



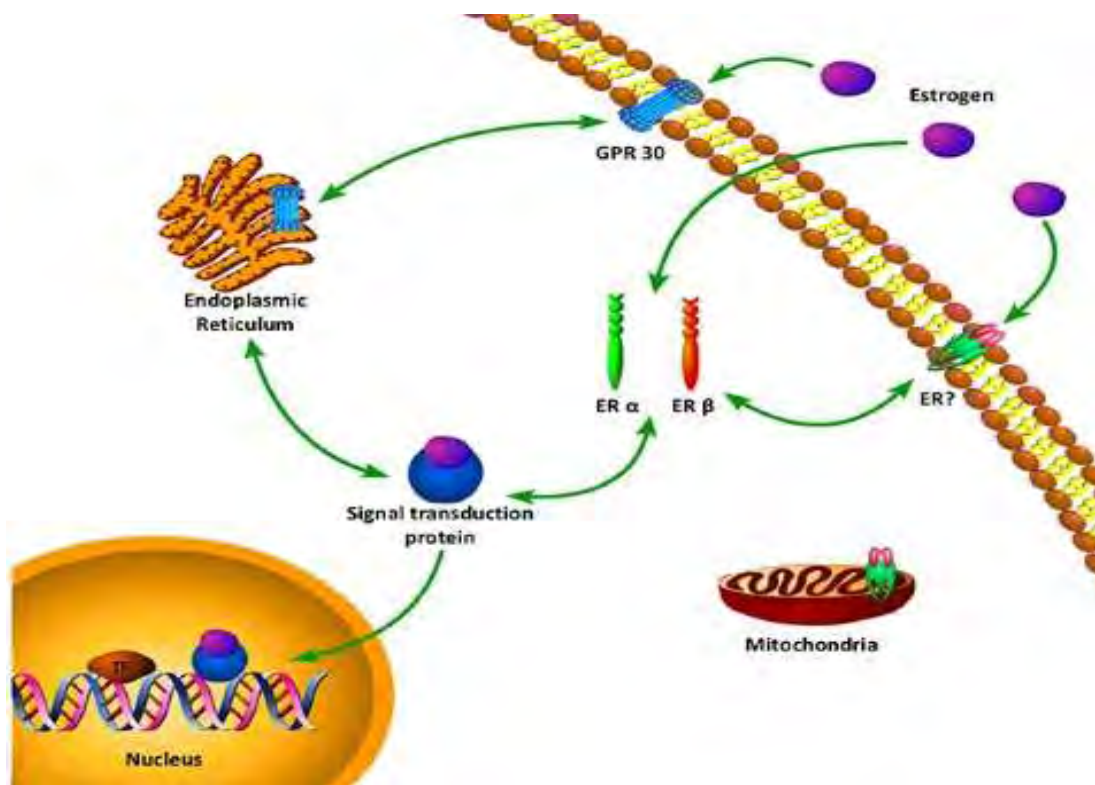
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΣΤΑΘΕΡΑ ΔΙΑΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ
ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΒΗΤΑ»

«ASSESSMENT OF THE EFFECTIVENESS AND SPECIFICITY OF A
SERIES OF ANTIBODIES USED FOR THE CHARACTERIZATION OF
STABLE CELL LINES OVEREXPRESSING THE ESTROGEN RECEPTOR
BETA»



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΜΥΝΟ ΣΠΟΥΔΑΣΤΗ: ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ ΣΕΡΑΦΕΙΜ
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΔΡ. ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ Γ. ΨΑΡΡΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

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, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής επιτροπή:

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

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ.....	8
1.1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ.....	8
1.2. ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ.....	10
1.3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	11
1.3.1. ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	11
1.3.2. ΔΟΜΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ ER α ΚΑΙ ER β	11
1.3.3. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ	12
1.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	13
1.4.1. ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	13
1.4.2. ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	14
1.4.3. ΔΡΑΣΕΙΣ ER ΑΠΟΥΣΙΑ ΠΡΟΣΔΕΤΗ.....	14
1.4.4. ΣΥΓΚΛΙΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΗ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERs.....	15
1.5. ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ER) ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	16
1.5.1. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ.....	16
1.5.2. ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΗΣ ΒΗΤΑ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ER β) ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	17
1.5.3. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΒΗΤΑ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (mtER β).....	19
1.6. ER β ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	20
1.7. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....	21
1.8. ΣΚΟΠΟΣ.....	23
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	24
2.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	24
2.2. ΥΛΙΚΑ.....	24
2.2.1. ΧΗΜΙΚΑ.....	24
2.2.2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	25
2.2.3. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	26

2.2.4. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	27
2.2.5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	28
2.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	29
2.3.1. ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	29
2.3.2. ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (SONICATION).....	29
2.3.3. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	29
2.3.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ).....	30
2.3.5. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (WESTERN BLOT).....	31
2.3.6. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	32
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
3.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΑΛΦΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΗΤΑ ΜΟΡΦΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ER α ΚΑΙ ER β ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ).....	33
3.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ N2AmtGFPER β ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΑΠΟΠΕΙΡΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ.....	35
3.2.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΥΒΡΙΔΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GFPER β ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ GFP.....	35
3.2.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΥΒΡΙΔΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GFPER β ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ER β	36
3.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ER β ΓΙΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΥΒΡΙΔΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GFPER β , ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ N2AmtGFPER β ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΕΥΤΕΡΗ ΑΠΟΠΕΙΡΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ.....	37
3.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ.....	38
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ενταχθώ στην ερευνητική της ομάδα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή TBB Δρ. Νικόλαο Μπαλατσό και την Λέκτορα TBB Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον διευθυντή του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας Καθηγητή TBB Δημήτρη Λεωνίδα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτωρ Ιωάννη Τσιάλτα για την υπομονή και τη βοήθεια που μου παρείχε από την πρώτη μέρα της ερευνητικής μου μελέτης, τη στήριξη και την προθυμία του να λύσει οποιαδήποτε απορία μου καθώς και όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας της Δρ. Ψαρρά και του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την άψογη συνεργασία. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνάδελφο και πάνω απ' όλα φίλο Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο για την βοήθεια, τη στήριξη και την άριστη και ανιδιοτελή συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης.

Επιπλέον, δε θα μπορούσα να παραλείψω τις θερμές μου ευχαριστίες στον συνάδελφο Ιωάννη Γκαντούνα, μέλος της ερευνητικής ομάδας της Δρ. Άννας Μαρίας Ψαρρά, για την καθημερινή στήριξη, βοήθεια και συνεργασία κατά τη διάρκεια της κοινής μας πειραματικής μελέτης.

Τέλος, τα λόγια δεν φτάνουν για να περιγράψουν πόσο ευγνώμων είμαι στην οικογένεια μου για την αδιάκοπη ηθική στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια, βοηθώντας με τον τρόπο τους να ολοκληρώσω έναν από τους μεγαλύτερους στόχους της ζωής μου, μέχρι τον επόμενο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs) αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται κατά κύρια βάση από τη δέσμευση του προσδέτη τους και ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και ειδικότερα στους υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Ο κύριος προσδέτης τους είναι η 17-β οιστραδιόλη (17-β estradiol, E2). Εντοπίζονται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα αλλά και σε άλλες υποκυτταρικές περιοχές όπως τα μιτοχόνδρια. Οι ERs ασκούν τις δράσεις τους μέσω δύο κύριων υποτύπων, τον υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (ERα) και τον υποδοχέα οιστρογόνων βήτα (ERβ). Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον όλο και περισσότερων ερευνητών επικεντρώνεται στις δράσεις του ERβ στο μιτοχόνδριο, έπειτα από έρευνες που έδειξαν παρουσία του στα οργάνια αυτά.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εύρεση αποτελεσματικών και εξειδικευμένων αντισωμάτων για το χαρακτηρισμό κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων β (ERβ). Η μελέτη της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στη σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά Neuro-2a, N2AmtGFPERβ, η οποία υπερεκφράζει σταθερά τον ERβ, ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescence protein, GFP), με μιτοχονδριακή (mitochondrial, mt) στόχευση. Αρχικά με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western πραγματοποιήθηκε έλεγχος οκτώ αντισωμάτων έναντι των δύο υποτύπων του υποδοχέα οιστρογόνων, καθώς και η καταλληλότητα τους για τον εντοπισμό και ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης της χιμαιρικής mtGFPERβ πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι από τα αντισώματα έναντι του ERβ που ελέχθηκαν, το καταλληλότερο αντίσωμα για τον χαρακτηρισμό των αποικιών ως προς την ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της υβριδικής πρωτεΐνης GFPERβ είναι το B-3. Τέλος, ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα και εκλεκτικότητα αντισωμάτων έναντι μορίων, που εμπλέκονται στην οιστρογονική σηματοδότηση. Τα μόρια αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την κατανόηση των σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω των οποίων ασκούνται οι μηχανισμοί οιστρογονικής δράσης από τους ERs.

Ως άμεσοι μελλοντικοί στόχοι τέθηκαν ο χαρακτηρισμός των αποικιών της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ με εφαρμογή της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρήση αντισώματος έναντι του ERβ, B-3, καθώς και αντισώματος έναντι GFP. Στη συνέχεια θα ακολουθήσει εκτίμηση των επιπέδων του mRNA του ERβ με τη μέθοδο της real-time PCR και χρήση κατάλληλων εκκινητών.

ABSTRACT

Estrogen receptors are transcription factors which are activated mostly by the binding of the ligand, belonging to the family of nuclear receptors and more specifically to the steroid hormone receptors. Their main ligand is 17- β estradiol (E2). ERs are located into the nucleus, the cytoplasm and other cellular organelles, such as mitochondria. ERs exert their actions via two types: estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β). In the past few years, most researchers focus on the ER β actions on the mitochondria, especially after studies indicating the presence of ER β into mitochondria.

The aim of this diploma thesis was finding effective and specified antibodies for the characterization of stable cell lines overexpressing estrogen receptor beta. This study has based on the stable cell line Neuro-2a, N2AmtGFPER β , which overexpress steadily the ER β , as a hybrid protein with green fluorescence protein (GFP) mitochondria targeted. Initially, through Western Blot eight antibodies towards the two types of estrogen receptor has been checked, as well as their suitability for locating and quantifying the expression of the chimeric mtGFPER β protein. The results of our study showed that from the antibodies towards ER β tested, the most appropriate antibody for the characterization of the colonies for quantitative estimation of the protein levels of the GFPER β hybrid protein is B-3. Finally, the efficacy and selectivity of antibodies against molecules involved in estrogen signaling has been tested. These molecules happen to be very important in order to comprehend the signaling pathways through which ERs acts.

Our future goals are to characterize the colonies of N2AmtGFPER β stable cell line with Western Blot using antibodies towards ER β , B-3 and towards GFP. Subsequently, an estimate of ER β mRNA levels will be followed by real-time PCR and the use of appropriate primers.

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

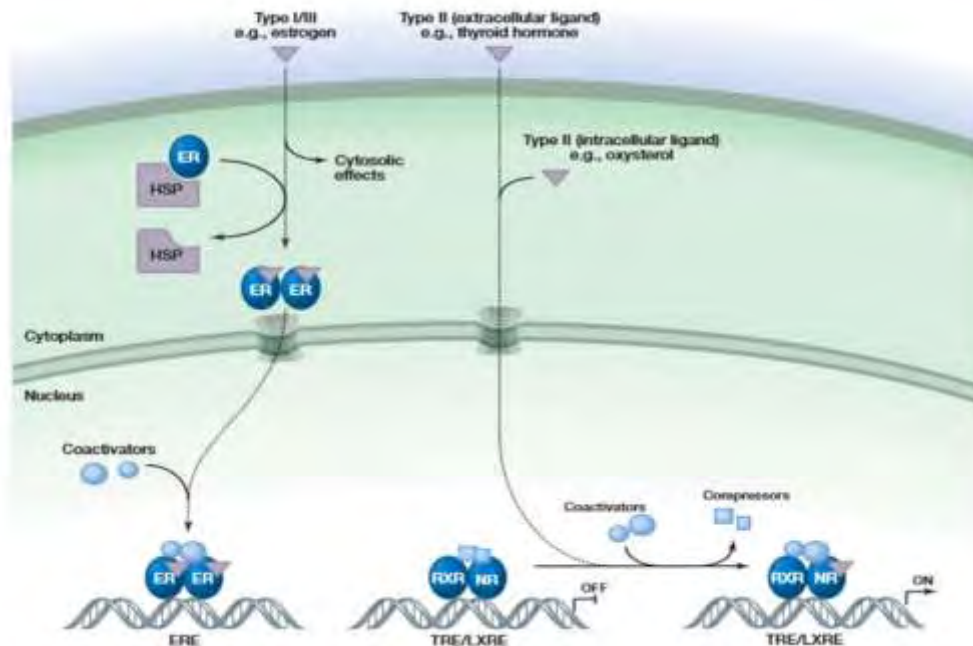
1.1) ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (Nuclear Receptors, NRs) αποτελούν τη μεγαλύτερη γνωστή οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων. Εμφανίζονται σε σπονδυλωτά, αρθρόποδα και νηματώδη και ελέγχουν πολυάριθμες βιολογικές διεργασίες, όπως η αύξηση, η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή, η διαφοροποίηση των κυττάρων, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η ομοιόσταση. Οι πιο γνωστοί προσδέτες τους περιλαμβάνουν τις στεροειδείς και θυρεοειδείς ορμόνες, τη βιταμίνη D, τις οξυστερόλες και τα χολικά οξέα (Renaud & D. Moras, 2000). Τα μικρά λιπόφιλα αυτά μόρια διαθέτουν την ικανότητα να διαπερνούν μέσω παθητικής διάχυσης την κυτταρική μεμβράνη. Με τον τρόπο αυτό εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων με αποτέλεσμα να συνδέονται απευθείας με τους πυρηνικούς υποδοχείς. Η οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο ομάδες: α) στους πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών (nuclear hormone receptors, NHRs), για τους οποίους έχουν ταυτοποιηθεί ορμονικοί προσδέτες και β) στους ορφανούς πυρηνικούς υποδοχείς για τους οποίους δεν έχουν αναγνωριστεί φυσικοί προσδέτες (Olefsky, 2001 & Marc Robinson-Rechavi et al, 2003). Από το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιούνται 48 πυρηνικοί υποδοχείς, αλλά λίγοι από αυτούς δρουν απουσία προσδέτη (Sever & Glass, 2013). Επιπλέον, η εξαρτώμενη δραστηριότητά τους από τους προσδέτες καθιστά τους NRs προφανείς φαρμακολογικούς στόχους (Renaud & D. Moras, 2000).

