκια, που ήδη περιέχουν PBS 1X.

Εάν δεν έχει τοποθετηθεί ακετόνη, το παραπάνω βήμα παραλείπεται και κατόπιν, πραγματοποιούνται 2X πλύσεις με PBST 1X, και τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε μέρος κατάλληλο για την προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος.

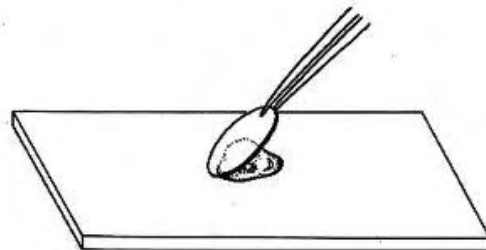
Γίνεται δε, η παρασκευή του πρωτογενούς αντισώματος, (σε αναλογία 1/50) και μία σταγόνα (25 μl) από το διάλυμα του αντισώματος τοποθετείται επί της καλυπτρίδας, και αφήνεται στο σκοτάδι και σε R.T, να επωαστεί για μία ώρα.

Με τη πάροδο του χρόνο επώασης, έπονται δύο πλύσεις με PBST 1X και κατόπιν η προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος.

Το δευτερογενές αντίσωμα, περιλαμβάνει (για τις δικές μας πειραματικές προσεγγίσεις που ως πρωτογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε κυρίως ο ER β H150), το anti- R-Alexa 488, σε αναλογία 1/500 (σε PBST 1X clear) και 0,25 μl Hoechst (μπλε χρωστική των πυρήνων).

Τοποθετούνται 50 μl σε κάθε καλυπτρίδα και αφήνονται υπό τις ίδιες συνθήκες για μία ώρα επώαση. Τέλος, ακολουθούν δύο εκ νέου πλύσεις με PBST 1X και η κόλληση τους - από την πλευρά που έχουν γίνει οι επωάσεις (με την προσθήκη μίας σταγόνας PVA, στην αντικειμενοφόρο πλάκα). Οι αντικειμενοφόρες πλάκες, τοποθετούνται σε ειδική κασετίνα, όπου αφήνονται στους 4°C, να στεγνώσουν.

Σε δεύτερο χρόνο γίνεται η παρατήρηση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού και η συλλογή εικόνων με τα αποτελέσματα.



vii. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Με την PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης, επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, «in vitro». Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των

κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος. Το DNA στόχος επεκτείνεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές, σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων), που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Στη συνέχεια, «υβριδίζονται» τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία καλούνται εκκινητές (primers), στις δύο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA (2^ο στάδιο). Με τη δράση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και κατ'αυτόν τον τρόπο η αλυσίδα επεκτείνεται (3^ο στάδιο). Έτσι σχηματίζονται δύο καινούριοι κλώνοι DNA συμπληρωματικοί προς αυτούς του πρότυπου DNA με αποτέλεσμα τον διπλασιασμό του DNA στόχου. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωση (denaturation), υβριδισμός των εκκινητών (primers annealing) και επέκταση των εκκινητών με τη σύνθεση καινούριου κλώνου (extension), αποτελούν 1 κύκλο της αντίδρασης PCR.

Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται: DNA στόχος, εκκινητές (primers), τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), ένζυμο Taq DNA πολυμεράση, ιόντα Mg²⁺ απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με pH≈8.2 για τη δράση του ενζύμου.

Στην παρούσα εργασία, τα δείγματά μας περιλαμβάνουν ένα αρνητικό control (το οποίο στερούταν DNA), ένα θετικό control (το οποίο προήλθε από μολυσμένη κυτταρική σειρά), ένα δείγμα από MCF-7 και ένα δείγμα από MDA-MB-231. Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούν 2 erpendorfs, όπου το ένα στο mix της αντίδρασης περιλαμβάνει εκκινητές για το μυκόπλασμα και το άλλο εκκινητές ακτίνης για κανονικοποίηση. Στον πίνακα φαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε για το μυκόπλασμα και για την ακτίνη.

PRIMERS	Reverse	Forward
mycoplasma	CCRTGCACCAYCTGTCWHHHHBGWWA ACCTC	GAAAGYGTGGGGAGCAAAYAG GATTAGATA
actin	CGTTCGTCCGCATGGAGTCCT	GGAGCAATGATCTTGATCTT

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήσαμε ήταν το εξής:

Components	Volume	Final Concentration
10X PCR buffer minus Mg	10 μ l	1X
10mM dNTP mixture	2 μ l	0.2 mM each
50mM MgCl ₂	3 μ l	1.5 mM
Primer mix (10mM each)	5 μ l	0.5 μ M each
Template DNA	1-20 μ l	n/a
Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0.2-0.5 μ l	1.0-2.5 units
Autoclaved distilled water	To 100 μ l	n/a

- α. Τα δείγματα επωάζονται στον θερμοκυκλοποιητή στους 94°C, για 3 λεπτά με σκοπό την πλήρη αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA στόχου.
- β. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 35 κύκλους σύμφωνα με το ακόλουθο θερμικό προφίλ:

Denature	94°C	45 sec
Anneal	55°C	30 sec
Extend	72°C	1 min 30 sec

- γ. Μετά το τέλος της αντίδρασης, τα δείγματα επωάζονται για άλλα 10 λεπτά στους 72 °C και διατηρούνται στους 4 °C.

viii. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ TRIZOL

Η απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα MCF-7 με τη χρήση του χημικού αντιδραστήριου Trizol. Το Trizol γενικά, είναι ένα φωτοευαίσθητο αντιδραστήριο που φυλάσσεται στους 4°C και χρησιμοποιείται στην απομόνωση του RNA, DNA και των πρωτεϊνών. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του ολικού RNA. Όλα τα δείγματα διαλυτοποιούνται σε 0,5ml Trizol με επακόλουθη επώαση για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη πιπέτα αναδεύουμε ήπια μέχρι να γίνει ομοιογενές μείγμα. Ακολουθεί προσθήκη ανάλογης ποσότητας (100 μ l) CHCl₃ σε κάθε δείγμα, ισχυρή ανάδευση και επώαση για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται όλα τα δείγματα για 15 λεπτά, στους 4 °C υπό 11.000 rpm. Παρατηρούμε ότι μετά το πέρας της φυγοκέντρησης στο κάθε δείγμα σχηματίστηκαν 3 φάσεις. Η κάτω φάση περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες, η μεσαία περιλαμβάνει το DNA και η πάνω το ολικό RNA. Με ιδιαίτερα

προσεκτικούς χειρισμούς συλλέξαμε την πάνω φάση (ολικό RNA) σε νέο eppendorf για το κάθε δείγμα, προσθέτουμε 0,250 ml ισοπροπανόλης, αναδεύουμε πάρα πολύ καλά και αφήνουμε τα δείγματα για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στους 4 °C υπό 11.000 rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο, το οποίο περιλαμβάνει τον οργανικό διαλύτη και κρατάμε μόνο το ίζημα. Επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 1ml Αιθανόλη 80% και φυγοκεντρούμε τα δείγματα για τρίτη φορά για 5 λεπτά, στους 4 °C υπό 8.000 rpm. Στη συνέχεια αφαιρείται πολύ προσεκτικά η αιθανόλη από όλα τα δείγματα. Προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα, αφήνουμε ανοικτά τα καπάκια των eppendorfs για να εξατμιστεί η αιθανόλη που έχει απομείνει. Τέλος, επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 15 μl ddH₂O(extra clear) και αποθηκεύονται στους -80 °C.



Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε σε MCF-7 cell extracts των 2, 6 και 12 ωρών επώασης με τις υπό μελέτη χημικές ουσίες.

Στη συνέχεια, κρίνεται απαραίτητη η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του ολικού RNA που έχει απομονωθεί από το κάθε δείγμα ξεχωριστά. Πραγματοποιήθηκε αραίωση 1 μl RNA προς 99 μl ddH₂O σε όλα τα δείγματα και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 260nm και κανονικοποιήθηκε στα 280 nm .

ix. ΠΕΨΗ ΜΕ DNase

Για την απομάκρυνση του DNA που πιθανόν έχει παραμείνει στα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο RQ1 RNase-Free DNase (Promega). Σύμφωνα με αυτή τη πειραματική διαδικασία επιτυγχάνεται η αποικοδόμηση τόσο του δίκλωνου όσο και του μονόκλωνου DNA, σχηματίζοντας ελεύθερα 3' -OH άκρα.