1.1.1) ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

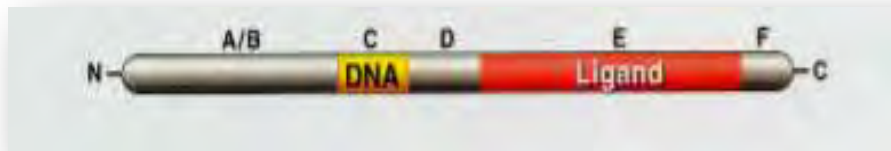
Οι πυρηνικοί υποδοχείς διακρίνονται σε τέσσερις διαφορετικούς υποτύπους βάσει της λειτουργίας τους. Συναντώνται ως μονομερή, ομοδιμερή και ετεροδιμερή και αναγνωρίζουν αλληλουχίες του DNA οι οποίες ονομάζονται στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (Hormone Response Elements, HREs) (Sever & Glass, 2013). Στους πυρηνικούς υποδοχείς τύπου I περιλαμβάνονται οι υποδοχείς ανδρογόνων, οιστρογόνων, αλατοκορτικοειδών, γλυκοκορτικοειδών και προγεστερόνης και εντοπίζονται αγκυροβολημένοι στο κυτταρόπλασμα όπου στην ανενεργή τους κατάσταση, είναι δεσμευμένοι σε πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSP, όπως η HSP90). Η δέσμευση του προσδέτη απελευθερώνει τον υποδοχέα από την πρωτεΐνη συνοδό (HSP), επιτρέποντας έτσι τον ομοδιμερισμό του και την είσοδο του στον πυρήνα. Από τη στιγμή που βρίσκεται στον πυρήνα, δεσμεύεται στα HREs που βρίσκονται στις περιοχές του υποκινητή των γονιδίων-στόχων του και επάγει τη μεταγραφή τους με τη βοήθεια και άλλων συνενεργοποιητών. Οι υποδοχείς τύπου II εντοπίζονται στον πυρήνα σε ανενεργή κατάσταση και συνδέονται με το DNA ακόμα και απουσία του προσδέτη τους, ως ετεροδιμερή. Δημιουργούν σύμπλοκα με συγκαταστολείς αποσιωπώντας τα γονίδια-στόχους τους. Η δέσμευση του προσδέτη επάγει την απομάκρυνση των συγκαταστολέων, την αντικατάστασή τους από τις πρωτεΐνες συνενεργοποιητές και την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Στη συγκεκριμένη κατηγορία ανήκουν μεταξύ άλλων, οι αποκαλούμενοι «ορφανοί υποδοχείς» και οι υποδοχείς της βιταμίνης D (Vitamin D Receptors, VDRs). Οι πυρηνικοί υποδοχείς τύπου III έχουν παρόμοια λειτουργία με τους υποδοχείς τύπου I, αλλά διαφέρουν στην οργάνωση των HREs, καθώς εμφανίζουν ευθείες και όχι

ανάστροφες επαναλήψεις. Τέλος, οι πυρηνικοί υποδοχείς τύπου IV προσδένονται ως μονομερή σε μισά τμήματα (half-sites) των HREs (Sever and Glass, 2013).



Εικόνα 1: Σηματοδότηση των διαφόρων κατηγοριών των πυρηνικών υποδοχέων (Sever & Glass, 2013).

Όλοι οι υποδοχείς αυτής της οικογένειας εμφανίζουν μια εξελικτικά συντηρημένη δομική οργάνωση που αποτελείται από πέντε ή έξι περιοχές (Germain et al, 2006). Η κοινή δομή τους χαρακτηρίζεται από ένα εξαιρετικά μεταβλητό αμινοτελικό άκρο το οποίο περιλαμβάνει αρκετές περιοχές trans ενεργοποίησης (NH₂-terminal domain, NTD ή A/B περιοχές), μία υψηλά συντηρημένη κεντρική επικράτεια δέσμευσης στο DNA που περιλαμβάνει δύο μοτίβα δέσμευσης ψευδαργύρου (DNA binding domain, DBD ή C περιοχή), μία μικρή περιοχή υπεύθυνη για τον πυρηνικό εντοπισμό του υποδοχέα (D περιοχή ή hinge), καθώς και την μετρίως συντηρημένη περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (Ligand Binding Domain, LBD ή αλλιώς E περιοχή) που εμπλέκεται και στον ολιγομερισμό του υποδοχέα. Ορισμένοι διαθέτουν επίσης μια μεταβλητή F περιοχή (Sever & Glass, 2013). Η F περιοχή βρίσκεται ανάμεσα στο καρβοξυτελικό άκρο και την LBD και είναι ικανή να διαμορφώνει τη γονιδιακή μεταγραφή ανάλογα με το είδος του υποκινητή και του ιστού (Planey et al, 2014). Οι περιοχές A / B περιλαμβάνουν την επικράτεια ενεργοποίησης 1 (activation function 1, AF1), ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο υπάρχει ακόμα μία επικράτεια ενεργοποίησης, η AF2 (activation function 2). Οι δύο επικράτειες AF-1 και AF-2 είναι αυτές που διευκολύνουν τη μεταγραφική ενεργότητα των υποδοχέων και είναι υπεύθυνες για τη στρατολόγηση συνρρυθμιστών στον προσδεμένο στο DNA υποδοχέα. Η δραστηριότητα των AFs εξαρτάται από τον εκάστοτε υποκινητή και ιστό. Η λειτουργία της AF1 είναι ανεξάρτητη από την ορμόνη-προσδέτη, ενώ η λειτουργία της AF2 απαιτεί την παρουσία του (Lee et al, 2012, Jia et al, 2015, Planey et al, 2014).



Εικόνα 2: Απεικόνιση της κοινής δομικής οργάνωσης των πυρηνικών υποδοχέων. Παρουσιάζονται όλες οι περιοχές ενός τυπικού πυρηνικού υποδοχέα(A-F) (Mangelsdorf et al, 1995)

1.2) ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Οι στεροειδείς ορμόνες είναι λιπόφιλα μόρια που προέρχονται κυρίως από την χοληστερόλη και συντίθενται στον φλοιό των επινεφριδίων (γλυκοκορτικοειδή, μεταλλοκορτικοειδή και ανδρογόνα των επινεφριδίων), στους όρχεις (ανδρογόνα των όρχεων και οιστρογόνα), στις ωοθήκες και στον πλακούντα (οιστρογόνα και προγεσταγόνα) (M.Beato & J.Klug, 2000). Οι μετατροπές και ο καταβολισμός των στεροειδών λαμβάνουν χώρα κυρίως στο ήπαρ, αλλά και σε άλλους περιφερειακούς ιστούς. Όλα τα στεροειδή δεσμεύονται σε εξειδικευμένους υποδοχείς, οι οποίοι εμφανίζουν σημαντική ομολογία και σχηματίζουν την οικογένεια των στεροειδών υποδοχέων (Steroid Hormone Receptors, SHRs) (Gupta & Mayer, 2013). Οι SHRs ελέγχουν με τη σειρά τους την έκφραση των γονιδίων-στόχων και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα, αλλά μελέτες δείχνουν ότι υπάρχουν και μορφές αυτών συνδεδεμένες με την κυτταρική μεμβράνη (M.Beato & J.Klug, 2000, Gupta & Mayer, 2013).

Όλα τα μέλη των SHRs προέρχονται από έναν μοναδικό προγονικό υποδοχέα που διαφοροποιήθηκε από την οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων νωρίς κατά την εξέλιξη των ζώων. Στη συνέχεια ο πληθυσμός της οικογένειας αυξήθηκε μέσω μιας σειράς διπλασιασμών γονιδίων. Η φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων των SHRs υποδηλώνει ότι υπάρχουν δύο κύριες υποκατηγορίες: i) οι υποδοχείς οιστρογόνων α και β (Estrogen Receptor α και β, ERα και ERβ, αντίστοιχα) και ii) οι υποδοχείς ανδρογόνων (Androgen receptors, AR), οι υποδοχείς προγεσταγόνων (Progesterone receptors, PR), οι υποδοχείς μεταλλοκορτικοειδών (Mineralocorticoid receptors, MR) και οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid receptors, GR). Η δεύτερη υποκατηγορία αποτελείται από δύο ζευγάρια στενά συνδεδεμένων αδερφών υποδοχέων (AR/PR & MR/GR) (Eick & Thornton, 2011).

Οι στεροειδείς ορμόνες εμπλέκονται στην ανάπτυξη των χαρακτηριστικών φύλου, στην ικανότητα ανοχής του οργανισμού σε ασθένειες και τραυματισμούς αλλά και στον έλεγχο του μεταβολισμού, της φλεγμονής, των ανοσοποιητικών λειτουργιών και της ισορροπίας άλατος και νερού. Παρόλα αυτά όμως, όλες οι κλασικές στεροειδείς ορμόνες, ιδιαίτερα οι ορμόνες φύλου, μπορεί να εμπλακούν στην ανάπτυξη ασθενειών (Gupta & Mayer, 2013).

1.3) ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

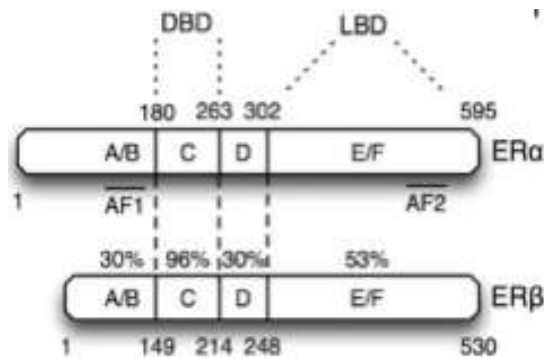
Οι υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs) αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται κατά κύρια βάση από τη δέσμευση του προσδέτη τους και ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Στα τέλη της δεκαετίας του 1950 ανακαλύφθηκε από τους Jensen & Jacobsen η ύπαρξη ενός μορίου υποδοχέα στον οποίο θα μπορούσε να δεσμευτεί η 17-β οιστραδιόλη (17-β estradiol, E2). Ο πρώτος ER, ο ERα, κλωνοποιήθηκε το 1986 από την κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF-7 και θεωρούνταν ως ο μοναδικός ER, έως ότου το 1996 κλωνοποιήθηκε από κύτταρα προστάτη αρουραίου και ένας δεύτερος ER, ο ERβ (Dalhmanwright, 2006, Lee et al, 2012).

1.3.1) ΈΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Είναι γνωστό ότι ο ERα και ο ERβ κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (ESR1 και ESR2 αντίστοιχα), που εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (6q25.1 και 14q23.2, αντίστοιχα) και ελέγχουν την έκφραση των δύο υποδοχέων στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Ο ERα αποτελεί μια πρωτεΐνη μήκους 595 αμινοξέων και έχει μοριακό βάρος 67-68 kDa, ενώ ο ERβ μια πρωτεΐνη μήκους 530 αμινοξέων και έχει μοριακό βάρος 59-60 kDa. Ο ERα εκφράζεται κυρίως σε αναπαραγωγικούς ιστούς (μήτρα, ωθήκες) και σε χαμηλότερο βαθμό σε άλλους ιστούς, όπως μαστού, νεφρού, οστού, λευκού λιπώδους ιστού και ήπατος. Ο ERβ με τη σειρά του εκφράζεται κυρίως σε μη αναπαραγωγικούς ιστούς, όπως στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), στο καρδιαγγειακό σύστημα, στον πνεύμονα, στον προστάτη, στο παχύ έντερο, στο νεφρό και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Στον εγκέφαλο ο ERα και ο ERβ κατανέμονται ευρέως και εκφράζονται σε νευρωνικά και μη κύτταρα. Οι ERs εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα, αλλά επίσης στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια (Cui et al, 2013, Jia et al, 2015).

1.3.2) ΔΟΜΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ ERA ΚΑΙ ERB

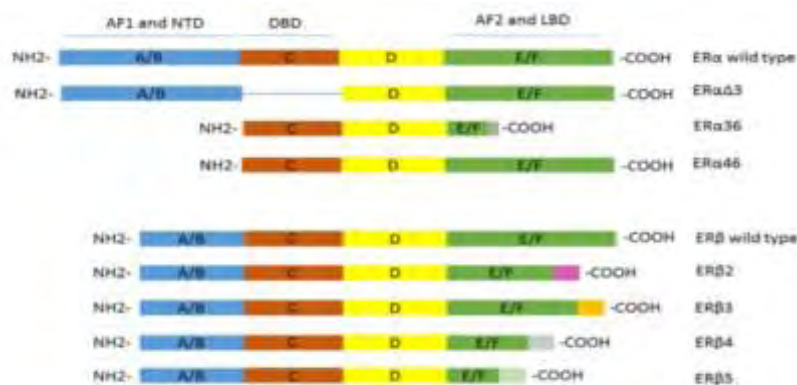
Οι δύο υπότυποι του ER παρουσιάζουν μεγάλη δομική απόκλιση. Η NTD είναι η λιγότερο συντηρημένη περιοχή με μόνο 30 % αμινοξική ομολογία μεταξύ ERα και ERβ, ενώ η DBD η περισσότερο συντηρημένη εμφανίζοντας 96% ομολογία. Η LBD των ERα και ERβ εμφανίζει 53% ομολογία παρόλο που οι θέσεις δέσμευσης του προσδέτη των δύο υποτύπων παρουσιάζουν μόνο μικρές διαφορές στη δομή. Είναι σημαντικό, ότι αυτές οι μικρές δομικές διαφορές στις θέσεις δέσμευσης του προσδέτη επέτρεψαν την ανάπτυξη εκλεκτικών προσδετών ανά υπότυπο (Lee et al, 2012 & Jia et al, 2015). Λειτουργικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο ERβ έχει χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας της AF1 επικράτειας σε σύγκριση με τον ERα (Lee et al, 2012). Τέλος, παρόλο που και οι δύο ERs έχουν σχεδόν πανομοιότυπες περιοχές πρόσδεσης στο DNA, ο ERβ έχει χαμηλότερη συγγένεια για τα μισά τμήματα των EREs (ERE half-sites) (Deroo et al, 2010).



Εικόνα 3: Σύγκριση πρωτεϊνικής δομής των ERα και ERβ. Παρουσιάζονται επίσης τα ποσοστά ομολογίας ανάμεσα στις περιοχές των ERα και ERβ. Η μεγαλύτερη ομολογία παρατηρείται στην περιοχή σύνδεσης στο DNA (DBD), ενώ η μικρότερη στο αμινοτελικό άκρο (A/B) (Deeroo et al , 2010).

1.3.3) ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ

Έχουν περιγραφεί αρκετά εναλλακτικά μετάγραφα και για τους δύο υποδοχείς οιστρογόνων, λόγω του εναλλακτικού ματίσματος των ER-mRNAs. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τον ERα έχουν ταυτοποιηθεί τρεις ισομορφές. Αναλυτικότερα, στον ERαΔ3 απουσιάζει το εξωνίο 3, που κωδικοποιεί μέρος της DBD. Ο ERα36 στερείται των AF1 και AF2 περιοχών και επίσης τα τελευταία 138 αμινοξέα του αντικαθίστανται από μια μοναδική αλληλουχία 22 αμινοξέων. Τέλος, ο ERα46 στον οποίο εκλείπει η περιοχή που περιλαμβάνει την AF1 περιοχή χαρακτηρίστηκε αργότερα ως ένας κυρίαρχος αναστολέας της δραστηριότητας του ERα στους οστεοβλάστες. Σχετικά με τον ERβ έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον τέσσερις ισομορφές (ERβ2, ERβ3, ERβ4, ERβ5). Όλες οι παραλλαγές του ERβ διαθέτουν ένα νέο καρβοξυτελικό άκρο με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατη η πρόσδεση των οιστρογόνων και των υπόλοιπων προσδετών (Jia et al, 2015 & Heldring et al ,2007). Για παράδειγμα, η ανθρώπινη ισομορφή ERβ2 (ή αλλιώς ERβ cx) διαθέτει μια μοναδική αλληλουχία 26 αμινοξέων που αντικαθιστά το καρβοξυτελικό άκρο της LBD και είναι ανίκανη να δεσμεύσει προσδέτες ή συνενεργοποιητές με αποτέλεσμα να εκλείπει η μεταγραφική της ενεργότητα. Η ισομορφή αυτή διμερίζεται, κατά προτίμηση, με τον ERα, αποσιωπώντας έτσι την οιστρογονική σηματοδότηση (Heldring et al, 2007).



Εικόνα 4: Οι δομές των ισομορφών των ERs. Επισημαίνονται οι διαφορετικές λειτουργικές περιοχές: η αμινοτελική περιοχή (NTD) με μπλέ, η περιοχή δέσμευσης του DNA (DBD) με

πορτοκαλί χρώμα και η καρβοξυτελική περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (LBD) με πράσινο χρώμα (Jia et al, 2015).

1.4) ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Μελέτες αποδεικνύουν ότι τα οιστρογόνα και οι υποδοχείς τους ασκούν τις δράσεις τους μέσω διαφόρων μονοπατιών σηματοδότησης (Vrtačnik et al, 2014, Marino et al, 2006).

1.4.1) ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

α) Άμεση σύνδεση με το DNA

Η οδός άμεσης γενωμικής σηματοδότησης θεωρείται ως ο κλασικός μηχανισμός της σηματοδότησης των οιστρογόνων. Η δέσμευση της 17β-οιστραδιόλης στον ERα ή στον ERβ στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων προκαλεί αλλαγές διαμόρφωσης που επιτρέπουν τον διμερισμό του υποδοχέα, την μετατόπιση στον πυρήνα και τη δέσμευση στα στοιχεία απόκρισης οιστρογόνου (Estrogen Receptor Elements, EREs). Η δέσμευση του ER στα EREs προκαλεί επίσης την δέσμευση μίας ποικιλίας συνρρυθμιστών σε ένα σύμπλεγμα που μεταβάλλει τη δομή της χρωματίνης και διευκολύνει την στρατολόγηση του μεταγραφικού μηχανισμού της RNA πολυμεράσης II. Με τον τρόπο αυτό, το σύμπλοκο οιστρογόνου-ER δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής που προάγει την έκφραση γονιδίων (Vrtačnik et al, 2014).

β) Έμμεση σύνδεση με το DNA

Η 17β-οιστραδιόλη μπορεί επίσης να επηρεάσει την έκφραση γονιδίων που δεν φέρουν EREs στον υποκινητή τους. Στην πραγματικότητα, περίπου το ένα τρίτο των γονιδίων που αποτελούν στόχους της οιστρογονικής σηματοδότησης δεν διαθέτουν αλληλουχίες τύπου ERE. Στην περίπτωση αυτής της σηματοδότησης, οι ERs που ενεργοποιούνται από τον προσδέτη δεν δεσμεύονται απευθείας με το DNA αλλά πιθανόν μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με άλλες κατηγορίες μεταγραφικών παραγόντων στα αντίστοιχα στοιχεία απόκρισης τους. Αυτός ο τρόπος δράσης καθιστά δυνατή την ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης των γονιδίων-στόχων και διευρύνει σημαντικά την ρυθμιστική επίδραση των οιστρογόνων. Ένα από τα καλύτερα μελετημένα παραδείγματα αυτού του μηχανισμού οιστρογονικής σηματοδότησης περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του συμπλόκου οιστρογόνου-ER με πρωτεΐνες πρωτοογκογονιδίου JUN στις θέσεις δέσμευσης AP-1 (Activation Protein 1) στα γονίδια που κωδικοποιούν την ωλοευκωματίνη, τον IGF1 (Insulin Like Growth Factor-1), την κολλαγενάση, την κυκλίνη D1 (CC-ND1) και την ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης. Το αποτέλεσμα εξαρτάται από τον υποτύπο του ER και από τον τύπο του προσδέτη. Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που διευκολύνουν αυτή τη σηματοδότηση των οιστρογόνων περιλαμβάνουν τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 (Stimulating Protein 1), τον πυρηνικό παράγοντα κB (Nuclear Factor κB, NFκB), την πρωτεΐνη C/EBPβ (CCAAT/enhancer binding protein β), την πρωτεΐνη δέσμευσης GATA (GATA1) και

τον μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής 5 (signal transducer and activator of transcription 5, STAT5) (Vrtačnik et al, 2014).

1.4.2) ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Οι ταχείες μη γενωμικές δράσεις είναι κοινές στις στεροειδείς ορμόνες. Συνήθως, συσχετίζονται με την ενεργοποίηση διαφόρων καταρρακτών πρωτεϊνικής κινάσης που μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε έμμεσες αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση. Οι αλλαγές πραγματοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης των μεταγραφικών παραγόντων. Η δέσμευση των οιστρογόνων σε ERs που εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια μπορεί να προκαλέσει κινητοποίηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, διέγερση της δραστηριότητας της αδενυλικής κυκλάσης και παραγωγή κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cyclic adenosine monophosphate, cAMP). Επιπλέον, ενεργοποιείται η οδός σηματοδότησης της MAPK (Mitogen-activated protein kinase), της κινάσης της φωσφοϊνοσιτόλης 3 (Phosphoinositide 3-kinase, PI3K), καθώς και οι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη. Οι μοριακοί μηχανισμοί της μη γενωμικής σηματοδότησης των οιστρογόνων είναι αναμφισβήτητα ποικίλοι και πολυάριθμοι. Μπορεί να εξαρτώνται από μια σειρά συνθηκών, όπως η διαθεσιμότητα των μορίων μεταγωγής σήματος, υποδηλώνοντας έναν κυτταρο-ειδικό μηχανισμό δράσης (Vrtačnik et al,2014).

1.4.3) ΔΡΑΣΕΙΣ ER ΑΠΟΥΣΙΑ ΠΡΟΣΔΕΤΗ

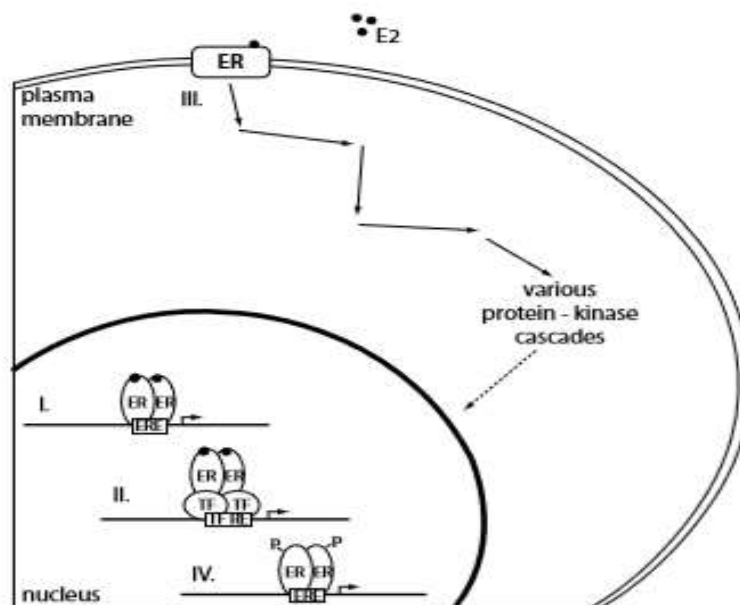
Οι ERs μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν απουσία 17β-οιστραδιόλης ή άλλου κατάλληλου προσδέτη. Η φωσφορυλίωση των υποδοχέων ή των συσχετιζόμενων συνρρυθμιστών τους μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση των ERs ακόμα και απουσία του προσδέτη τους. Τα δύο αμινοξέα που αποτελούν συχνά στόχους φωσφορυλίωσης είναι η σερίνη και η τυροσίνη. Οι οδοί σηματοδότησης που είναι υπεύθυνες για αυτές τις δράσεις περιλαμβάνουν : α) ρυθμιστές γενικής κυτταρικής φωσφορυλιωμένης κατάστασης, όπως η πρωτεϊνική κινάση A (Protein Kinase A, PKA) και η πρωτεϊνική κινάση C (Protein Kinase C, PKC), β) εξωκυτταρικά σήματα, όπως πεπτιδικόι αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες ή νευροδιαβιβαστές και γ) ρυθμιστές κυτταρικού κύκλου. Κύρια ενδιάμεσα μεταξύ των αυξητικών παραγόντων και των ERs είναι οι πρωτεΐνες δέσμευσης p21ras και οι καταρράκτες φωσφορυλίωσης MAPK. Πρόσθετα εξωκυτταρικά σήματα που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των ERs περιλαμβάνουν ερεγουλίνη, ιντερλευκίνη 2 και ντοπαμίνη, καθώς και ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως η κυκλίνη A και η κυκλίνη D1 (Vrtačnik et al,2014).

1.4.4) ΣΥΓΚΛΙΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΗ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERs

Ένα χαρακτηριστικό της πολύπλοκης σηματοδότησης των οιστρογόνων είναι ότι σε ορισμένες περιπτώσεις τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος συνδέουν τη γενωμική με τη μη γενωμική δράση. Έτσι οι ERs μπορούν να συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής μέσω ενός μηχανισμού μεταγραφικής διασταυρούμενης επικοινωνίας

(transcriptional cross-talk). Παραδείγματα τέτοιων πολύπλοκων ρυθμιστικών δράσεων του ER είναι τα γονίδια κυκλίνη D1 και VEGF (vascular endothelial growth factor). Η κυκλίνη D1, ένας καλά καθορισμένος στόχος για την E2 στον μαστικό αδένα, είναι σημαντική για την αύξηση των κυττάρων σε όλη τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Ο υποκινητής της κυκλίνης D1 είναι πολύπλοκος και περιέχει θέσεις δέσμησης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, αλλά δεν έχουν ταυτοποιηθεί αλληλουχίες τύπου ERE σε αυτόν. Έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της κυκλίνης D1 από την E2 προκύπτει από διαφορετικές δράσεις του ER, όπως είναι η άμεση αλληλεπίδραση ERα/ Sp1 ή ERα / AP-1, καθώς επίσης και εξαρτώμενες από τον ER μη γενωμικές δράσεις. Ο υποκινητής του γονιδίου της κυκλίνης D1 περιέχει επίσης θέσεις δέσμησης για τον STAT5 και τον NF-κΒ, που θα μπορούσαν να είναι στόχοι των ERs τόσο μέσω γενωμικών όσο και μη γενωμικών δράσεων. Το γονίδιο VEGF είναι ένα άλλο παράδειγμα διασταυρούμενης επικοινωνίας. Στην πραγματικότητα, ο υποκινητής του γονιδίου VEGF περιέχει τόσο αλληλουχίες τύπου ERE όσο και πλούσιες σε GC αλληλουχίες που δεσμεύουν τον ER και το σύμπλεγμα ER-Sp1. Και οι δύο πρέπει να καταλαμβάνονται, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη ενεργοποίηση από την E2 (Marino et al, 2006).

Η τελική γονιδιακή απόκριση συνεπώς εξαρτάται από πολλαπλούς παράγοντες που συμπεριλαμβάνουν α) τον συνδυασμό των μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται στον υποκινητή του γονιδίου-στόχου, β) τα επίπεδα έκφρασης και τον κυτταρικό εντοπισμό των ERs, των πολυάριθμων συνρρυθμιστών τους και των σηματοδοτικών μορίων καθώς και γ) τη φύση των ερεθισμάτων. Δεδομένου ότι αυτές οι μεταβλητές μπορούν να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των διαφόρων τύπων κυττάρων, είναι πιθανό τα οιστρογόνα να χρησιμοποιούν ξεχωριστές οδούς σηματοδότησης ανάλογα με το κυτταρικό πλαίσιο. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζουν πολύ ακριβή και κυτταρο-ειδική ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου (Vrtačnik et al, 2014).