Στην αντίδραση πέψης με DNAσες, είναι απαραίτητο να υπάρχει σε κάθε δείγμα 2μg RNA. Η ποσότητα του RNA που πρέπει να προστεθεί για κάθε δείγμα, υπολογίζεται με την μέθοδο των τριών. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο RQ1 RNase-Free DNase, προσθέτουμε στο κάθε δείγμα 1μl Reaction Buffer x10, 2μl από το ένζυμο DNase και συμπληρώνουμε με ddH₂O για τελικό όγκο 10 μl. Στη συνέχεια ακολουθούν οι εξής διαδικασίες:

- a. Θέρμανση των δειγμάτων στους 37 °C για 30 λεπτά.
- b. Προσθήκη 1 μl σε κάθε δείγμα από το αντιδραστήριο RQ1 DNase Stop Solution για να σταματήσει η αντίδραση.
- c. Θέρμανση όλων των δειγμάτων στους 65 °C για 10 λεπτά.

x. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ, RT-PCR

Η RT-PCR αποσκοπεί στην μετατροπή του RNA σε cDNA. Για να επιτευχθεί αυτή η μετατροπή εφαρμόσαμε το πρωτόκολλο SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Τα βήματα που ακολουθήσαμε για την διαδικασία σύνθεσης του cDNA έχουν ως εξής:

- a. Σε ένα tube των 0,2ml, προσθέτονται τα εξής αντιδραστήρια:

Random Primers	1μl
dNTPs (10mM)	1μl
Total RNA	2μl
ddH₂O	12μl

- b. Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 65 °C για 5 λεπτά
- c. Τα δείγματα παγώνονται άμεσα με την τοποθέτησή τους στο πάγο.
- d. Απομακρύνουμε τα δείγματα από το πάγο και προσθέτονται τα εξής αντιδραστήρια σε κάθε tube:

5x First-Stand Buffer	4 μl
DTT 1M	2 μl
RNaseOUT (40u/μL)	1 μl

- e. Αναδεύουμε ήπια όλα τα δείγματα
- f. Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 25 °C για 2 λεπτά
- g. Προσθήκη 1μl από το ένζυμο SuperScript II RT και αναδεύω με την πιπέτα
- h. Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 25 °C για 10 λεπτά
- i. Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 42 °C για 50 λεπτά
- j. Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 70 °C για 15 λεπτά

xi. Real Time-PCR

Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο διαδοσμένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μια πολύ ευαίσθητη τεχνική με μεγάλη εξειδίκευση καθώς μπορεί να

ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός μεταγράφου. Επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων (mRNA) και τη παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου σε όλη τη διάρκεια της PCR. Έπειτα από την αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR διότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, ακολουθεί μία εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια στόχοι στο tube, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να ξεκινήσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις.

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Στην παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο SYBR Select Master Mix (Applied Biosystem). Το Master Mix αποτελεί μίγμα AmpliTaq DNA πολυμεράσης (UP), SYBR GreenER χρωστικής, dNTPs, UDG ενζύμου, ROX χρωστική αναφοράς και ρυθμιστικά διαλύματα.

Συγκεκριμένα, κάθε tube περιείχε για τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl:

SYBR Green	10 μl
Εκκινητής 1	0,5 μl
Εκκινητής 2	0,5 μl
ddH₂O	7 μl
cDNA	2 μl

Το θερμικό προφίλ που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

UDG Activation	1 κύκλος	2 min, 52°C
AmpliTaq Fast DNA Polymerase Activation	1 κύκλος	2 min, 95°C
Denature	35 κύκλοι	15 sec, 95°C
Anneal / Extend		50 sec, 60°C

Αυτή η πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 2,6 και 12 ωρών έκθεσης στις χημικές ουσίες C,E2,ACH,ICI,ICI+E2 και ICI+ACH. Μελετήθηκαν τα επίπεδα mRNA των μορίων ERα, ERβ, Κυκλίνη D1, c-fos, c-myc και p53. Ο ακριβής καθορισμός των επιπέδων mRNA πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση των επιπέδων ενός γονιδίου αναφοράς, του GAPDH. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε triplicates. Για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών

στην αντίδραση συμπεριλήφθηκε ως αρνητικό control, NTC (No Template Control), δηλαδή αντίδραση που στερούνταν δείγματος cDNA.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην εφαρμογή της Real Time PCR σχεδιάστηκαν από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας. Αρχικά οι αλληλουχίες του ζεύγους εκκινητών για το κάθε μόριο που μελετήθηκε, βρέθηκαν από την ηλεκτρονική βάση δεδομένων PubMed του NCBI και σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Primer3 Version 0.4.0 που διατίθεται δωρεάν στο διαδίκτυο. Στη συνέχεια, προκειμένου να εξακριβωθεί η μοναδικότητα και η ειδικότητα των αλληλουχιών κάνουμε “nucleotide BLAST”, όπου η συγκεκριμένη εφαρμογή έχει τη δυνατότητα διερεύνησης πιθανής συμπληρωματικότητας των αλληλουχιών που μας ενδιαφέρουν σε όλο το γονιδίωμα. Εφόσον οι αλληλουχίες των εκκινητών πληρούν τα απαραίτητα κριτήρια πρέπει να επιβεβαιωθούμε ότι δεν σχηματίζουν διμερή μεταξύ τους ή αυτοδιμερή και επιτυγχάνεται μέσω του προγράμματος Multiple Primer Analyzer της εταιρίας ThermoFisher.

Μετά την πρώτη εφαρμογή της πειραματικής διαδικασίας της Real Time PCR, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα του mRNA των περισσότερων μορίων που μελετάμε στα δείγματα των 6 ωρών, είχαν την μεγαλύτερη δυνατή τιμή ενώ στις 12 ώρες τα επίπεδα είχαν εξισορροπηθεί κατά μέσο όρο. Επομένως στις επόμενες πειραματικές εφαρμογές, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μόνο των 6 ωρών.

3. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση της πιθανής οιστρογονικής δράσης των ενώσεων Αργιλίου, συγκεκριμένα των αλάτων του (ACH), καθώς επίσης και της πιθανής επίδρασής τους σε μηχανισμούς που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού. Επιπλέον η μελέτη αποσκοπεί στη διερεύνηση αν το ACH μπορεί να επηρεάσει τον υποκυτταρικό εντοπισμό των οιστρογονικών υποδοχέων. Η μελέτη στόχευσε επίσης σε έλεγχο των επιδράσεων, τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο mRNA, του ACH σε πιθανά μόρια στόχους. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκαν τα επίπεδα του mRNA των ήδη γνωστών γονιδίων στόχων των οιστρογονικών υποδοχέων που εμπλέκονται τόσο στο μηχανισμό ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, όσο και στην επαγωγή του καρκίνου του μαστού.

Αναλυτικότερα για τη μελέτη αυτή, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική μέθοδος προσδιορισμού υποκυτταρικού εντοπισμού των οιστρογονικών υποδοχέων, ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, όσο και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR) για προσδιορισμό των επιπέδων του mRNA γονιδίων που μας ενδιαφέρουν.

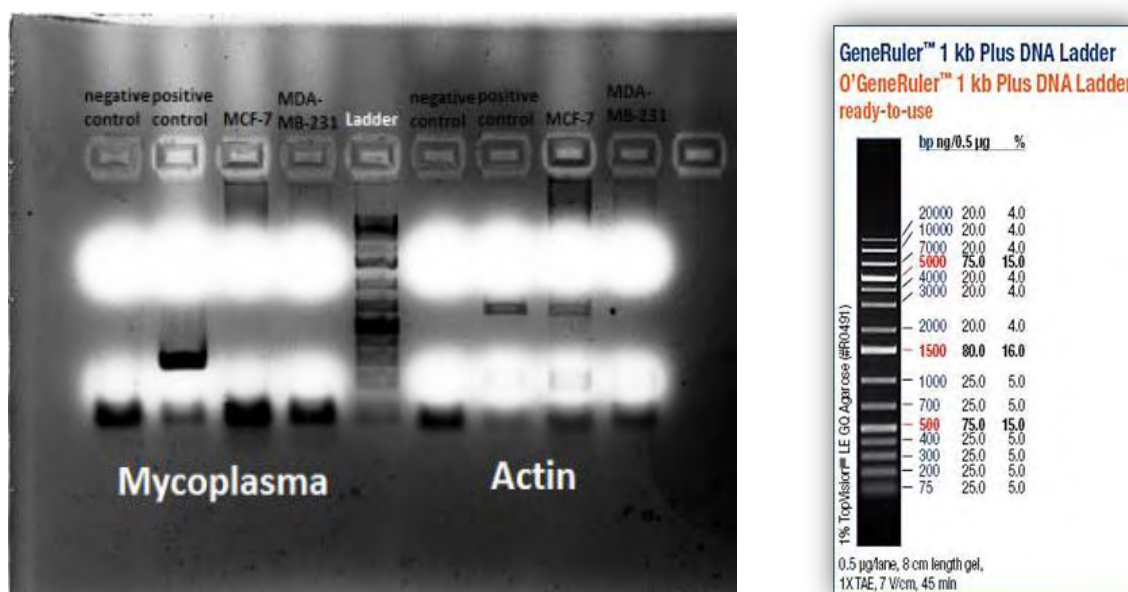
Τα πειράματα που έλαβαν χώρα στα πλαίσια της παρούσας εργασίας αποτελούν μέρος της διδακτορικής διατριβής του κ. Βύρωνα Γοργογιέτα.

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ MCF-7 ΚΑΙ MDA-MB-231

Κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών κρίθηκε απαραίτητο να ελεγχθεί η καθαρότητα των κυτταρικών σειρών MCF-7 και MDA-MB-231 από μυκόπλασμα. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος, προηγήθηκαν 3 διαδικασίες: η απομόνωση του DNA από δείγμα που λήφθηκε από κάθε κυτταροκαλλιέργεια, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του γονιδίου του μυκοπλάσματος (αν υπάρχει) και ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

Ολοκληρώνοντας τα 2 πρώτα βήματα, δηλαδή την απόμωωση του γενετικού υλικού κάθε κυτταρικής σειράς και την PCR, ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αгарόζης 1,5%. Στην πηκτή φορτώθηκαν με τη σειρά τα δείγματα: 1. Αρνητικό (Negative) δείγμα αναφοράς (control) 2. Θετικό (Positive) control 3. MCF-7 4. MDA-MB-231, τα οποία κλωνοποιήθηκαν με χρήση υποκινητών για το μυκόπλασμα, 5. GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder και στη συνέχεια, με την ίδια σειρά, τα δείγματα κλωνοποιήθηκαν με χρήση υποκινητών για την ακτίνη. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης και έκθεσης του πηκτώματος σε UV ελήφθησε η παρακάτω εικόνα:



Σχήμα 1. Αριστερά βλέπουμε το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης ύστερα από έκθεση της πηκτής σε ακτινοβολία UV. Δεξιά βλέπουμε τα μεγέθη των των ζωνών DNA (σε bp) του Ladder.

Το προϊόν της PCR του μυκοπλάσματος έχει μέγεθος περίπου 434-468 bp. Παρατηρούμε ότι, τα προϊόντα των PCR των δειγμάτων MCF-7 και MDA-MB-231 δεν παρουσιάζουν ζώνη

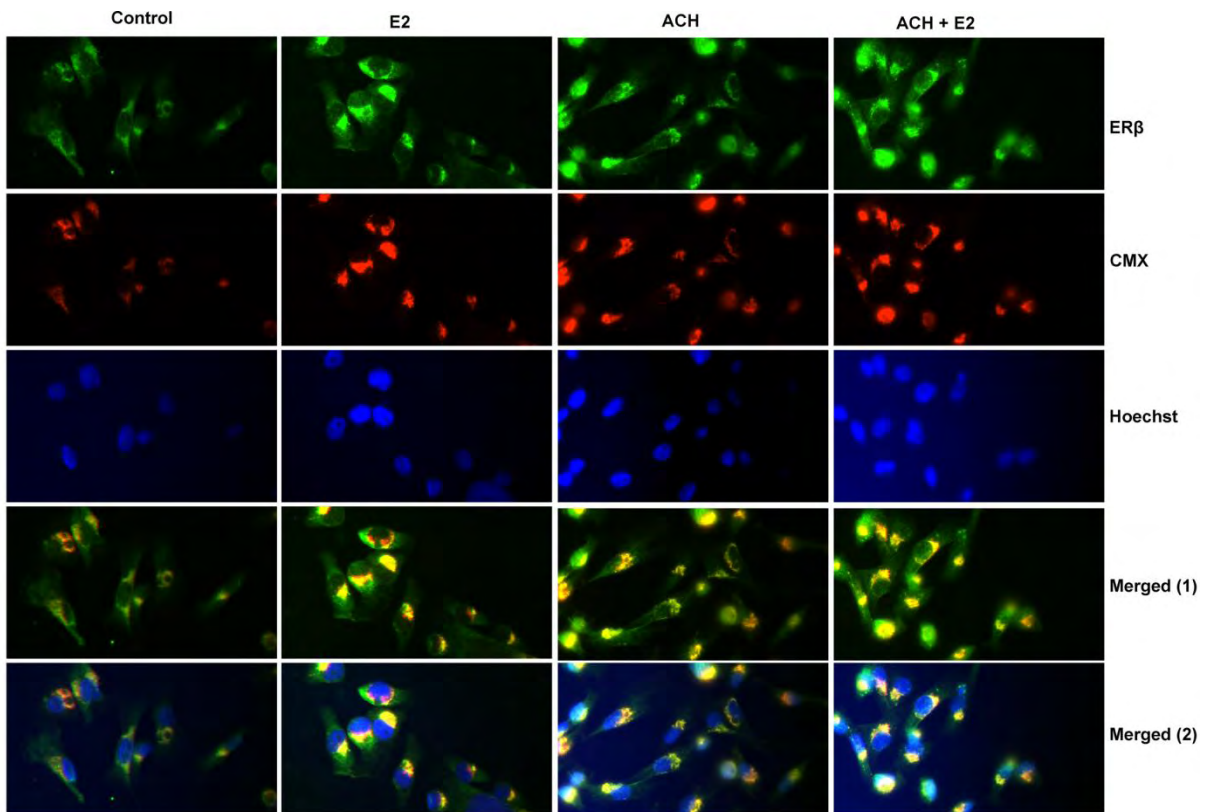
DNA στο μέγεθος των βάσεων, που παρουσιάζει το θετικό control. Άρα, οι κυτταρικές σειρές πιστοποιούνται απαλλαγμένες από πρόσμειξη μυκοπλάσματος.

4.2 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΑΣΤΟΥ

Με σκοπό τον χαρακτηρισμό της πιθανής οιστρογονικής δράσης του ACH σε καρκινικά κύτταρα μαστού, έγινε συγκριτική μελέτη της επίδρασης ACH και E2 στον υποκυτταρικό εντοπισμό του ERβ, δεδομένου ότι αυτός ο τύπος του υποδοχέα φαίνεται να επικρατεί στα MDA-MB-231 κύτταρα και επομένως μέσω αυτού θα επιτελείται η πιθανή οιστρογονική δράση του ACH.

Επιπλέον, δεδομένου ότι η υποκυτταρική κατανομή των οιστρογονικών υποδοχέων διαφοροποιείται μεταξύ ανερέθιστων και ενεργοποιημένων κυττάρων από τη παρουσία ορμονών, η πειραματική εφαρμογή πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα τα οποία για 48 ώρες αναπτύσσονταν σε ειδικό καλλιεργητικό υλικό, στο οποίο προστίθεται ειδικά κατεργασμένο FBS (FBS cis, επεξεργασμένο και φιλτραρισμένο με ενεργό άνθρακα), με σκοπό την ελαχιστοποίηση των ορμονών σε αυτό. Στη συνέχεια, γίνεται η προσθήκη των ουσιών E2 και ACH, οι οποίες αφήνονται στα κύτταρα για δύο ώρες.

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης. Για την λήψη των εικόνων από το μικροσκόπιο φθορισμού, χρησιμοποιήθηκε η ψυχόμενη κάμερα Optimos και το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων, Q-Capture Pro.



Σχήμα 2: Ανοσοϊστοχημική μελέτη, της υποκυτταρικής εντόπισης του υποδοχέα των οιστρογόνων ERβ, σε κύτταρα MDA-MB-231. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και επώαστηκαν με τις ουσίες E2 ($10^{-9}M$) και ACH ($10^{-4}M$) (όπως αναφέρεται παραπάνω). Έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων με Methanol/Acetone. Στη πρώτη σειρά φαίνεται με πράσινο χρώμα η ύπαρξη του ERβ αλλά και ο υποκυτταρικός εντοπισμός του. Χρησιμοποιήθηκε 1^ο αντίσωμα ERβ-H 150(rabbit) και 2^ο αντίσωμα το anti-Rabbit-Alexa488 το οποίο έχει και το φθορίζον μόριο που δίνει το πράσινο χρώμα στον υποδοχέα. Στη δεύτερη σειρά φαίνονται με κόκκινο χρώμα τα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Τα κύτταρα έχουν εκτεθεί στη μιτοχονδριακή χρωστική CMX ROS μισή ώρα πριν την διαδικασία της μονιμοποίησης των κυττάρων. Στη τρίτη σειρά φαίνονται με μπλε χρώμα οι πυρήνες των κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκε η πυρηνική χρώση Hoechst η οποία είναι υπεύθυνη για την μπλε χρώση. Στη τέταρτη σειρά, παρατίθεται η σύμπτυξη της πρώτης και δεύτερης εικόνας. Το κίτρινο χρώμα υποδηλώνει πιθανόν συνεντοπισμό του ERβ και της CMX χρωστικής των μιτοχονδρίων άρα και πιθανή μιτοχονδριακή εντόπιση. Στη πέμπτη σειρά, παρατίθεται η σύμπτυξη της πρώτης, της δεύτερης και της τρίτης εικόνας.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, απουσία ορμονών, σε ανερέθιστα κύτταρα Control, ο ERβ εντοπίζεται διάχυτος στο κυτταρόπλασμα αλλά και σε υποκυτταρικά οργανίδια, όπως και αναμενόταν σύμφωνα με δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας. Παρουσία E2 παρατηρούμε περί-πυρηνικό εντοπισμό πιθανώς μιτοχονδριακό του ERβ σε μεγαλύτερη ένταση συγκριτικά με τα κύτταρα Control. Παρουσία του ACH, παρατηρούμε και πάλι περί-πυρηνικό εντοπισμό (μιτοχονδριακό) του ERβ, όμως λιγότερο έντονο σε σχέση με τα κύτταρα παρουσίας E2 και περισσότερο έντονο συγκριτικά με τα κύτταρα Control. Παρουσία E2 και ACH παρατηρείται ο υποκυτταρικός συνεντοπισμός ERβ και της CMX μιτοχονδριακής χρωστικής σε ένταση μεγαλύτερη από τις τρεις προηγούμενες συνθήκες. Η παρόμοια με την E2 επίδραση του ACH στη υποκυτταρική εντόπιση του ERβ υποδηλώνει την πιθανή οιστρογονική του δράση και κατ' επέκταση την μετακίνηση του υποδοχέα προς

τα μιτοχόνδρια. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με την διεθνή βιβλιογραφία που υποστηρίζει την οιστρογονική δράση του Αργιλίου αλλά και την αρχική μας υπόθεση.