Εικόνα 5: Αναπαράσταση των διαφόρων μηχανισμών σηματοδότησης των οιστρογόνων. (I) Η οδός άμεσης γενωμικής σηματοδότησης, που θεωρείται ο κλασικός μηχανισμός σηματοδότησης οιστρογόνων, προάγει την έκφραση του γονιδίου-στόχου δεσμεύοντας το σύμπλοκο E2-ER απευθείας στο ERE. (II.) Στην περίπτωση της οδού έμμεσης γενωμικής

σηματοδότησης, οι ERs ενεργοποιημένοι από την E2 δεσμεύονται στο DNA μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με άλλες κατηγορίες μεταγραφικών παραγόντων στα αντίστοιχα στοιχεία απόκρισης τους. (III.) Η μη γενωμική οδός σηματοδότησης ξεκινά με τη δέσμευση της E2 στους ER που βρίσκονται στη πλασματική μεμβράνη με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διαφόρων καταρρακτών πρωτεϊνικής κινάσης. Αυτοί μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων λόγω της φωσφορυλίωσης των μεταγραφικών παραγόντων. (IV.) Η ανεξάρτητη από τους προσδέτες οδός σηματοδότησης προκαλεί ενεργοποίηση των ER και μεταγραφή του γονιδίου- στόχου μέσω της φωσφορυλίωσης των ER ή των συσχετιζόμενων συνρρυθμιστών τους (Vrtačnik et al, 2014).

1.5) ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ER) ΚΑΙ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

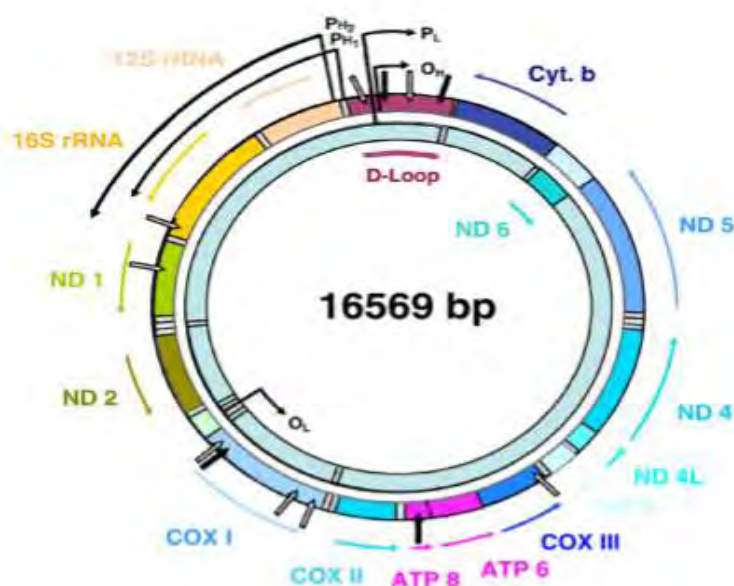
1.5.1) ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν πολύ σημαντικά οργανίδια, εξαιτίας του ρόλου τους σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Το μεγαλύτερο ποσοστό της απαιτούμενης ενέργειας του κυττάρου (90%) παρέχεται μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε πολλά στάδια ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή ουρίας, στη βιοσύνθεση αίμης και στην β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Παράλληλα, τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση του κυττάρου στο στρες, στην ανοσορρύθμιση, στη γήρανση και στην κυτταρική διαφοροποίηση. Διαταραχές των μιτοχονδριακών λειτουργιών έχουν συσχετιστεί με νευρομυϊκές εκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Πάρκινσον, η πλευρική αμυοτροφική σκλήρυνση καθώς και με καρκίνο (Psarra & Sekeris, 2008).

Η πλήρης λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων απαιτεί τη συνεργασία τους με άλλα κυτταρικά οργανίδια και κυρίως με τον πυρήνα. Η παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι μια διαδικασία κατά την οποία απαιτούνται ένζυμα που κωδικοποιούνται τόσο από τον πυρήνα όσο και από τα μιτοχόνδρια. Ο τελικός σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι ο σχηματισμός λειτουργικών αναπνευστικών συμπλόκων. Τα μιτοχόνδρια αποτελούν κυτταρικούς αισθητήρες των ενεργειακών απαιτήσεων του κυττάρου και επιτυγχάνουν προσαρμοστική ρύθμιση της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Σε καταστάσεις όπου οι απαιτήσεις του κυττάρου για ενέργεια είναι χαμηλές, η αναπνευστική αλυσίδα αυξάνει την παραγωγή του ATP μέσω της αλλοστερικής ενεργοποίησης της OXPHOS από μεταβολίτες, όπως το ADP. Σε αντίθεση, σε περιπτώσεις υψηλών ενεργειακών απαιτήσεων το κύτταρο αποκρίνεται μέσω αύξησης της βιοσύνθεσης της OXPHOS. Σε σπάνιες περιπτώσεις η απόκριση πραγματοποιείται μέσω βιογένεσης των μιτοχονδρίων που περιλαμβάνει αύξηση της μεταγραφής πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Psarra & Sekeris, 2008).

Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην παροχή ενέργειας στα κύτταρα μέσω του μεταβολισμού του οξυγόνου στην αναπνευστική αλυσίδα, οδηγεί κατά κανόνα στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Τα ROS αποτελούν κύριους ενδογενείς αποπτωτικούς παράγοντες. Ωστόσο, η παρατηρούμενη διακύμανση της παραγωγής ενέργειας σε ορισμένες ακραίες περιπτώσεις μπορεί να έχει επιβλαβείς επιπτώσεις σχετικά με τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα μιτοχόνδρια λαμβάνουν και ενσωματώνουν μια σειρά εξωγενών και ενδογενών αποπτωτικών και αντιαποπτωτικών σημάτων. Μεταξύ των κύριων εξωγενών σημάτων είναι οι στεροειδείς και οι θυρεοειδείς ορμόνες. Συσσωρευμένα

αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι μερικά από τα ορμονικά αποπτωτικά και αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα διαμεσολαβούνται από τους αντίστοιχους μιτοχονδριακούς υποδοχείς (Psarra & Sekeris, 2008).



Εικόνα 6: Μιτοχονδριακό γονιδίωμα και πιθανές θέσεις των στοιχείων απόκρισης στις ορμόνες (HREs). Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών έχει μήκος 16.6 kb. Οι δύο αλυσίδες του DNA έχουν μια ασύμμετρη κατανομή των πουρινών και των πυριμιδινών, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται βαριές και ελαφριές αλυσίδες. Η ελαφριά αλυσίδα μεταγράφεται από έναν κυρίαρχο υποκινητή (PL), ενώ η βαριά από δύο γειτονικούς υποκινητές (PH1 & PH2) που εντοπίζονται στην περιοχή ελέγχου που περιλαμβάνει και μια εκτοπισμένη θηλιά (D-loop). Όλοι οι υποκινητές εντοπίζονται στη ρυθμιστική περιοχή του D-loop, ενώ πιθανολογείται και η παρουσία εσωτερικών HREs, που μπορεί να ρυθμίζουν τη διαδικασία της μεταγραφής σε άλλα στάδια. Η μεταγραφή από τους υποκινητές PH2 και PL, δημιουργεί μεγάλα πολυκιστρονικά προϊόντα που κωδικοποιούν ώριμα mRNA και tRNAs. Αντίθετα, η μεταγραφή από τον PH1 υποκινητή δημιουργεί ένα μικρό σε μήκος μετάγραφο που κωδικοποιεί δύο rRNAs. Τα λευκά βέλη αντιπροσωπεύουν τα HREs των πυρηνικών υποδοχέων τάξης I, ενώ τα μαύρα βέλη τα HREs των υποδοχέων τάξης II (Psarra & Sekeris, 2008).

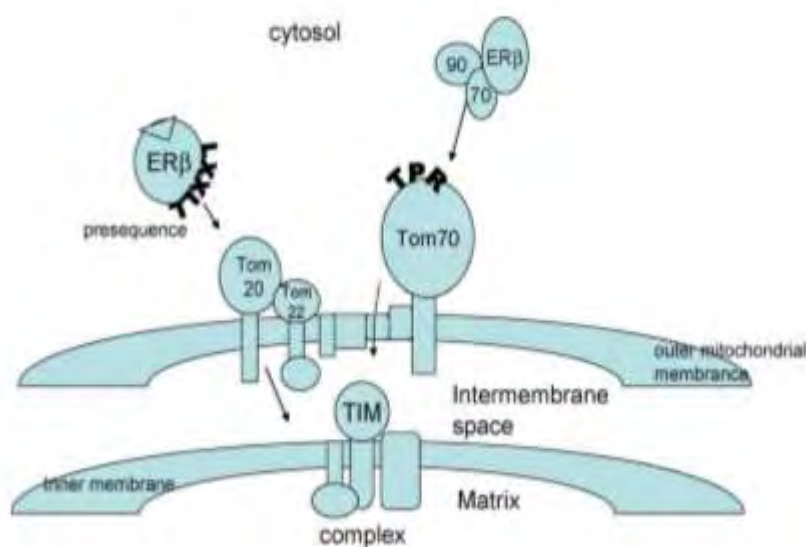
1.5.2) ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΗΣ ΒΗΤΑ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ERβ) ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ

Η συνεργασία των μιτοχονδρίων με τα υπόλοιπα οργανίδια και ιδιαίτερα με τον πυρήνα είναι καθοριστικής σημασίας. Σημείο κλειδί αποτελεί η είσοδος και η σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Οι περισσότερες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα, συντίθενται στο κυτταρόπλασμα ως προ-πρωτεΐνες κι έπειτα μεταφέρονται σε υποδοχείς στην επιφάνεια του μιτοχονδρίου υπεύθυνους για την εισαγωγή μορίων μέσα στα οργανίδια αυτά. Όμως οι υποδοχείς του μιτοχονδρίου αναγνωρίζουν πρωτεΐνες που φέρουν ένα κατάλληλο σήμα. Το σήμα αυτό ονομάζεται αλληλουχία οδηγός και αποτελείται από 20-50 αμινοξέα που εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών. Άλλες είναι πρωτεΐνες μεταφορείς που περιέχουν εσωτερικές αλληλουχίες. Οι πρωτεΐνες που δεν περιέχουν αλληλουχίες σύνδεσης με υποδοχείς

του μιτοχονδρίου, αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς (chaperons), μέσω ειδικών αλληλουχιών (W. Simpkins et al. 2008).

Οι πιο γνωστές πρωτεΐνες εισέρχονται στο μιτοχόνδριο μέσω του συμπλόκου της μετατοπίας (translocase) της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Tom). Το σύμπλεγμα Tom αναγνωρίζει αλληλουχίες με trans και cis περιοχές σύνδεσης και μεταφέρει τις πρωτεΐνες μέσα στο μιτοχόνδριο. Το συγκεκριμένο σύμπλοκο αποτελείται από τουλάχιστον 7 υπομονάδες που περιλαμβάνουν υποδοχείς εισόδου και πρωτεΐνες κανάλια. Η Tom20 και Tom70 είναι οι βασικές πρωτεΐνες υποδοχείς του συμπλόκου. Η Tom20 συνδέεται με προ-αλληλουχίες (presequences) προ-πρωτεϊνών (preproteins), ενώ η Tom70 συνδέεται σε εσωτερικές αλληλουχίες μεμβρανικών πρωτεϊνών. Οι Tom20 και Tom22 αναγνωρίζουν ένα μοτίβο φΧΧφφ, όπου φ είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ και Χ ένα οποιοδήποτε αμινοξύ. Ο υποδοχέας Tom70 θεωρείται υπεύθυνος για την είσοδο στο μιτοχόνδριο πρωτεϊνών που δεν φέρουν αλληλουχία οδηγό. Πιο ειδικά, υπάρχουν πρωτεΐνες που κατά την είσοδο και έλευση τους από τις δύο μιτοχονδριακές μεμβράνες πρέπει να αποκτήσουν συγκεκριμένη διαμόρφωση ή και να χάσουν την αναδίπλωσή τους, προκειμένου να επιτευχθεί η μεταφορά. Για το λόγο αυτό βρίσκονται συζευγμένες με HSPs που βοηθούν στη σωστή αναδίπλωση, στη ρύθμιση της αποικοδόμησής τους, αλλά και στη μεταφορά τους σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Έτσι, στις περιπτώσεις τέτοιων πρωτεϊνών, η μεταφορά διενεργείται μέσω αλληλεπίδρασης των HSPs με το μοτίβο TPR (Tetratricopeptide Repeat) και τον υποδοχέα Tom70 (W. Simpkins, 2008).

Ο ERβ εισέρχεται στα μιτοχόνδρια μέσω δύο εναλλακτικών οδών. Στην πρώτη οδό, ο ERβ που βρίσκεται χωρίς τον προσδέτη του είναι συνδεδεμένος με τις Hsp70 και Hsp90 και στη συνέχεια αναγνωρίζεται από την Tom70. Στη δεύτερη οδό, ο ERβ που είναι συνδεδεμένος με τον προσδέτη του, αναγνωρίζεται από τις Tom20/Tom22, μέσω του μοτίβου LXXLL (όπου L λευκίνη) που βρίσκεται στην περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (αμινοτελικό άκρο). Και στις δύο οδούς, αφού περάσει διαμέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης μεταφέρεται στο σύμπλοκο TIM μέσω του οποίου εισέρχεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου (W. Simpkins, 2008).



Εικόνα 7 : Είσοδος του ERβ στα μιτοχόνδρια μέσω δύο εναλλακτικών οδών. Στην πρώτη οδό ο ERβ που βρίσκεται χωρίς προσδέτη συνδεδεμένος με τις Hsp70 και Hsp90, αναγνωρίζεται

από την Tom70. Στη δεύτερη οδό, ο ERβ που βρίσκεται συμπλοκοποιημένος με τον προσδέτη του, αναγνωρίζεται από τις Tom20/Tom22 (W. Simpkins, 2008).