Σύμφωνα με όμοιες πειραματικές μελέτες που έγιναν στο εργαστήριο μας, σε καρκινικές σειρές MCF-7 στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του κ. Βύρωνα Γοργογιέτα, παρατηρήθηκε ότι η ένταση του σήματος του ERβ ήταν πιο χαμηλή και η μετακίνηση του προς τα μιτοχόνδρια ήταν εμφανώς πιο εξασθενημένη συγκριτικά με το σήμα που έδωσε ο υποδοχέας στα MDA-MB-231 κύτταρα. Η παρατήρηση αυτή δικαιολογείται αν αναλογισθούμε ότι στα κύτταρα MCF-7 τα επίπεδα του ERβ είναι πολύ χαμηλά, αφού επικρατεί κυρίως ο ERα. Τόσο η E2 όσο και το ACH επάγουν σχετική αύξηση των επιπέδων του ERβ στα κύτταρα αυτά (τα αποτελέσματα δεν φαίνονται).

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη μας βοηθάει στην κατανόηση ύπαρξης οιστρογονικής δράσης Αργιλίου καθώς αυτή αποδεικνύεται χάρις την μετακίνηση και τελικά τον πιθανόν υποκυτταρικό εντοπισμό του ERβ στα μιτοχόνδρια. Δεν μας παρέχει καμία πληροφορία σχετικά με τον μηχανισμό που επιτυγχάνεται αυτό το φαινόμενο.

4.3 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ACH ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΑΣΤΟΥ

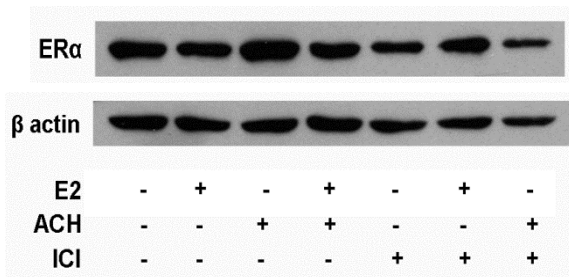
Στη συνέχεια θελήσαμε να διερευνήσουμε το εάν διαφοροποιείται η έκφραση διαφόρων πρωτεϊνικών μορίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικά κύτταρα μαστού παρουσία E2, ACH και ICI. Πειραματικά, εφαρμόσαμε τη τεχνική της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western Blot) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Πριν την εφαρμογή Western Blot, προηγήθηκε ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) των δειγμάτων που προέρχονται από καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7 και MDA-MB-231. Τα δείγματα είχαν δεχθεί ειδική επεξεργασία και επώαση με τις υπό μελέτη ουσίες όπως ακριβώς περιγράφεται σε προηγούμενη ενότητα.

Τα αποτελέσματα που λάβαμε από την ανοσοαποτύπωση καθώς και η κανονικοποίηση τους παρατίθενται πιο κάτω.

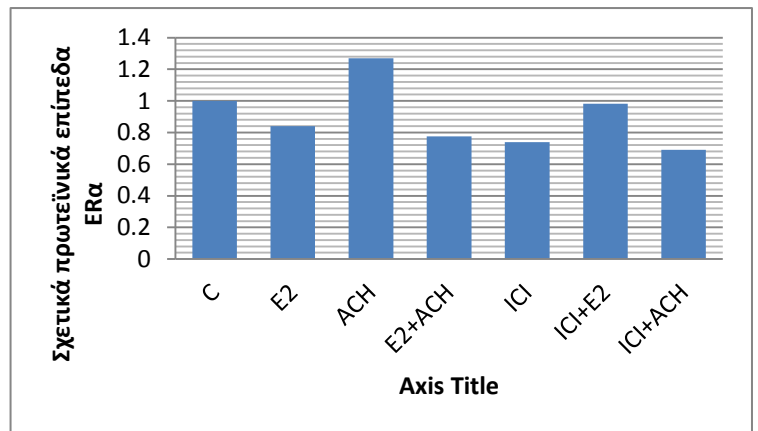
▪ Καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7

(α) ERα

1.

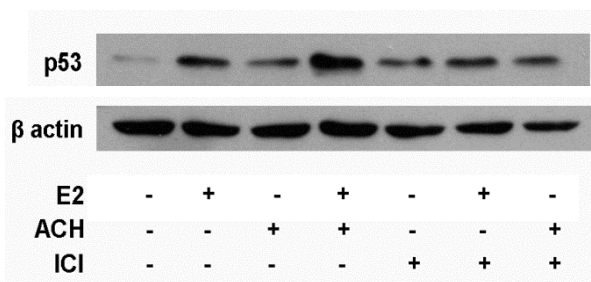


2.

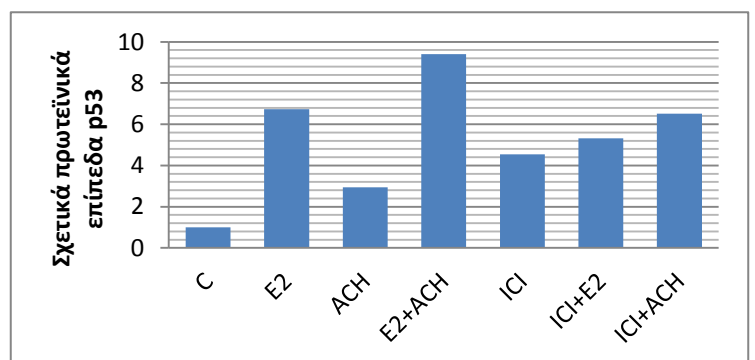


(β) p53

1.

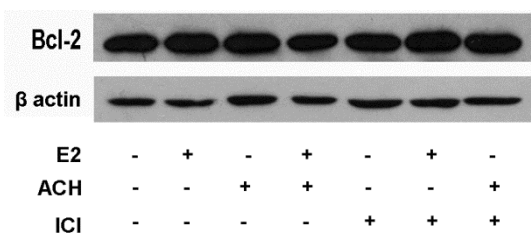


2.

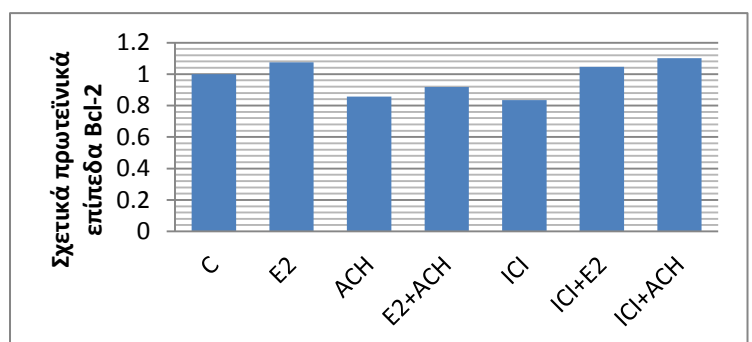


(γ) Bcl-2

1.

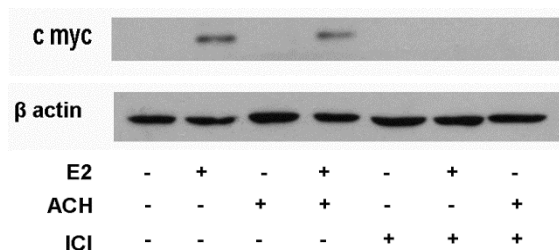


2.

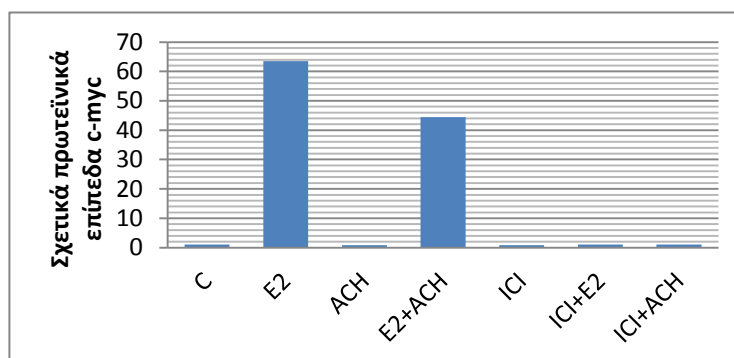


(δ) c-Myc

1.



2.



Σχήμα 3: Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των μορίων: ERα, p53, Bcl₂ και c-myc σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 υπό την επίδραση E2, ACH, ICI και συνδυασμό αυτών. 1.Κυτταρικά εκχυλίσματα ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου από MCF-7, τα οποία είχαν καλλιιεργηθεί και επωαστεί με 10⁻⁹M E2, ACH 10⁻⁴M, ICI 10⁻⁶M (όπως αναφέρεται αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα), ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE), μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία και τις διαφοροποιήσεις στην έκφραση των παραπάνω μορίων. Η εντόπιση και τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνικών μορίων έγινε με χρήση ειδικών αντισωμάτων ERα-G20, β-actin (κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων), p53 (DAKO), c-Myc (Cell Signalling) και Bcl2 (Cell Signalling). 2.Απεικόνιση της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων ως προς τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης.

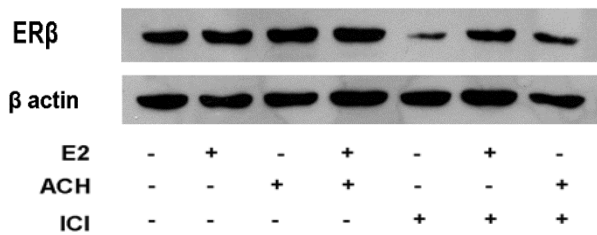
Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα 3, σε MCF-7 κυτταρικές σειρές, παρατηρούμε ότι παρουσία ACH, τα επίπεδα του ERα παρουσιάζουν μια ελαφριά αύξηση σε σχέση με το Control, αντίθετα παρουσία ICI και ACH υπάρχει εμφανής μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα. (α). Αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι το ACH έχει μια μικρή οιστρογονική δράση, μιας και επάγουν αύξηση των επιπέδων του ERα, πολύ πιθανόν μέσω του ίδιου του υποδοχέα, δηλαδή μέσω θετικής ανατροφοδότησης, κάτι που ισχύει στη διεθνή βιβλιογραφία. Επίσης η από ICI επαγόμενη καταστολή της από E2 και ACH επαγωγής της έκφρασης του ERα ενισχύει αυτήν την υπόθεση. Όσον αφορά τα επίπεδα της πρωτεΐνης p53, παρατηρούμε σημαντική αύξηση των επιπέδων της στα δείγματα που υπάρχει παρουσία E2. Επιπλέον, παρουσία ACH τα επίπεδα της p53 αυξάνονται σε σχέση με το Control, όμως είναι σχετικά μειωμένα σε σχέση με τα δείγματα που επώαστηκαν με την E2. Επομένως μπορούμε να πούμε ότι το ACH αυξάνει τα επίπεδα της p53 μέσω οιστρογονικής δράσης, κάτι που περιμέναμε εφόσον η p53 αποτελεί άμεσο στόχο του ERα σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία (β). Η πρωτεΐνη bcl-2 ουσιαστικά, όπως φαίνεται και στο πιο πάνω σχήμα, παραμένει αμετάβλητη. Το γεγονός ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης bcl-2 δεν αυξάνονται παρουσία E2, όπως και αναμενόταν, υποδηλώνει ότι είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν περεταίρω πειράματα προκειμένου να εξακριβωθεί ο ρόλος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης (γ). Ο μεταγραφικός παράγοντας c-Myc, παρουσιάζει σημαντική αύξηση παρουσία E2 και E2 σε συνδυασμό με ACH σε σχέση με το Control, ενώ παρουσία μόνο ACH δεν παρουσιάζει καμία ανιχνεύσιμη αύξηση. Επομένως, πολύ πιθανόν ο

μεταγραφικός παράγοντας c-Myc να μην αποτελεί στόχο του ACH μια και δεν φαίνεται να επηρεάζει καθόλου τα επίπεδά του μέσω οιστρογονικής δράσης (δ).

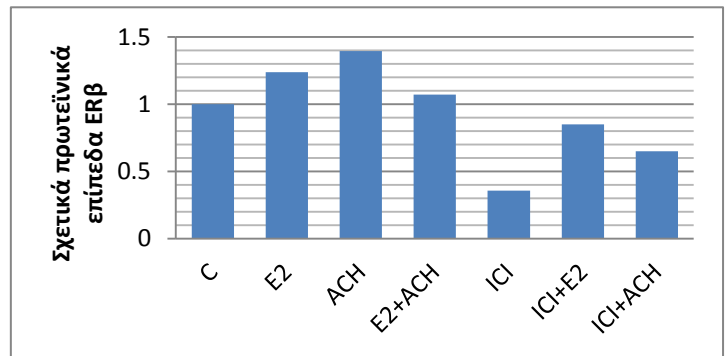
▪ Καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231

(α) ERβ

1.

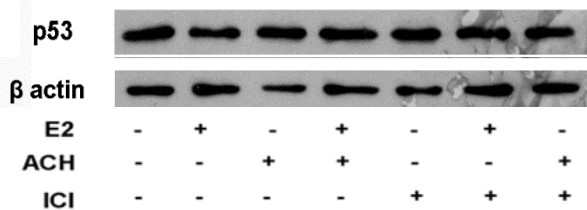


2.

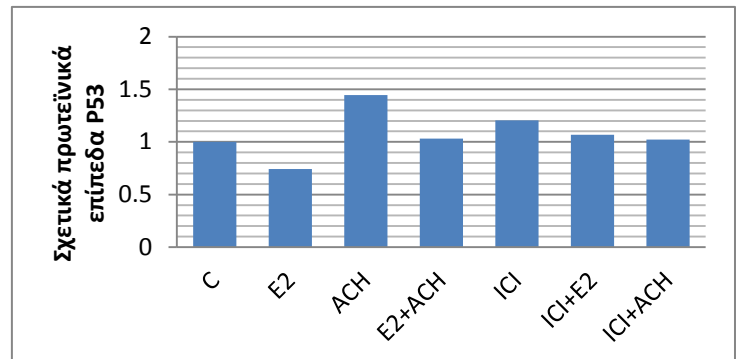


(β) p53

1.



2.



Σχήμα 4: Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των μορίων: ERβ και p53 σε καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231 υπό την επίδραση E2, ACH, ICI και συνδυασμό αυτών . 1.Κυτταρικά εκχυλίσματα ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου από MDA-MB-231, τα οποία είχαν καλλιεργηθεί και επωαστεί με $10^{-9}M$ E2, ACH $10^{-4}M$, ICI $10^{-6}M$ και συνδυασμού αυτών (όπως αναφέρεται αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα), ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE), μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και μελετήθηκαν ως προς τις διαφοροποιήσεις στα επίπεδα έκφρασης των ERβ και p53. Η εντόπιση και τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνικών μορίων έγινε με χρήση ειδικών αντισωμάτων ERβ-H150, β-actin (κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων) και p53 (DAKO). 2.Απεικόνιση της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων ως προς τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης.

Όπως παρατηρούμε στο παραπάνω σχήμα 4 σε κύτταρα MDA-MB-231, τα επίπεδα του ERβ αυξάνονται παρουσία E2, ACH και E2 με ACH ενώ παρουσία ICI υπάρχει εμφανής μείωση των επιπέδων του υποδοχέα σε σχέση με το Control. Επίσης, παρουσία ICI σε συνδυασμό είτε με E2 είτε με ACH παρατηρείται μείωση της από E2 και ACH επαγόμενης αύξησης των

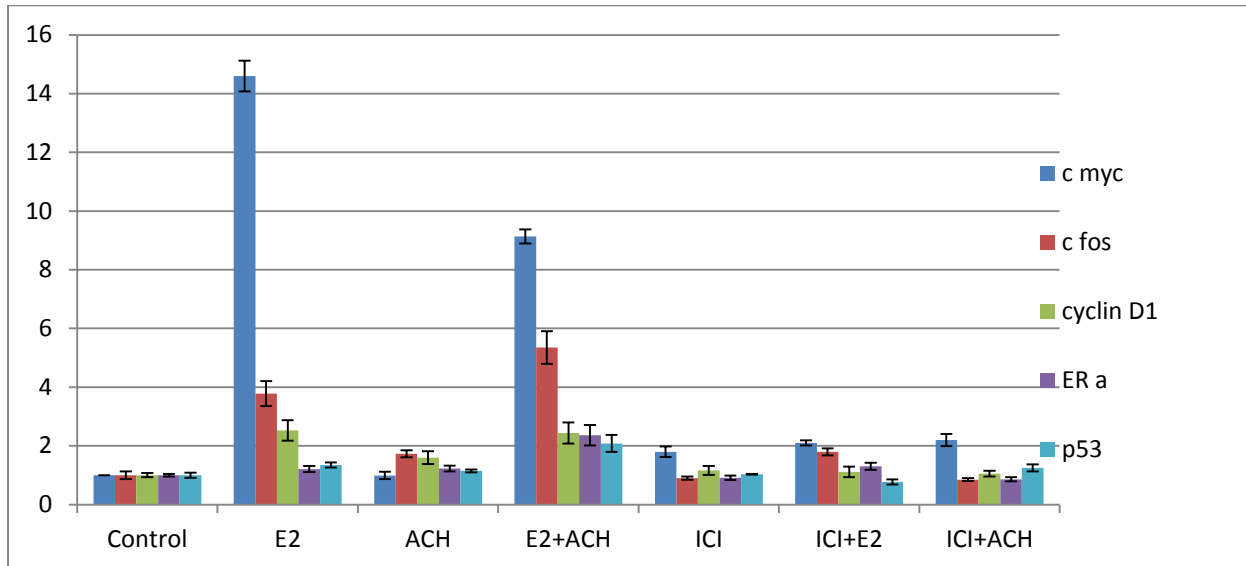
επιπέδων του ERβ γεγονός που υποδεικνύει την οιστρογονική δράση του ACH, η οποία μάλιστα αναστέλλεται παρουσία ειδικού ανταγωνιστή οιστρογόνων ICI. Αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν ότι το ACH παρουσιάζει οιστρογονική δράση που τείνει προς την οιστρογονική δράση της E2 και επομένως επάγει την αύξηση της έκφρασης του ERβ. Το γεγονός όμως ότι δεν παρατηρήθηκε αθροιστική δράση του E2 σε συνδυασμό με ACH, χρειάζεται επανάληψη του πειράματος προκειμένου να επαληθευθεί το αποτέλεσμα. Όσον αφορά την πρωτεΐνη p53, παρατηρούμε μείωση των επιπέδων της παρουσία E2 σε σχέση με το Control, ενώ παρουσία ACH φαίνονται να αυξάνονται τα επίπεδα της. Παρουσία ICI τα επίπεδα της p53 τείνουν να πλησιάσουν τις τιμές του Control. Η παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων της p53 παρουσία E2 πιθανόν να οφείλονται στην ανταγωνιστική δράση του ERβ στην δραστικότητα των έστω και χαμηλών επιπέδων ERα σε MDA-MB-231 κύτταρα (β).