1.5.3) ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΒΗΤΑ ΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (mtERβ)

Συσσωρευση στοιχείων από μελέτες σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων υποδηλώνουν ότι τα μιτοχόνδρια είναι σημαντικοί στόχοι για τις δράσεις των οιστρογόνων. Η E2 φαίνεται να ρυθμίζει διάφορες μιτοχονδριακές λειτουργίες, όπως την παραγωγή ATP, τη διατήρηση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, τη μιτοχονδριακή βιογένεση και τη ρύθμιση των συγκεντρώσεων ασβεστίου. Ο ERβ παρουσιάζει μιτοχονδριακή εντόπιση και μέσω της άμεσης σύνδεσης με EREs στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Τα περισσότερα γονίδια που ρυθμίζονται από τον ERβ είναι μιτοχονδριακές δομικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Liao et al,2015, Psarra & Sekeris,2008, James W. Simpkins, 2008). Μελέτες έχουν δείξει πως ο mtERβ αυξάνει την έκφραση των υπομονάδων I, II και III της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, ενώ συμβάλλει στην αύξηση της αναπνευστικής ικανότητας, στην αύξηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και στην αναστολή της απόπτωσης (Psarra & Sekeris, 2008).

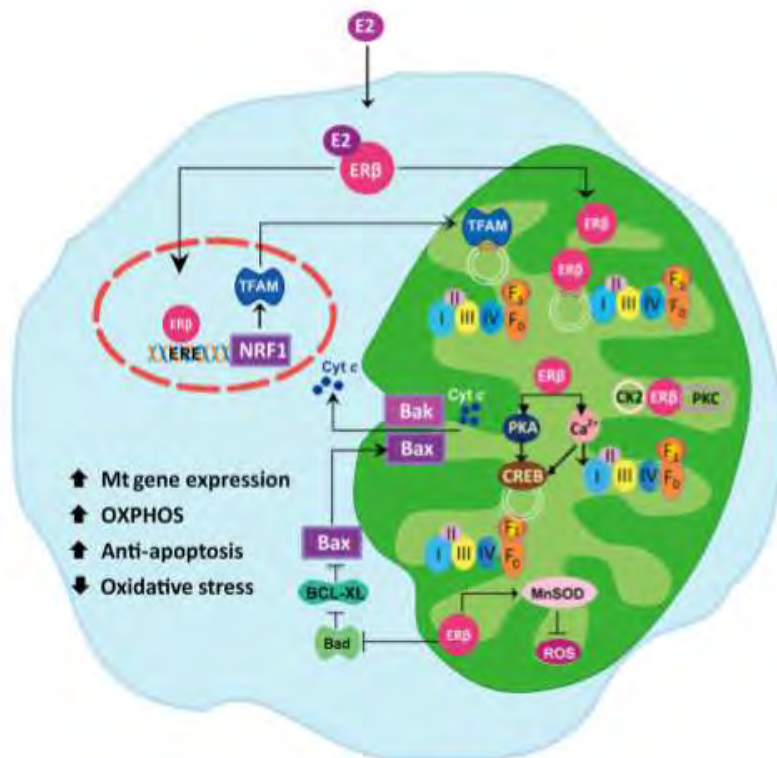
Επιπροσθέτως, έχει παρατηρηθεί ότι ο mtERβ δεσμεύεται στα στοιχεία απόκρισης οιστρογόνων (EREs), τα οποία εντοπίζονται στην περιοχή D-loop του μιτοχονδριακού DNA (mitochondrial DNA, mtDNA). Σε άλλες περιπτώσεις ασκεί τη δράση του μέσω ρύθμισης της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης CREB (cAMP-response element binding protein). Η CREB επηρεάζει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή μέσω δέσμευσης σε στοιχεία απόκρισης στο cAMP (CRE), που επίσης εντοπίζονται στην περιοχή D-loop του mtDNA. Οι αλληλεπιδράσεις του ERβ και του μιτοχονδριακού DNA υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα μπορούν να τροποποιήσουν τη μεταγραφή των μιτοχονδριακών γονιδίων καθώς και τα κυτταρικά ενεργειακά επίπεδα (Liao et al, 2015).

Εκτός από την ικανότητά του να ρυθμίζει την έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων, ο mtERβ έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται σε δραστηριότητες επιβίωσης των κυττάρων μέσω αντιαποπτωτικών διαδικασιών. Πιο συγκεκριμένα, ο mtERβ μπορεί να αλληλεπιδράσει με την προαποπτωτική πρωτεΐνη Bad (Bcl-2 associated agonist of cell death), οδηγώντας έτσι στην καταστολή της ενεργοποίησης της Bax (Bcl-2-associated X protein) και στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c με έναν τρόπο εξαρτώμενο ή μη από τον προσδέτη. Επιπλέον, μπορεί να αλληλεπιδράσει με πυρηνικούς στόχους, όπως ο πυρηνικός αναπνευστικός παράγοντας-1 (nuclear respiratory factor-1, NRF1) και ο μιτοχονδριακός παράγοντας της μεταγραφής A (mitochondrial transcription factor A, TFAM), που ενεργοποιούν τη μιτοχονδριακή βιογένεση (Liao et al. 2015).

Όσον αφορά το ρόλο του mtERβ στο οξειδωτικό στρες, έχει βρεθεί πως ενεργοποιεί τη μιτοχονδριακή μαγγανική δισμουτάση του σουπεροξειδίου (MnSOD), η οποία καταλύει τη διάσπαση των ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου (M. Klinge, 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι από επιστημονικές μελέτες ο mtERβ έχει βρεθεί στον εγκέφαλο ποντικού να αλληλεπιδρά με τη μιτοχονδριακή κινάση της καζεΐνης 2 (CK2) καθώς και με την φωσφοκινάση C (PKC), οι οποίες συμβάλλουν τόσο στη βιογένεση της

μιτοχονδριακής μετατοπάσης (translocase) της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (TOM) όσο και στη ρύθμιση μιτοχονδριακών καναλιών καλίου που είναι ευαίσθητα στο ATP (Liao et al. 2015).

Επιπλέον, ειδικοί ρυθμιστές (modulators) του υποδοχέα οιστρογόνων έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν τη μιτοχονδριακή ροή ιόντων Ca^{2+} , οδηγώντας σε ρύθμιση της φωσφορυλίωσης των μιτοχονδριακών αναπνευστικών ενζύμων και της αναπνευστικής ικανότητας. Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζουν τη λειτουργικότητα και τη δραστηριότητα των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας. Η άμεση και έμμεση ρύθμιση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, της μιτοχονδριακής βιογένεσης και των αντιαποπτωτικών μονοπατιών από τον mtERβ ως απόκριση σε ενεργειακές απαιτήσεις μπορεί να συμβάλλει σε μεταβολές των κυτταρικών μεταβολικών οδών (Liao et al, 2015).



Εικόνα 8: Ο πιθανός ρόλος του μιτοχονδριακού ERβ στη βιοενεργητική, στην μιτοχονδριακή βιογένεση και στα αντι-αποπτωτικά μονοπάτια (Liao et al. 2015).

1.6) ERβ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Σε ευαίσθητους σε οιστρογόνα ιστούς, έχουν βρεθεί αρκετές μιτοχονδριακές μεταβολές κατά τη διάρκεια καρκινογένεσης που προκαλούνται από οιστρογόνα. Οι μεταβολές αυτές περιλαμβάνουν την αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα των πρωτεϊνών της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, την επαγωγή της μεταγραφής των μιτοχονδριακών γονιδίων και τη μείωση της παραγωγής μιτοχονδριακών ROS (Liao et al, 2015). Τα οιστρογόνα είναι σημαντικά αντι-αποπτωτικά σήματα για πολλούς κυτταρικούς τύπους, όπως καρκινικά κύτταρα μαστού, ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και κύτταρα εγκεφάλου. Ωστόσο, η άμεση

εμπλοκή των μιτοχονδριακών υποδοχέων οιστρογόνων σε αποπτωτικές διαδικασίες, είναι μια ανακάλυψη που χρήζει περεταίρω έρευνας (Psarra & Sekeris, 2008).

Ο ERα είναι το κύριο μόριο που εμπλέκεται στους σχετιζόμενους με τα οιστρογόνα καρκίνους, επειδή τα επίπεδά του σχετίζονται με την πρόοδο των ασθενών που υπόκεινται σε θεραπεία με ανταγωνιστές των οιστρογόνων. Μελέτες παρουσιάζουν τον ERβ να έχει κυρίως αντιπολλαπλασιαστική δράση, ενώ μειωμένα επίπεδα αυτού έχουν σημειωθεί στη διαδικασία καρκινογένεσης του προστάτη και του μαστού στον άνθρωπο (Zhao et al, 2007). Γενικά, τα αποτελέσματα είναι διφορούμενα και διαφοροποιούνται από ιστό σε ιστό. Ο ERβ φαίνεται να ασκεί την καρκινογενετική του δράση επεμβαίνοντας στη μιτοχονδριακή λειτουργία. Με τον τρόπο αυτό ικανοποιούνται οι ενεργειακές απαιτήσεις διαδικασιών, όπως ο πολλαπλασιασμός, η επιβίωση και ο μετασχηματισμός των κυττάρων (Liao et al, 2015).

1.7) ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ

Τις τελευταίες δεκαετίες, παρατηρείται ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για το ρόλο και τις πιθανές ωφέλιμες επιδράσεις των οιστρογόνων στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως το εγκεφαλικό επεισόδιο, η νόσος του Alzheimer και η ασθένεια Parkinson (Dhandapani et al, 2002). Τα οιστρογόνα, μέσω των υποδοχέων τους, ασκούν επιρροή στην ανάπτυξη και στην λειτουργία του νευρικού συστήματος. Τόσο ο ERα όσο και ο ERβ, φαίνεται να έχουν νευροπροστατευτική δράση. Η κατανομή τους αλλάζει στα διάφορα τμήματα του εγκεφάλου. Πιο συγκεκριμένα ο ERα εντοπίζεται στις περιοχές του εγκεφάλου που ελέγχουν την αναπαραγωγική λειτουργία σε αντίθεση με τον ERβ που απαντάται σε περιοχές που σχετίζονται με τη μνήμη, τη μάθηση, το στρες και την κατάθλιψη (Cui et al, 2013). Έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί για το πώς η 17β-οιστραδιόλη μπορεί να ασκήσει τη δράση της. Πρόκειται για : 1) τον γενωμικό μηχανισμό που μεσολαβείται από τον υποδοχέα οιστρογόνων (genomic ER-mediated), 2) τον μη γενωμικό μηχανισμό που περιλαμβάνει τη συμμετοχή των σηματοδοτικών μονοπατιών της MAPK ή/και της PI3K και 3) έναν μηχανισμό ανεξάρτητο από τον ER, που εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Οι πρώτοι δύο μηχανισμοί, παρατηρούνται σε χαμηλές φυσιολογικές δόσεις της E2. Αντίθετα, ο τρίτος μηχανισμός παρατηρείται μόνο σε υψηλές μη φυσιολογικές δόσεις της E2 (Dhandapani et al, 2002).

1) Γενωμικός μηχανισμός

Και οι δύο ERs εκφράζονται στον ενήλιο εγκέφαλο και είτε ο ένας είτε και οι δύο θα μπορούσαν να μεσολαβήσουν στη νευροπροστασία μέσω της E2. Για να διασαφηνιστεί ο επιμέρους υπότυπος ER που εμπλέκεται στην επαγόμενη από την E2 νευροπροστασία χρησιμοποιήθηκαν in vivo ειδικά μοντέλα ER knockout ποντικών, τα οποία περιλάμβαναν ERα knockout και ERβ knockout (bERKO) ποντικούς. Τα αποτελέσματα με αυτά τα διαγονιδιακά μοντέλα ζώων ήταν κάπως αντιφατικά. Παρατηρήθηκε ότι τα βERKO ποντίκια παρουσίασαν σημαντικές απώλειες των νευρώνων τους, υποδεικνύοντας ότι ο ERβ είναι απαραίτητος για τη νευρωνική επιβίωση (Dhandapani et al, 2002).

2) Μη γενωμικός μηχανισμός

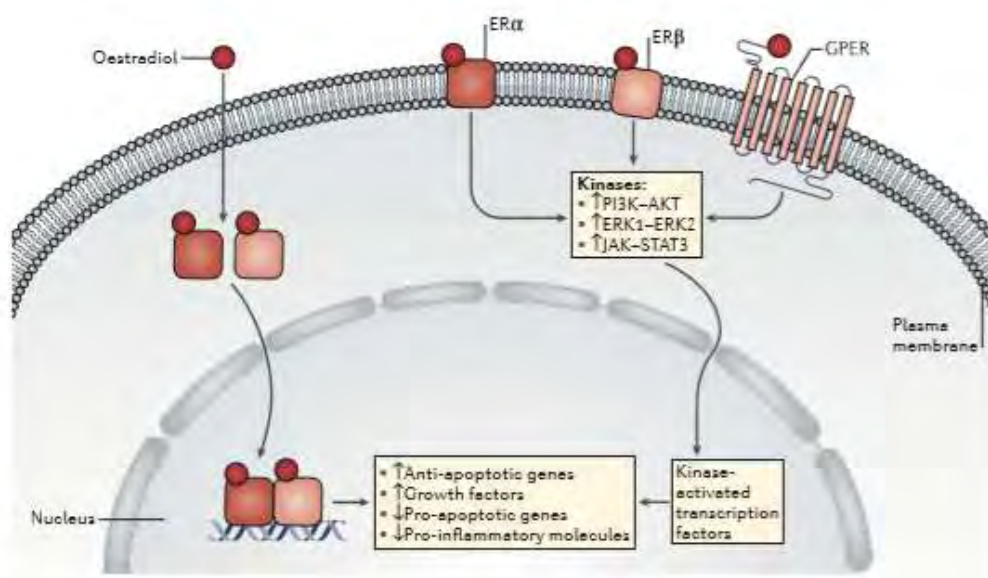
Υπάρχει ένα αυξανόμενο σύνολο στοιχείων που υποδηλώνουν ότι η ταχεία επαγωγή σηματοδοτικών οδών μπορεί να διαδραματίσει κρίσιμο ρόλο στις δράσεις της E2 στον εγκέφαλο. Ειδικά, δύο μονοπάτια σηματοδότησης, η οδός MAPK και η οδός PI3-K / πρωτεϊνική κινάση B (Akt) έχουν εμπλακεί σε δράσεις της E2 στον εγκέφαλο και στον νευρικό ιστό. Η PI3-K είναι ένα ένζυμο υπεύθυνο για τη φωσφορυλίωση - ενεργοποίηση της Akt (ή αλλιώς πρωτεϊνική κινάση B, Protein Kinase B, PKB), μιας κινάσης σερίνης που έχει εμπλακεί σε μια ποικιλία μοντέλων ως αντιαποπτωτικός παράγοντας. Η Akt φωσφορυλιώνει προαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως η Bad (Bcl-2 associated agonist of cell death) και η GSK3B (3-β κινάση της συνθάσης γλυκογόνου, Glycogen synthase kinase-3 beta), οδηγώντας στην αδρανοποίησή τους. Σε μελέτες σε νευρώνες αρουραίου, η PI3-K ενεργοποιήθηκε ταχέως μετά από θεραπεία με χαμηλές δόσεις E2, ενώ η φωσφορυλίωση της Akt, αυξήθηκε 15 λεπτά μετά την προσθήκη της E2 ([Dhandapani et al, 2002](#)).

Ο ERα και ο ERβ ενεργοποιούν παράλληλους νευροπροστατευτικούς μηχανισμούς στον εγκέφαλο. Επάγουν την ενεργοποίηση των ERK1-ERK2 (extracellular signal-regulated kinases) (επίσης γνωστού ως MAPK3-MAPK1 μονοπατιού) και PI3K νευροπροστατευτικών σηματοδοτικών μονοπατιών, ενώ αναστέλλουν τη σηματοδότηση της προαποπτωτικής Jun αμινοτελικής κινάσης (c-Jun N-terminal kinase, JNK). Μελέτες σε πρωτογενείς φλοιώδεις νευρώνες έδειξαν ότι η οιστραδιόλη ενεργοποιεί τις ERK1-ERK2 και PI3K νευροπροστατευτικές οδούς παράλληλα στους ίδιους νευρώνες. Στον εγκέφαλο, η οιστραδιόλη αυξάνει την έκφραση των αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2, όπως η Bcl-2, η Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large) και η Bcl-W (ή αλλιώς Bcl2L2 , Bcl-2-like protein 2) και μειώνει την έκφραση των προ-αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2, όπως η Bad, που εξαρτάται από την Bcl-2, και ο μεσολαβητής κυτταρικού θανάτου BIM (Bcl-2 interacting mediator of cell death), που αλληλεπιδρά με την Bcl-2. Τόσο ο ERα όσο και ο ERβ μεσολαβούν στην επαγόμενη από οιστραδιόλη αύξηση της έκφρασης της Bcl-2 στους νευρώνες του ιπποκάμπτου. Η ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης ERK1-ERK2 ή PI3K από τους ERs έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση της Bad και την αυξημένη έκφραση της Bcl-2. Επιπλέον, η ενεργοποίηση των ERs επάγει τη μεταγραφή του αντιαποπτωτικού γονιδίου survivin, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), με τη βοήθεια του οποίου η ορμόνη δρα νευροπροστατευτικά στην εγκεφαλική ισχαιμία ([Arevalo et al, 2014](#)).

3) Αντιοξειδωτικός μηχανισμός

Ορισμένες επιπλέον μελέτες υποδεικνύουν ότι η 17β-οιστραδιόλη όταν χορηγείται σε φαρμακολογικές συγκεντρώσεις μπορεί να δράσει ως αντιοξειδωτικό. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της E2 είναι πιθανό να μεσολαβείται από τον φαινολικό δακτύλιο A του στεροειδούς, ο οποίος είναι ένας ισχυρός δότης ηλεκτρονίων και καταστρέφει τις ελεύθερες ρίζες. Με τον τρόπο αυτό αποτρέπεται η επαγόμενη από υπεροξείδωση των λιπιδίων μεμβρανική βλάβη ([Dhandapani et al. 2002](#)).

Συμπερασματικά τα οιστρογόνα αυξάνουν τους αντιαποπτωτικούς παράγοντες σε σχέση με τους προαποπτωτικούς. Γενικά, σαν σύνολο τα υπάρχοντα δεδομένα προτείνουν νευροπροστατευτική δράση και για τους δύο υποδοχείς στον εγκέφαλο, χωρίς κάποιον ακριβή μηχανισμό. Επίσης, δεν είναι ξεκάθαρη η δράση τους, αλλά φαίνεται ο ERα να απαιτείται για την προστασία τραυματισμένων ιστών, ενώ ο ERβ για την επιβίωση των νευρώνων κατά τη διάρκεια της ζωής (Dhandapani et al, 2002).



Εικόνα 9: Νευροπροστατευτική σηματοδότηση επαγόμενη από τους υποδοχείς οιστρογόνων. Η οιστραδιόλη ενισχύει την έκφραση των αντιαποπτωτικών γονιδίων και αυξητικών παραγόντων και καταστέλλει την έκφραση των προαποπτωτικών προφλεγμονωδών μορίων στον εγκέφαλο. Δρα μέσω δύο μηχανισμών: 1) δεσμεύεται στους ενδοκυτταρικούς ERα και ERβ και ρυθμίζει τη μεταγραφή και 2) δεσμεύεται σε μεμβρανικούς υποδοχείς (ERα, ERβ και GPER) και ενεργοποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια PI3K (phosphoinositide 3-kinase) -AKT, ERK1 (extracellular signal-regulated kinase 1) -ERK2 και JAK (Janus kinase) - STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) (Arevalo et al, 2015).

1.8) ΣΚΟΠΟΣ

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες έρευνες πραγματοποιούνται προκειμένου να γίνουν γνωστά περισσότερα στοιχεία του ρόλου και της γενικότερης δράσης της β μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων (ERβ) και ειδικότερα της δράσης του στο μιτοχόνδριο. Έτσι έγινε προσπάθεια από την ομάδα του εργαστηρίου μας, ώστε να συμβάλλουμε και εμείς με τον δικό μας τρόπο στον ευρύτερο αυτό σκοπό. Δημιουργήθηκε, λοιπόν, από τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Τσιάλτα Ιωάννη στα πλαίσια της διδακτορικής του διατριβής μία σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά Neuro-2a (N2A). Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε η κυτταρική σειρά N2AmtGFPERβ, η οποία υπερεκφράζει σταθερά τον ERβ, ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescence protein, GFP), με μιτοχονδριακή (mitochondrial, mt) στόχευση. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η

εύρεση αποτελεσματικών και εξειδικευμένων αντισωμάτων για το χαρακτηρισμό της σταθερά διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ.

2) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYSTM	Συσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot	Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad miniPROTEAN® tetra cell	Μηχάνημα PCR: eppendorf mastercycler gradient	Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak
Φυγόκεντρος Helme Z36HK	Heat blocker: KISKER	Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: Entrofriger- BLII/ PS Selecta®	Vortex: Bio Vortex V1	Ζυγοί: KERN EW + KERN 440-47 N
Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S	Quick spin: Nippon Genetics Europe GmbH	Αναδευτήρας: Heidolph Rotamax	Μηχάνημα εμφάνισης W.B. και gel: FluoChemE/ ProteinSimple	Πιπέτες: Air displacement pipettes όγκων 0,1-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1.000 µl

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας των οργάνων που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2) ΥΛΙΚΑ

2.2.1) ΧΗΜΙΚΑ

Ουσία	Εταιρεία	Ουσία	Εταιρεία
Acrylamide/Bis acrylamide 40%	Bio-Rad	Paregular TM Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific Fermentas
Agarose	Sigma	PMSF	Serva
APS	Sigma	SDS	Sigma
Bradford protein assay	Bio-Rad	Skimmed milk powder	Regilait

EDTA	Serva	TEMED	Applichem
DTT	Serva	Triton X-100	Applichem
Developer	Carestream	Tris	Serva
ECL A + ECL B	Santa Cruz	Tween 20	Sigma
Fixer	Carestream	Βιοιθανόλη	Kalochem
Glycine	Serva	β-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel-de Haën
L-Glutamine	Invitrogen	Γλυκερόλη	Applichem
NaOH	Merck	Ισοπροπανόλη	Sigma
Midori Green	Nippon Genetics	Μείγμα αναστολέων πρωτεασών	Sigma
Na ₂ HPO ₄	Merck	Μεθανόλη	Chemlab
NaCl	Panreac	HCl	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck	Κυανούν της βρωμοφαινόλης	Research Organics

Πίνακας 2: Στην πρώτη και τρίτη στήλη παρουσιάζονται τα χημικά υλικά, ενώ στη δεύτερη και στην τέταρτη οι εταιρείες απ' όπου προμηθεύτηκαν.

2.2.2) ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

PMSF 200mM: Με αραιώση 10 % σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20 mM.	Lysis Buffer: 20 mM Tris pH 7.5, 0.5 % Triton X-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA. Αποθήκευση στους 4 °C. Πριν τη χρήση του γίνεται προσθήκη 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF και κατάλληλη ποσότητα μείγματος αναστολέων πρωτεασών.
Διάλυμα Bradford: Stock 5x. Χρήση σε Cτελ 1x, αραιωμένο σε ddH ₂ O. Αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford, 1:1000	Sample Buffer 4x: 1 M Tris pH 6.8, 10 % γλυκερόλη, 10 % SDS, 5 % β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 % κυανούν της βρωμοφαινόλης. Αποθήκευση στους -20 °C
Tris 20 mM pH 7.5: Αραίωση stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 (4°C) σε ddH ₂ O. Αποθήκευση σε RT	Tris-HCl 1.5M pH 8.8: Διάλυση κατάλληλης ποσότητας Tris σε dH ₂ O. Ρύθμιση pH στο 8.8 με προσθήκη HCl 12 N. Αποθήκευση στους 4 °C
TEMED: Χρήση χωρίς αραιώση. Αποθήκευση στους 4 °C.	Υπερθειικό αμμώνιο (APS): Παρασκευή διαλύματος συγκέντρωσης 10% w/v με χρήση ως διαλύτη ddH ₂ O. Αποθήκευση στους -20 °C.
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10x: 10 % Running Buffer 10x, 20 % MeOH και 0.05 % SDS. Συμπλήρωση όγκου με dH ₂ O. Αποθήκευση στους 4 °C.	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10x: 91 mM Na ₂ HPO ₄ , 17 mM NaH ₂ PO ₄ και 1500 mM NaCl. Αποθήκευση σε R.T
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x : 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS διαλυμένα σε ddH ₂ O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος. Διατήρηση σε RT	Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x : Παρασκευή διαλύματος σε συγκέντρωση 10% v/v από RB 10x και χρήση dH ₂ O ως διαλύτη. Προσθήκη SDS σε αναλογία 0.1 %. Αποθήκευση σε RT

Ρυθμιστικό διάλυμα PBST 1*: Αραίωση του stock buffer PBSX10 σε dH₂O ή ddH₂O. Προσθήκη Tween-20 σε αναλογία 1% . Διατήρηση σε RT.

Διαλύματα για εμφάνιση σήματος : Χρήση δύο εμπορικών σκευασμάτων της Kodak, ένα διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Παρασκευή με ανάμειξη 1 : 3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε dH₂O

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2.3) ANTISΩΜΑΤΑ

Αντίσωμα έναντι	Εταιρεία	Ζώο Προέλευσης	Αναγνώριση Επιτόπων
ERα (C-311)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
ERα (D-12)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
ERα (F-10)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
ERβ (B-1)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
ERβ (B-3)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
ERβ (1531)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
ERβ (H150)	Santa Cruz	Κόνικλο	Μονοκλωνικό
ERβ (MCA)	Serotec	Επίμυς	Μονοκλωνικό
GFP	Roche	Επίμυς	Μονοκλωνικό
b-actin	Sigma	Επίμυς	Μονοκλωνικό
PGC-1α (4A8)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
PGC-1β (E9)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
PGC-1β (6C3F6)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
mtTFA (F-6)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
mtTFA (C-9)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
Tom70 (A-8)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
Cas9 (96.123)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
CytC (A8)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
NQ01 (A180)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
GAPDH (G-9)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό

Lamin A/C (E1)	Santa Cruz	Επίμυς	Μονοκλωνικό
----------------	------------	--------	-------------

Πίνακας 4: Παρουσίαση των πρωτογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην Western Blot. Τα αντισώματα ήταν διαλυμένα σε PBST 1x, γάλα 2% w/v και αποθηκευμένα στους -20 °C.

Ως δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι mouse IgG-HRP της εταιρίας Pierce Antibodies.

2.2.4) ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Αναλώσιμα	Εταιρεία
Πιπέττες ορολογικές -Serological (2, 5, και 10 mL)	Sarstedt
Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 mL, 50 mL)	Sarstedt
Πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorfs (1.5 mL, 2.0 mL)	Sarstedt
Ρύγχοι (0.2-10 µL, 20-200 µL και 100-1000 µL)	Sarstedt
Γυάλινα σιφώνια	Kimble
Χαρτιά Whatman	Sigma
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,2µm και 0,45µm	Amersham™ Protran™
Φωτογραφικά φιλμ ανίχνευσης σήματος σε μεμβράνη κατά τη διαδικασία western blot	FUJI MEDICAL

Πίνακας 5: Παρουσίαση όλων των αναλώσιμων που χρησιμοποιήθηκαν.

2.2.5) ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα από διάφορες κυτταρικές σειρές. Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένες πληροφορίες για αυτές τις κυτταρικές σειρές που συλλέχθηκαν από την ιστοσελίδα : <http://www.lgcstandards-atcc.org>.