4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ACH ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ mRNA ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΑΣΤΟΥ

Στη συνέχεια θελήσαμε να εξετάσουμε την διαφοροποίηση που προκαλούν τα άλατα Αργιλίου ACH στα επίπεδα mRNA γονιδίων στόχων των οιστρογονικών υποδοχέων αλλά και γονιδίων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου που γνωρίζουμε για την εμπλοκή τους στο καρκίνο του μαστού. Για το σκοπό αυτό απομονώσαμε ολικό RNA από κυτταρικά εκχυλίσματα MCF-7 και MDA-MB-231 και τα υποβάλαμε σε πέψη με DNAases προκειμένου να επιτευχθεί απάλειψη DNA στα δείγματα. Στη συνέχεια μετατρέψαμε το ολικό RNA σε cDNA με τη μέθοδο Reverse Transcription-PCR και τέλος εφαρμόσαμε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR) με σκοπό να εξετάσουμε τα επίπεδα mRNA για τα γονίδια που μας ενδιαφέρουν σε κάθε κυτταρική σειρά ξεχωριστά. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μελετήσαμε τα επίπεδα mRNA σε καρκινικά κύτταρα MCF-7 που επώαστηκαν με τις χημικές ουσίες E2, ACH, ICI για 2, 6, και 12 ώρες, ενώ στα καρκινικά κύτταρα MDA-MB-231 εξετάσαμε τα επίπεδα mRNA μόνο στις 6 ώρες επώασης τους με τις χημικές ουσίες. Στα MCF-7 μελετήσαμε τα επίπεδα mRNA των γονιδίων GAPDH (μόριο κανονικοποίησης), ERα, ERβ, Κυκλίνη D1, c-fos, c-Myc και p53 ενώ στα MDA-MB-231 μελετήσαμε τα επίπεδα mRNA των γονιδίων GAPDH (μόριο κανονικοποίησης), ERα και p53.

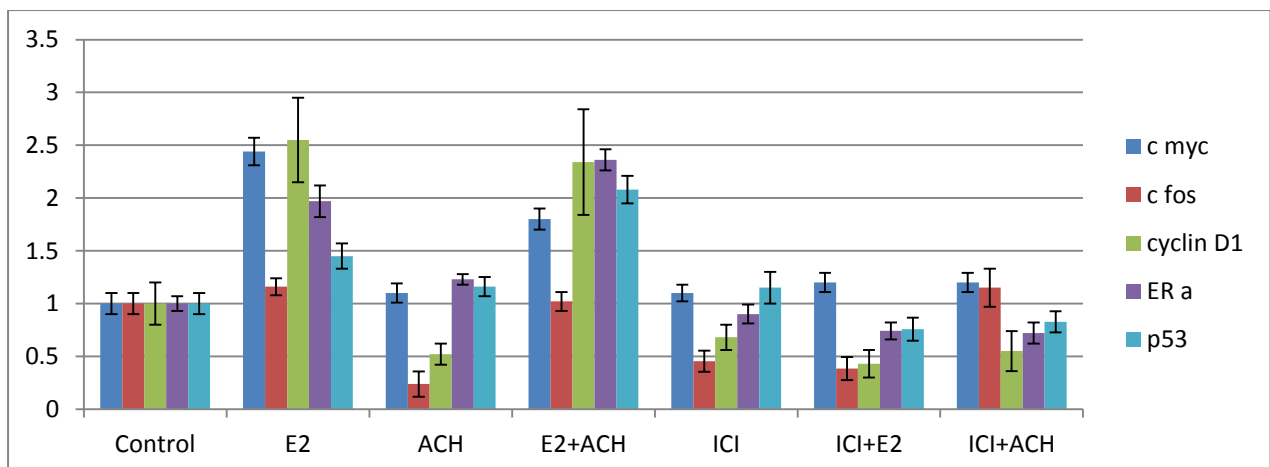
Τα αποτελέσματα της Real Time-PCR παρατίθενται στα διαγράμματα που ακολουθούν.

- Επίδραση ACH (2h επώαση) στα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη μορίων σε Καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7



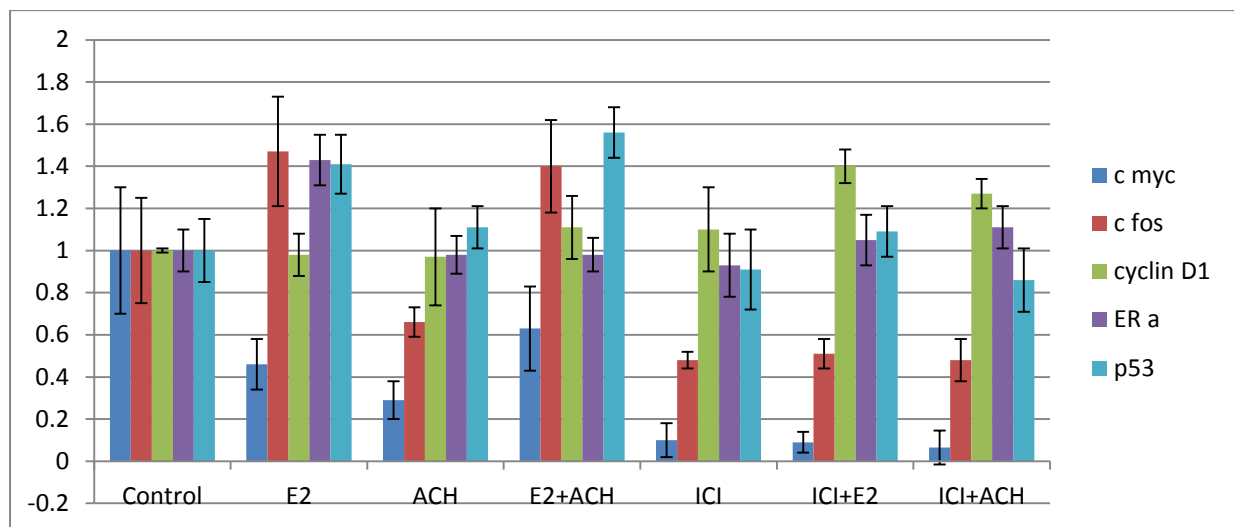
Σχήμα 5. Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης του mRNA των μορίων: ERα, p53, Κυκλίνης D1, c-fos και c-Myc σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 2 ωρών. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αφέθηκαν για επώαση 2 ώρες με τις χημικές ουσίες $10^{-9}M$ E2, ACH $10^{-4}M$, ICI $10^{-6}M$ και συνδυασμού αυτών και ακολούθως απομονώθηκε το ολικό RNA από αυτά. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε πέψη με DNAases, Reverse Transcription-PCR και τέλος πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR). Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν αναφέρονται αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα.

- Επίδραση ACH (6h επώαση) στα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη μορίων σε Καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7



Σχήμα 6. Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης του mRNA των μορίων: ERα, p53, Κυκλίνης D1, c-fos και c-Myc σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 6 ωρών. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αφέθηκαν για επώαση 6 ώρες με τις χημικές ουσίες $10^{-9}M$ E2, $10^{-4}M$ ACH, $10^{-6}M$ ICI και συνδυασμού αυτών και ακολούθως απομονώθηκε το ολικό RNA από αυτά. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε πέψη με DNAases, Reverse Transcription-PCR και τέλος πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR). Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν αναφέρονται αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα.

- Επίδραση ACH (12 h επώαση) στα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη μορίων σε Καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7

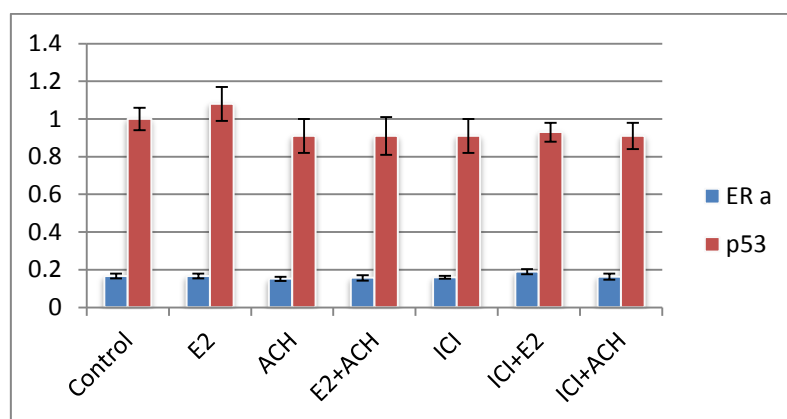


Σχήμα 7. Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης του mRNA των μορίων: ERα, p53, Κυκλίνης D1, c-fos και c-Myc σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 12 ωρών. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αφέθηκαν για επώαση 12 ώρες με τις χημικές ουσίες $10^{-9}M$ E2, $10^{-4}M$ ACH, $10^{-6}M$ ICI και συνδυασμού αυτών και ακολούθως απομονώθηκε το ολικό RNA από αυτά. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε πέψη με DNAases, Reverse Transcription-PCR και τέλος πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR). Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν αναφέρονται αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα.

Σύμφωνα με τα πιο πάνω αποτελέσματα της Real Time-PCR σε MCF-7 κυτταρικές σειρές, αρχικά παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα mRNA του γονιδίου c-Myc ήταν ιδιαίτερα αυξημένα παρουσία E2 και E2 με ACH σε σχέση με τις τιμές του δείγματος αναφοράς (Control). Το γονίδιο c-Fos, φαίνεται να έχει μικρή αύξηση στα επίπεδα mRNA ακολουθώντας το ίδιο μοτίβο έκφρασης με το c-Myc (σχήμα 5). Παρουσία E2 και E2 σε συνδυασμό με ACH παρατηρούμε επίσης αύξηση στα επίπεδα mRNA της Κυκλίνης D1. Παρουσία ICI σε συνδυασμό με E2 τα επίπεδα mRNA των προαναφερθέντων μορίων επανέρχονται στα επίπεδα του Control. Οι προαναφερθέντες μεταβολές είναι αναμενόμενες δεδομένου ότι τα γονίδια c-Myc, c-Fos και cyclin D1 αποτελούν γονίδια στόχοι του ERα, ενώ το ICI είναι ανταγωνιστής της E2. Όσο αφορά το ACH, στο χρονικό διάστημα 2 ωρών, όμοια με την E2, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό προκαλεί επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων c-Fos και Κυκλίνης D1, η οποία μάλιστα αναιρείται παρουσία του αντί-οιστρογόνου, ICI. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν οιστρογονική δράση του ACH στα γονίδια στόχους του

ERα, c-Fos και Κυκλίνης D1. Τα επίπεδα mRNA του p53 καθώς και του ERα στο χρονικό διάστημα 2 ωρών, παραμένουν σχετικά αμετάβλητα παρουσία E2 και ACH, παρουσιάζοντας μία μικρή αύξηση μόνο στην περίπτωση που οι δύο ουσίες E2 και ACH χορηγούνται παράλληλα, υποδηλώνοντας μία αθροιστική, συναγωνιστική του ACH στη δράση της E2. Στη συνέχεια, στα κύτταρα που έχουν υποστεί εξάωρη κατεργασία με τα υπό εξέταση μόρια, παρατηρούμε ότι ενισχύεται η επαγωγική δράση της E2, σε σχέση με την δίωρη επώαση, στην έκφραση των γονιδίων της Κυκλίνης D1 και του ERα, ενώ αρχίζει να διαφαίνεται και η επαγωγική δράση της E2 στην έκφραση του p53. Παρουσία ICI η επαγωγική δράση της E2 αίρεται γεγονός που επαληθεύει την ρυθμιστική, γενωμική δράση των οιστρογόνων στα γονίδια αυτά και παράλληλα επιβεβαιώνει την ορθότητα των αποτελεσμάτων μας (σχήμα 6). Στις συνθήκες αυτές παρατηρείται μικρή επαγωγική δράση του ACH στην έκφραση των γονιδίων ERα και p53, η οποία μάλιστα αίρεται παρουσία ICI. Σε τελευταίο στάδιο, μετά από επώαση 12 ωρών, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των υπό μελέτη γονιδίων αρχίζουν να εξισορροπούνται και φαίνεται να προσεγγίζουν τις τιμές των Control (σχήμα 7). Τα στοιχεία αυτά, υποδηλώνουν ότι η έκφραση των γονιδίων που μελετήσαμε, επάγεται κυρίως ως απόκριση από την E2, μέσω του υποδοχέα οιστρογόνων αφού τα επίπεδα έκφρασης του ERα είναι ιδιαίτερα αυξημένα, η επαγωγή τους αίρεται παρουσία ICI και λαμβάνοντας υπόψη ότι τα υπό μελέτη γονίδια αποτελούν στόχους του ERα. Επιπλέον, με βάση την ιδιαίτερα χαμηλή έκφραση των γονιδίων παρουσία ACH, υποθέτουμε ότι το ACH παρουσιάζει μέτρια οιστρογονική δράση, μέσω της ERα μορφής του υποδοχέα επηρεάζοντας τόσο τα επίπεδα mRNA του υποδοχέα όσο και την δραστηριότητά του, όπως υποδηλώνεται από την άρση της επαγωγικής του δράσης παρουσία ICI, στο χρονικό διάστημα 2 ωρών για τα γονίδια c-Fos, και Κυκλίνης D1, ERα και p53 για το χρονικό διάστημα επώασης 6 ωρών.

- Επίδραση ACH (6 h επώαση) στα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη μορίων σε Καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231



Σχήμα 8. Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης του mRNA των μορίων: ERα και p53 σε καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231 6 ωρών. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα αφέθηκαν για επώαση 6 ώρες με τις χημικές ουσίες $10^{-9}M$ E2, $10^{-4}M$ ACH, $10^{-6}M$ ICI και συνδυασμού αυτών και ακολούθως απομονώθηκε το ολικό RNA από αυτά. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε πέψη με DNAases, Reverse Transcription-PCR και τέλος

πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR). Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν αναφέρονται αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα.

Στη συνέχεια, θέλαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου του ERα και του p53 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές MDA-MB-231 6 ωρών. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι στη κυτταρική σειρά MDA-MB-231 επικρατεί κυρίως ο ERβ ενώ απουσιάζει ή βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα ο ERα. Επιλέξαμε το χρονικό διάστημα των έξι ωρών γιατί σε αυτό το διάστημα, σε κύτταρα που εκφράζουν τον ERα παρατηρείται η από ACH επαγόμενη μεταβολή των επιπέδων του p53, γονίδιο στόχο του ERα. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8 τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του ERα είναι απειροελάχιστα και αμετάβλητα σε σχέση με τη τιμή του Control παρουσία των χημικών ουσιών E2, ACH και ICI. Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της p53 είναι εξίσου χαμηλά και αμετάβλητα σε σχέση με τη τιμή του Control παρουσία των χημικών ουσιών E2, ACH και ICI. Επιπλέον, φαίνεται ότι δεν υπάρχει οιστρογονική δραστηριότητα που να αυξάνει τα επίπεδα της p53 μέσω άλλων μηχανισμών ανεξάρτητων από ER. Συγκριτικά με την κυτταρική σειρά MCF-7, τα αποτελέσματα που πάρθηκαν (σχήμα 8), καθιστούν τα κύτταρα MDA-MB-231 ως "Control". Έτσι συμπεραίνουμε ότι οι από ACH παρατηρούμενες μεταβολές στην έκφραση γονιδίων στόχων του ERα, που παρατηρήθηκαν στα MCF-7 κύτταρα επιτελούνται μέσω του ERα γιατί σε κύτταρα από τα οποία απουσιάζει ή ελαχιστοποιείται ο ERα δεν παρατηρούμε αντίστοιχες μεταβολές

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών και έχουν ρυθμιστική δράση στην μεταγραφή καθώς εμπλέκονται σε πολλές βιολογικές διεργασίες. Οι βιολογικές επιδράσεις των οιστρογόνων μεσολαβούνται μέσω των ERs, α και β υποτύπων. Ωστόσο έχουν ενοχοποιηθεί για πάρα πολλές ασθένειες ως αποτέλεσμα της διατάραξης της φυσιολογικής τους σηματοδότησης τόσο στις γυναίκες όσο και στους άντρες. Φαίνεται να εμπλέκονται σε πάρα πολλές μορφές καρκίνου, μεταξύ αυτών και στον καρκίνο του μαστού. Είναι γνωστό ότι ο καρκίνος του μαστού στις περισσότερες περιπτώσεις είναι ορμονο-εξαρτώμενος. Οι ορμόνες έχουν την ικανότητα να διεγείρουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (Zhenlin Bai et al. 2008). Ο ERα παρουσιάζει πολύ μεγάλη έκφραση από τα πρώτα μόλις στάδια της καρκινογένεσης, σε ποσοστό γύρω στο 50-80% των περιπτώσεων ασθενών καρκίνου του μαστού.

Κατά την παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκαν μία σειρά πειραμάτων που είχαν ως σκοπό τη διερεύνηση της οιστρογονικής δράσης αλάτων αργιλίου (ACH), σε καρκινικά κύτταρα μαστού. Διερευνήθηκε η δράση του ACH συγκριτικά με την οιστραδιόλη (E2), τόσο παρουσία όσο και απουσία του τεχνητού αναστολέα του υποδοχέα των οιστρογόνων ICI 182,780. Τα πειράματα ανοσοϊστοχημείας σε MDA-MB-231 κύτταρα, υποδηλώνουν πιθανή οιστρογονική δράση του αργιλίου δεδομένης της από ACH επαγωγής της μετακίνησης του

ERβ στα μιτοχόνδρια, δράσης όμοιας με αυτήν της E2. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης και Real – time PCR, δείχνουν ότι το ACH προκαλεί μικρή αύξηση στα επίπεδα του ERα τόσο σε πρωτεϊνικό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο mRNA, καθώς και στα επίπεδα έκφρασης κάποιων γονιδίων στόχων του ERα, όπως α) το p53 τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης και β) της Κυκλίνη D1 σε επίπεδο mRNA. Αντίθετα το ACH δεν φαίνεται να έχει επίδραση τόσο σε επίπεδα πρωτεΐνης όσο και σε επίπεδα mRNA στο c-Myc, γονίδιο στόχο του ERα. Όπως είναι γνωστό, στην μεταγραφή εμπλέκονται τόσο συν-ενεργοποιητές όσο και συγκαταστολείς. Επομένως η επιλεκτική δράση που εμφανίζει το ACH ως προς τα γονίδια στόχους του, πιθανόν να οφείλεται στην περίπλοκη ρύθμιση που λαμβάνει χώρα κατά την έκφραση γονιδίων. Έτσι λοιπόν συμπεραίνουμε ότι κάποιες από τις δράσεις του ACH, εν μέρει τουλάχιστον επιτελούνται μέσω του ERα, τόσο μέσω της αύξησης των επιπέδων του ίδιου του ERα όσο και μέσω της ενεργοποίησης της μεταγραφικής του δραστηριότητας.