1) MCF-7

Οργανισμός	Homo sapiens, άνθρωπος
------------	------------------------

Τύπος Κυττάρου	Επιθηλιακό
Ιστός	Μαστικός Αδένας , Στήθος (προέρχονται από μεταστατική θέση)
Ασθένεια	Αδενοκαρκίνωμα
Μορφή Προϊόντος	Παγωμένο

II) SH-SY5Y

Οργανισμός	Homo sapiens, άνθρωπος
Τύπος Κυττάρου	Επιθηλιακό
Ιστός	Μυελός των οστών
Ασθένεια	Νευροβλάστωμα
Μορφή Προϊόντος	Παγωμένο

III) Neuro-2a (N2A)

Οργανισμός	Mus musculus, ποντίκι
Τύπος Κυττάρου	Νευροβλαστικό
Ιστός	Εγκέφαλος
Ασθένεια	Νευροβλάστωμα
Μορφή Προϊόντος	Παγωμένο

IV) MDA-MB231

Οργανισμός	Homo sapiens, άνθρωπος
Τύπος Κυττάρου	Επιθηλιακό
Ιστός	Μαστικός Αδένας ,Στήθος (προέρχονται από μεταστατική θέση)
Ασθένεια	Αδενοκαρκίνωμα
Μορφή Προϊόντος	Παγωμένο

V) HEK 293

Όργανισμός	Homo sapiens, άνθρωπος
Τύπος Κυττάρου	Εμβρυονικό
Ιστός	Εμβρυονικός Νεφρός
Μορφή Προϊόντος	Παγωμένο

Επιπλέον, στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε για πειράματα η σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά N2AmtGFPERβ που υπερεκφράζει σταθερά τον ERβ, ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescence protein, GFP), με μιτοχονδριακή (mitochondrial, mt) στόχευση.

2.3) ΤΕΧΝΙΚΕΣ

2.3.1.) ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Αρχικά γίνεται λύση του ιζήματος των κυττάρων με την προσθήκη κατάλληλου διαλύματος λύσης κυττάρων (Lysis Buffer). Ο όγκος του διαλύματος που προστίθεται κάθε φορά εξαρτάται από την ποσότητα του εκάστοτε κυτταρικού ιζήματος (35-70 μl). Στη συνέχεια ακολουθεί ήπια ανάδευση και 20-25 λεπτά επώαση στον πάγο.

2.3.2.) ΛΥΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (SONICATION)

Έπειτα ακολουθεί η διαδικασία του sonication με την οποία επιτυγχάνεται κατακερματισμός του DNA και αποτελεσματικότερη λύση των κυττάρων. Στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται συσκευή υπερήχων (Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S). Ανάλογα με την κυτταρική σειρά η τεχνική τροποποιείται αν και συνήθως τα κύτταρα εκτίθενται στους υπερήχους για 4-5 κύκλους. Ο κάθε κύκλος διαρκεί για 1 δευτερόλεπτο και απέχει από τον προηγούμενο 35 δευτερόλεπτα.

2.3.3.) ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται μέτρηση του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινες συνθήκες μετατρέπεται από καφέ-κόκκινη σε μπλε. Η χρωστική αυτή προσδένεται με τις πρωτεΐνες και ειδικότερα στα κατάλοιπα λυσίνης που περιέχονται στο εκάστοτε διάλυμα που εξετάζεται. Αυτή η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα 595nm. Το αντιδραστήριο Bradford του εργαστηρίου είναι σε συγκέντρωση 1X. Μετά την προσθήκη του σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες τύπου erpendorf, όπου έχει ήδη προστεθεί το δείγμα σε συγκέντρωση 1/1000, ακολουθεί vortex και επώαση των δειγμάτων για 20 λεπτά στο

σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT). Μετά την πάροδο αυτού του χρόνου τα δείγματα αποσύρονται από το χώρο όπου επωάζονταν και φωτομετρούνται στα 595 nm. Το φωτόμετρο μηδενίζεται με το τυφλό, το οποίο περιέχει μόνο lysis. Η ποσότητα του lysis που προστίθεται είναι ίση με την ποσότητα του δείγματος που προστέθηκε στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος υπολογίζεται από την εξίσωση που προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA που έγινε στο εργαστήριο. Η ακριβής σύσταση των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση προκύπτει από την ανάλυση των δεδομένων με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος excel.

2.3.4.) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών, γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος, με ηλεκτροφόρηση σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS). Αρχικά, οι πρωτεΐνες τοποθετούνται στο πήκτωμα συμπύκνωσης (stacking) που έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο. Ο διαχωρισμός τους πραγματοποιείται, όταν περάσουν σε πήκτωμα διαχωρισμού (separating) που έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο. Το πήκτωμα συμπύκνωσης περιέχει 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS και 4% (w/v) ακρυλαμίδιο. Το πήκτωμα διαχωρισμού περιέχει 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS και 7.5, 10 ή 12 % (w/v) ακρυλαμίδιο. Ο πολυμερισμός των πηκτωμάτων πραγματοποιείται με προσθήκη 1% (w/v) APS και 0,04% (v/v) TEMED ως καταλύτη πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου.

Η ακρυλαμίδη πολυμερίζεται με τη βοήθεια του APS που δρα ως ένζυμο. Η ακρυλαμίδη και το TEMED είναι φωτοευαίσθητα, ενώ το APS είναι θερμοευαίσθητο. Η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θέλουμε να μελετήσουμε. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση της ακρυλαμίδης επιτυγχάνεται διαχωρισμός πρωτεϊνών μικρότερου μοριακού βάρους, ενώ οι πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους διαχωρίζονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις ακρυλαμίδης.

Τα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν περιέχουν : α) Tris-HCl pH=7.5, β) Sample Buffer 4X και γ) κυτταρικό εκχύλισμα (cell extract). Επειδή ο τελικός όγκος του κάθε δείγματος που φορτώνεται στα πηγαδάκια του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου ισούται με 20μl ανά ηλεκτροφόρηση και είναι επιθυμητή η ισοφόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια της πηκτής για τη σωστή αξιολόγηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης κάθε δείγματος, υπολογίζεται η συγκέντρωση των δειγμάτων και η απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος αυτών, ώστε να ηλεκτροφορηθούν 30-50 μg πρωτεΐνης ανά διαδρομή ηλεκτροφόρησης. Ο υπολογισμός αυτός προκύπτει με βάση την πρότυπη καμπύλη από τη μέθοδο Bradford. Σε όλα τα δείγματα προστίθεται τελευταίο το sample buffer, ενώ συνεχώς κατά την παρασκευή τους τα δείγματα βρίσκονται στον πάγο. Το sample buffer περιέχει β-μερκαπτοαιθανόλη και SDS. Τα «έτοιμα» προς ηλεκτροφόρηση δείγματα τοποθετούνται στο heat block και θερμαίνονται στους 95 °C για 5 λεπτά. Κατά τη φάση αυτή το SDS καταργεί τις ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών, ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη επιφέρει την αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών και την κατάρρευση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών.

Επιπλέον, το SDS προσθέτει αρνητικό φορτίο στις πρωτεΐνες προκειμένου αυτές να κινηθούν σύμφωνα με τη διαβάθμιση του δυναμικού κατά την ηλεκτροφόρηση. Μετά τη θέρμανση ακολουθεί φυγοκέντρηση στιγμιαία σε V_{max} (spin). Παράλληλα με τα δείγματα αναλύεται και ένα μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (protein marker), που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες μοριακών μεγεθών. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή ένταση ηλεκτρικού ρεύματος στα 0,02 A, σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών που περιέχει 0,1 % (w/v) SDS (Running buffer x1).

2.3.5.) ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (WESTERN BLOT)

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western είναι μία αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί κατά την ηλεκτροφόρηση από το πήκτωμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ώστε να ανιχνευθούν με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα.

A) Εξισορρόπηση και μεταφορά πρωτεϊνών

Συγκεκριμένα μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί η εξισορρόπηση με εμπότιση του πήκτωματος πολυακρυλαμιδίου στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς που περιέχει SDS και μεθανόλη. Το SDS αυξάνει την ικανότητα μεταφοράς, αλλά μειώνει την πρόσδεση των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη, ενώ η μεθανόλη αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη. Στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς οι πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο και μετακινούνται μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο προς το θετικό πόλο. Ταυτόχρονα με την εμπότιση του πήκτωματος πολυακρυλαμιδίου εμβαπτίζονται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, τα σφουγγαράκια και τα χαρτιά whatman για 15 λεπτά. Το μέγεθος των σφουγγαριών είναι μεταξύ τους ίδιο και προκαθορισμένο, ενώ το μέγεθος της μεμβράνης και των χαρτιών whatman είναι λίγο μεγαλύτερο από την πήκτση. Έπειτα, στη μαύρη πλευρά της κασετίνας, όπου εφαρμόζεται ο αρνητικός πόλος του τροφοδοτικού δημιουργείται η δομή «sandwich» : ένα σφουγγαράκι, δύο απορροφητικά χαρτιά whatman, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, δύο απορροφητικά χαρτιά whatman και ένα σφουγγαράκι. Η δομή κλείνει με την άσπρη πλευρά της κασετίνας, όπου εφαρμόζεται ο θετικός πόλος του τροφοδοτικού. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται για την προσεκτική αφαίρεση των φυσαλίδων κατά την δημιουργία της δομής αυτής. Η μεταφορά των πρωτεϊνών απαιτεί τάση ίση με 0.35 A για 70 λεπτά. Επιπρόσθετα, είναι σημαντικό η συσκευή να περιβάλλεται εξωτερικά από πάγο ή παγοκύστες, καθώς σε αντίθετη περίπτωση είναι πιθανό να καταστραφεί η πρωτοταγής δομή των πρωτεϊνών, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται. Το εσωτερικό της συσκευής καλύπτεται από το διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτρομεταφοράς η μεμβράνη τοποθετείται σε PBSTx1 και σημειώνεται με μολύβι η «καλή» πλευρά της μεμβράνης, όπου έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες, καθώς και ο δείκτης γνωστού μοριακού βάρους.

B) Blocking

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα PBSTx1 με 10% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα (3%-5% non-fat dry milk, NFDM), υπό ανάδευση σε RT για 1 ώρα. Ο σκοπός της διαδικασίας του blocking είναι η κάλυψη των μη ειδικών θέσεων από τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Έτσι, μειώνεται η πιθανότητα εμφάνισης ψευδούς αποτελέσματος, λόγω σύνδεσης του αντισώματος σε μη ειδικές θέσεις.

Γ) Επώαση με πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα

Έπειτα απομακρύνεται το διάλυμα με το γάλα πραγματοποιείται μία πλύση της μεμβράνης με PBSTx1 και επώασή της με το πρωτογενές αντίσωμα. Η μεμβράνη επάζεται στο cold room στους 4 °c υπό ανάδευση καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι αραιωμένο σε διάλυμα PBSTx1 με 2% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα. Η αραιώση του πρωτογενούς αντισώματος καθορίζεται συνήθως από την εταιρεία παραγωγής. Την επόμενη μέρα απομακρύνεται το πρωτογενές αντίσωμα και πραγματοποιούνται πέντε πλύσεις με PBSTx1 υπό ανάδευση σε RT. Η διάρκεια αυτών των πλύσεων είναι πέντε λεπτά. Μέσω αυτών των πλύσεων απομακρύνεται η περίσσεια του αντισώματος προκειμένου να μένει στη μεμβράνη μόνο όσο αντίσωμα έχει δέσει ειδικά, δηλαδή στους συγκεκριμένους επιτόπους.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης υπό ανάδευση για περίπου μία ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα. 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 προσδεμένο με κατάλληλο προσδέτη horseradish peroxidase (HRP, υπεροξειδάση της ραπανίδος), που επιτρέπει την ανίχνευσή του. Το αντίσωμα αυτό είναι αραιωμένο σε διάλυμα PBSTx1 με 2% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα, ενώ η συνήθης αραιώσή του είναι 1/50.000. Μετά την μία ώρα της επώασης, το δευτερογενές αντίσωμα αφαιρείται και πραγματοποιούνται τρεις πλύσεις με PBSTx1. Οι δύο πρώτες πλύσεις είναι πεντάλεπτες, ενώ η τρίτη οκτάλεπτη.

Δ) Εμφάνιση σήματος

Για δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με HRP, η ανίχνευση γίνεται με το σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence) που βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Η χημειοφωταύγεια είναι η εκπομπή φωτός ως αποτέλεσμα της έκλυσης ενέργειας από ένα διεγερμένο υπόστρωμα. Το φως ανιχνεύεται ύστερα από σύντομη έκθεση με τη χρήση φιλμ αυτοραδιογραφίας. Ο χρόνος που απαιτείται για τη λήψη του σήματος είναι σύντομος, ενώ το σήμα εμφανίζεται ως σκουρόχρωμες μπάντες που αντιστοιχούν στις ζώνες της υπό εξέταση πρωτεΐνης που αντέδρασε με το αντίσωμα.

Πρακτικά μετά την ολοκλήρωση των πλύσεων η μεμβράνη τοποθετείται σε γυάλινη επιφάνεια όπου επάζεται για 3 λεπτά στο σκοτάδι σε RT με μείγμα αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας ECL A και ECL B, σε ίσους όγκους μεταξύ τους. Ύστερα η μεμβράνη τοποθετείται στην ειδική κασετίνα έκθεσης και μεταφέρεται στο σκοτεινό θάλαμο (darkroom), όπου πάνω της εφαρμόζεται ένα X-ray φιλμ. Η κασετίνα κλείνει και το φιλμ παραμένει ανάλογα με την περίπτωση για χρόνους έκθεσης από 10 δευτερόλεπτα έως 40 λεπτά. Στη συνέχεια, μετά το πέρας του κατάλληλου χρόνου το φιλμ αφαιρείται από την κασετίνα και μεταφέρεται σε διάλυμα εμφανιστή (Developer) για ένα λεπτό υπό ανακίνηση. Ακολουθώντας, ξεπλένεται με νερό και τοποθετείται σε

διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) ξανά υπό ανακίνηση για ένα λεπτό. Μετά το Fixer το φιλμ ξεπλένεται και πάλι με νερό. Τέλος, το φιλμ αφήνεται να στεγνώσει.