Εν κατακλείδι, απαιτείται εκτεταμένη έρευνα για την διερεύνηση των επιπτώσεων που μπορεί να έχει στην υγεία σε βάθος χρόνου, η καθημερινή έκθεση ενός ατόμου σε απειροελάχιστες συγκεντρώσεις αργιλίου. Είναι αναγκαία η επανάληψη κάποιων πειραμάτων για την επιβεβαίωση των ισχυρισμών μας αλλά και χρειάζονται περαιτέρω μελέτες πάνω στις επιπτώσεις που προκαλεί το Αργιλίου γιατί εξακολουθούν να υπάρχουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με την μιμητική οιστρογονική δράση που διαθέτει και με ποιους μηχανισμούς επιτυγχάνεται η δράση αυτή.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A. Farasani, P.D. Darbre, 2015. Effects of aluminium chloride and aluminium chlorohydrate on DNA repair in MCF10A. *J. Inorg. Biochem.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.08.003>
- immortalised non-transformed human breast epithelial cells
- Ali Vaziri Gohar and Abbas Mohammadi, 2010. Epigenetic Effects of Carcinogens. *Journal of Biological Sciences* 10(3):200-208,2010
- Anna-Maria G. Psarra, Constantine E. Sekeris, 2008. Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783 (2008) 1–11
- Bruce S. Mcewen and Stephen E. Alves, 1999. Estrogen Actions in the Central Nervous System. *Endocrine Reviews* 20(3): 279–307
- Catherine S Woolley, 1999. Effects of estrogen in the CNS. *Current Opinion in Neurobiology* 1999, 9:349-354
- Carolyn M. Kling PhD and C. V. Rao PhD, 2008. The Steroid Hormone Receptors. Klinge, C, Rao, C, *Glob. libr. women's med.D*, (ISSN: 1756-2228)
- Chen Y, Chen L, Li JY, Mukaida N, Wang Q, Yang C, Yin WJ, Zeng XH,
- Jin W & Shao ZM, 2011. ER β and PEA3 co-activate IL-8 expression and promote the invasion of breast cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* 11,497–511.
- Chunyan Zhao , Karin Dahlman-Wright and Jan-Åke Gustafsson, 2008. Estrogen receptor β : an overview and update. *Nuclear Receptor Signalling* (2008) 6, e003
- Delaunay, F., Pettersson, K., Tujague, M. and Gustafsson, J. A., 2000. Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors α and β . *Mol Pharmacol* 58, 584-90
- Elizabeth Anderson, 2002. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* 2002, 4:197-201
- Elizabeth Murphy, 2010. Estrogen Signaling and Cardiovascular Disease. Introduction to the Nuclear Receptor Review Series [*Circ Res.* 2010;106:1557–1558]
- Francesca Cirillo, Giovanni Nassa, Roberta Tarallo, Claudia Stellato, Maria Rosaria De Filippo, Concetta Ambrosino, Marc Baumann, Tuula A. Nyman and Alessandro Weisz,

2012. Molecular Mechanisms of Selective Estrogen Receptor Modulator Activity in Human Breast Cancer Cells: Identification of Novel Nuclear Cofactors of Antiestrogen-ER α Complexes by Interaction Proteomics. *J. Proteome Res.* 2013, 12, 421–431

- James D. Yager, Ph.D., and Nancy E. Davidson, M.D., 2006. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N Engl J Med* 2006;354:270-82.
- Jamshed R. Tata, 2002. Signalling through nuclear receptors. *Nature reviews, Molecular Cell Biology*, Volume 3, September 2002:702-710
- Jie Cui, Yong Shen, and Rena Li, 2013. Estrogen synthesis and signalling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine* March 2013, Vol. 19, No. 3
- Jin-Qiang Chen, Terry R. Brown and James D. Yager, 2008. Mechanisms of Hormone Carcinogenesis: Evolution of Views, Role of Mitochondria. *Innovative Endocrinology of Cancer*
- Jun Liu, Zhixiang Xu, Xiaodong Ma, Bin Huang, Xuejun Pan, 2015. Role of ER- α 36 in breast cancer by typical xenoestrogens. *International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2015*
- Konstantin Yakimchuk a, Mikael Jondal b, Sam Okret, 2013. Estrogen receptor a and b in the normal immune system and in lymphoid malignancies. *Molecular and Cellular Endocrinology* 375 (2013) 121–129
- Kotaro Azuma and Satoshi Inoue, 2012. Genomic and non-genomic actions of estrogen: recent developments. *BioMol Concepts*, Vol. 3 (2012), pp. 365–370
- Linda Bjornstrom and Maria Sjoberg, 2005. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Action on Target Genes. *Molecular Endocrinology* 19: 833–842
- Maria Fatima Magalhães Lazari¹, Thais Fabiana Gameiro Lucas, Fabiana Yasuhara, Gisele Renata Oliveira Gomes, Erica Rosanna Siu, Carine Royer, Sheilla Alessandra Ferreira Fernandes, Catarina Segreti Porto, 2009. Estrogen receptors and function in the male reproductive system. *Endocrinol Metab.* 2009;53(8):923-33
- Marcello Maggiolini, Adele Vivacqua, Giovanna Fasanella, Anna Grazia Recchia, Diego Sisci, Vincenzo Pezzi, Daniela Montanaro, Anna Maria Musti, Didier Picard, and Sebastiano Ando, 2004. The G Protein-coupled Receptor GPR30 Mediates c-fos Up-

regulation by 17-Estradiol and Phytoestrogens in Breast Cancer Cells. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, pp. 27008–27016

- Min Jia, PhD, Research Assistant a, Karin Dahlman-Wright, PhD, Professor, Jan-Åke Gustafsson, MD, PhD, Professor, 2015. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.008>
- Nina Heldring, Ashley Pike, Sandra Andersson, Jason Matthews, Guojun Cheng, Johan Hartman, Michel Tujague, Anders Strom, Eckardt Treuter, Margaret Warner and Jan-Ake Gustafsson, 2007. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol Rev* 87: 905–931, 2007
- P.D. Darbre, 2005. Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99 (2005) 1912–1919
- P. D. Darbre, 2005. Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogen with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. *J. Appl. Toxicol.* 2006; 26: 191–197
- Prasenjit Dey, Rodrigo P A Barros, Margaret Warner, Anders Strom and Jan-Åke Gustafsson, 2013. Insight into the mechanisms of action of estrogen receptor b in the breast, prostate, colon, and CNS. *Journal of Molecular Endocrinology* (2013) 51, T61–T74
- Prasanna G Alluri, Corey Speers and Arul M Chinnaiyan, 2014. Estrogen receptor mutations and their role in breast cancer progression. *Breast Cancer Research* 2014, 16:494
- Shao-Hua Yang, Ran Liu, Evelyn J. Perez, Yi Wen, Stanley M. Stevens, Jr., Thomas Valencia, Anne-Marie Brun-Zinkernagel, Laszlo Prokai, Yvonne Will, James Dykens, Peter Koulen, and James W. Simpkins, 2004. Mitochondrial localization of estrogen receptor. *PNAS*, vol. 101, no. 12: 4130–4135
- Sudipa Saha Roy and Ratna K. Vadlamudi, 2011. Role of Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer Metastasis. *International Journal of Breast Cancer*, Volume 2012, Article ID 654698, 8 pages
- Sreenivasan Paruthiyil, Hema Parmar, Vaishali Kerekatte, Gerald R. Cunha, Gary L. Firestone, and Dale C. Leitman, 2004. Estrogen Receptor Inhibits Human Breast

Cancer Cell Proliferation and Tumor Formation by Causing a G2 Cell Cycle Arrest.
CANCER RESEARCH 64, 423–428, January 1, 2004

- Zhenlin Bai and Ronald Gust, 2008. Breast Cancer, Estrogen Receptor and Ligands.
Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2009, 342, 133 – 149
- Stefan Silbernagl, Agamemnon Desporoulos, 2010. Εγχειρίδιο Φυσιολογίας.
Εκδόσεις Πασχαλίδης, 6^η Έκδοση, Κεφ. 11 Ορμόνες και Αναπαραγωγή
- Εμμανουήλ Ξυδάκης, Μάρτιος 2007 Αθήνα, Κλινική Ογκολογία, Κεφ. 7, Οιστρογόνα
και καρκίνος του μαστού
- Στυλιανός Τσαγκαράκης, Μάρτιος 2007 Αθήνα, Κλινική Ογκολογία, Κεφ. 57,
Αιτιολογία του καρκίνου, Ορμόνες και Καρκίνος