2.3.6) ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν απαραίτητη η υπολογιστική επεξεργασία. Ειδικότερα, το Microsoft Office Excel χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ποσότητας των πρωτεϊνών (με τη μέθοδο Bradford) και για τον υπολογισμό της σύστασης των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Image J για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανασοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western Blot). Τέλος, έγινε χρήση του Adobe Photoshop CS για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανασοαποτύπωσης κατά Western.

3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1) ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΑΛΦΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΒΗΤΑ ΜΟΡΦΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ER α ΚΑΙ ER β ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΑ)

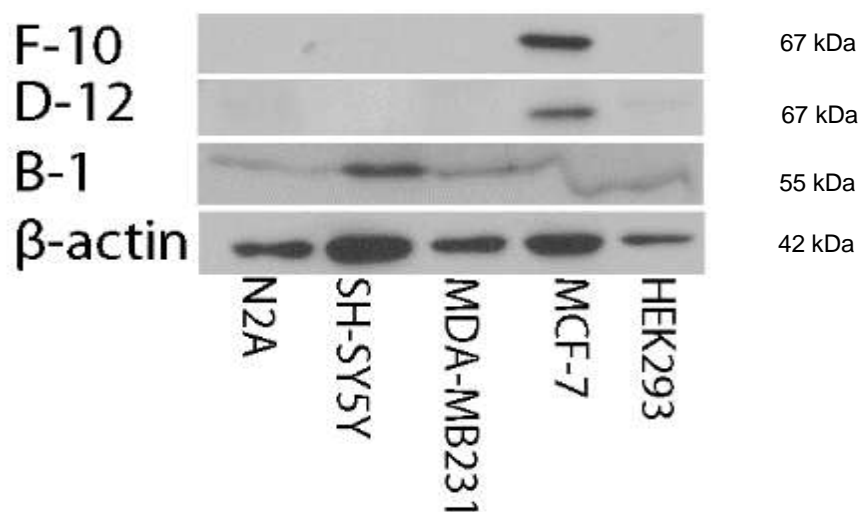
Προκειμένου να ελεγχθεί η δραστικότητα των διαθέσιμων στο εργαστήριό μας αντισωμάτων καθώς και των νέων αντισωμάτων που προμηθευτήκαμε από την εταιρεία Santa Cruz Biotechnology, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της μεθόδου Western Blot. Χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα από τις Neuro-2a, SH-SY5Y, MDA-MB231, MCF-7, HEK293 κυτταρικές σειρές και καθαρή απομονωμένη πρωτεΐνη του ER β . Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα:

Έναντι του ER β :

- MCA, που υπήρχε στο εργαστήριό μας
- H-150, που υπήρχε στο εργαστήριό μας
- B-1 (SC-390243), που προμηθεύτηκε από τη SantaCruz
- B-3 (SC-373853), που προμηθεύτηκε από τη SantaCruz
- 1531 (SC-53494), που προμηθεύτηκε από τη SantaCruz

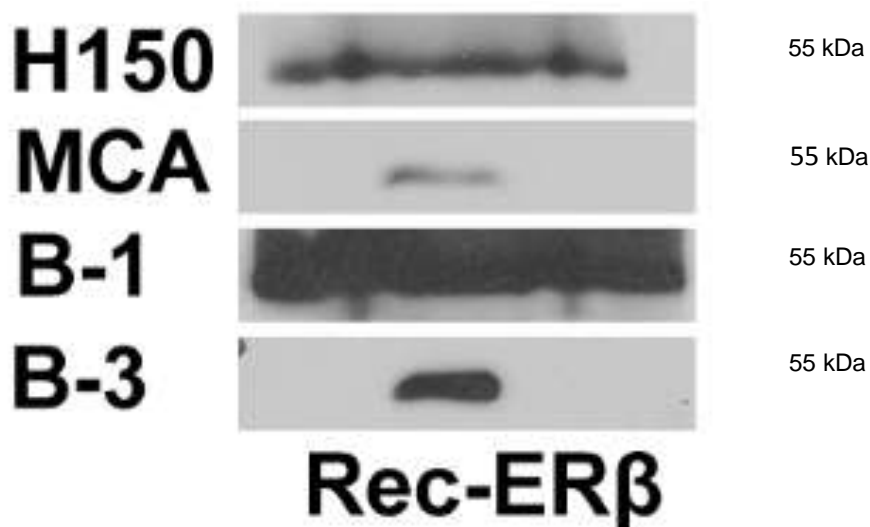
Έναντι του ER α :

- C-311 (SC-787), που προμηθεύτηκε από τη SantaCruz
- F-10 (SC-8002), που προμηθεύτηκε από τη SantaCruz
- D-12 (SC-8005), που προμηθεύτηκε από τη SantaCruz



Εικόνα 11: Κυτταρικά εκχυλίσματα από Neuro-2a, SH-SY5Y, MDA-MB231, MCF-7, HEK293 ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Έπειτα μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,45 μm και μελετήθηκαν ως προς την ύπαρξη ERα, ERβ και β-ακτίνης. Η μεμβράνη επώαστηκε με τα πρωτογενή αντισώματα C-311, D-12, F-10 έναντι του ERα και B-1 και 1531 έναντι του ERβ.

Τα δεδομένα της εικόνας 11 καταδεικνύουν ότι μόνο τα τρία από τα πέντε νέα αντισώματα της εταιρείας Santa Cruz είναι αποτελεσματικά ως προς την ανίχνευση των δύο υποτύπων του υποδοχέα οιστρογόνων. Στη κυτταρική σειρά MCF-7, θετική στον ERα, παρατηρούνται τα ειδικά σήματα κατά την επώαση με τα αντισώματα F-10 και D-12. Αντίστοιχα, όσο αφορά τον έλεγχο αντισωμάτων έναντι του ERβ, εντοπίζονται πρωτεϊνικά επίπεδα στην θετική στον ERβ κυτταρική σειρά SH-SY5Y κατά την επώαση με το αντίσωμα B-1. Ωστόσο, ανιχνεύσιμα επίπεδα του ERβ παρατηρούνται σε όλες τις κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 12: Απομονωμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ERβ ηλεκτροφορήθηκε σε 10% SDS πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, σε τέσσερις διαφορετικές διαδρομές. Έπειτα μεταφέρθηκε σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης 0,45 μm και η μεμβράνη μελετήθηκε ως προς την ύπαρξη του ERβ, με χρήση διαφορετικών αντισωμάτων. Η μεμβράνη επώαστηκε και με τα τέσσερα διαθέσιμα αντισώματα έναντι του ERβ. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτογενή αντισώματα MCA, H150, B-1 και B-3.

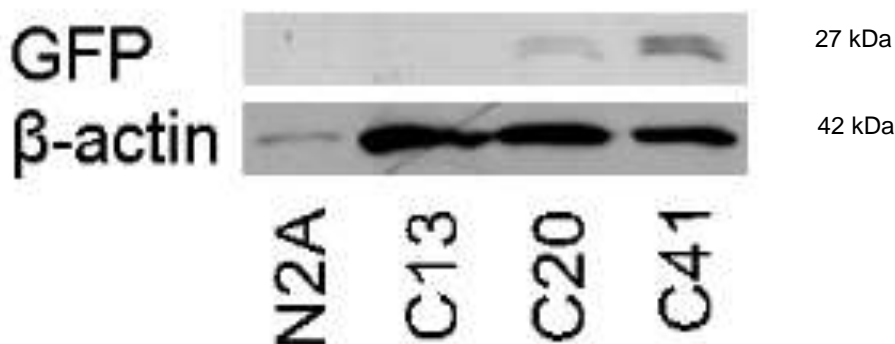
Με βάση τα δεδομένα της παραπάνω εικόνας παρατηρούμε ότι ανιχνεύονται πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ στα 55 kDa κατά την επώαση και με τα τέσσερα πρωτογενή αντισώματα. Συνεπώς, όλα τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη περίπτωση λειτουργούν αποτελεσματικά ως προς την ανίχνευση του ERβ.

3.2) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ N2AmtGFPERβ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΗ ΑΠΟΠΕΙΡΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ

Από τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Τσιάλτα Ιωάννη έγιναν δύο απόπειρες ως προς την δημιουργία κυτταρικής σειράς η οποία θα υπερεκφράζει σταθερά τον ERβ, ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescence protein, GFP), με μιτοχονδριακή (mitochondrial, mt) στόχευση. Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Neuro-2a, νευροβλάστωμα ποντικού, και παρασκευάστηκε η κυτταρική σειρά Neuro-2amtGFPERβ. Ακολουθούν τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία ως προς των χαρακτηρισμό των αποικιών που συλλέχθηκαν.

3.2.1) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΥΒΡΙΔΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GFPERβ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ GFP

Πραγματοποιήθηκε δοκιμαστική ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις αποικίες της πρώτης απόπειρας σχηματισμού σταθερής κυτταρικής σειράς, ενώ η κυτταρική σειρά Neuro-2a αγρίου τύπου χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας.

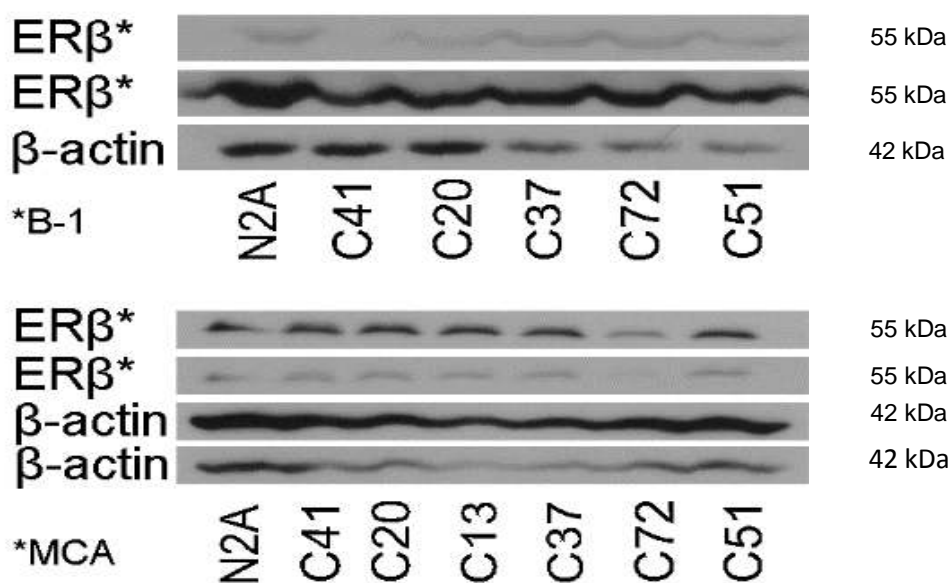


Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση σε 10% SDS πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης 0.45μm. Χρήση κυτταρικών εκχυλισμάτων από τη Neuro-2a κυτταρική σειρά και τις αποικίες 13, 20 και 41 που συλλέχθηκαν από την πρώτη απόπειρα σχηματισμού της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. Τα παραπάνω δείγματα μελετήθηκαν ως προς την παρουσία GFP, GFPERβ και β-ακτίνης. Η μεμβράνη επώαστηκε με πρωτογενές αντίσωμα έναντι του GFP και έναντι της β-ακτίνης

Στην παραπάνω εικόνα εντοπίζονται πρωτεϊνικά επίπεδα του GFP στις αποικίες 20 και 41 που αντιστοιχούν σε μοριακό βάρος 27 kDa.

3.2.2) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΥΠΑΡΞΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΥΒΡΙΔΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GFPERβ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΕΡβ.

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε δοκιμαστική ανοσοαποτύπωση κατά Western με κυτταρικά εκχυλίσματα από τις αποικίες που συλλέχθηκαν κατά την πρώτη απόπειρα δημιουργίας της σταθερής κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. Χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από την κυτταρική σειρά Neuro-2a αγρίου τύπου ως μάρτυρας.



Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση σε 10% SDS πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης 0.45μm. Χρήση κυτταρικών εκχυλισμάτων από τη Neuro-2a κυτταρική σειρά και τις αποικίες 41, 20, 13, 37, 72, 51 που συλλέχθηκαν από την πρώτη απόπειρα σχηματισμού της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. Τα παραπάνω δείγματα μελετήθηκαν ως προς την παρουσία ενδογενούς ΕΡβ, GFPERβ και β-ακτίνης. Η μεμβράνη επώαστηκε με πρωτογενή αντισώματα έναντι του ΕΡβ (B-1, MCA) και με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης.

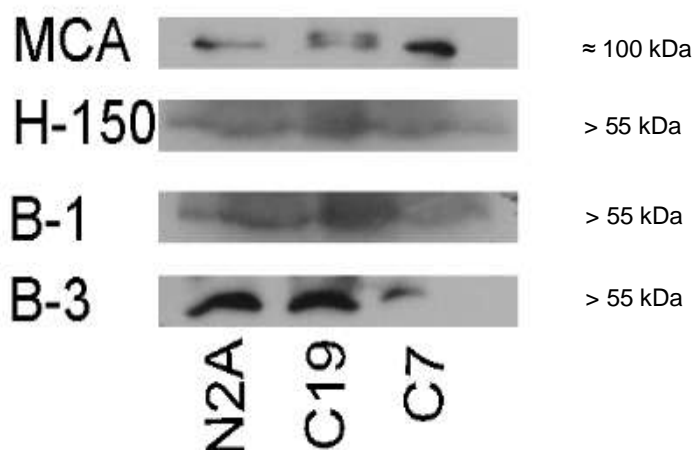
Στις παραπάνω εικόνες παρατηρείται ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ΕΡβ στα κυτταρικά εκχυλίσματα των αποικιών της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ είναι

σχεδόν ίσα με αυτά στα κύτταρα μάρτυρες. Αυτό οφείλεται στο ότι οι ζώνες που απεικονίζονται αντιστοιχούν στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ενδογενούς ERβ και όχι σ' αυτά της υβριδικής πρωτεΐνης GFPERβ.

3.3) ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ERβ ΓΙΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΥΒΡΙΔΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ GFPERβ, ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ N2AmtGFPERβ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΕΥΤΕΡΗ ΑΠΟΠΕΙΡΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ

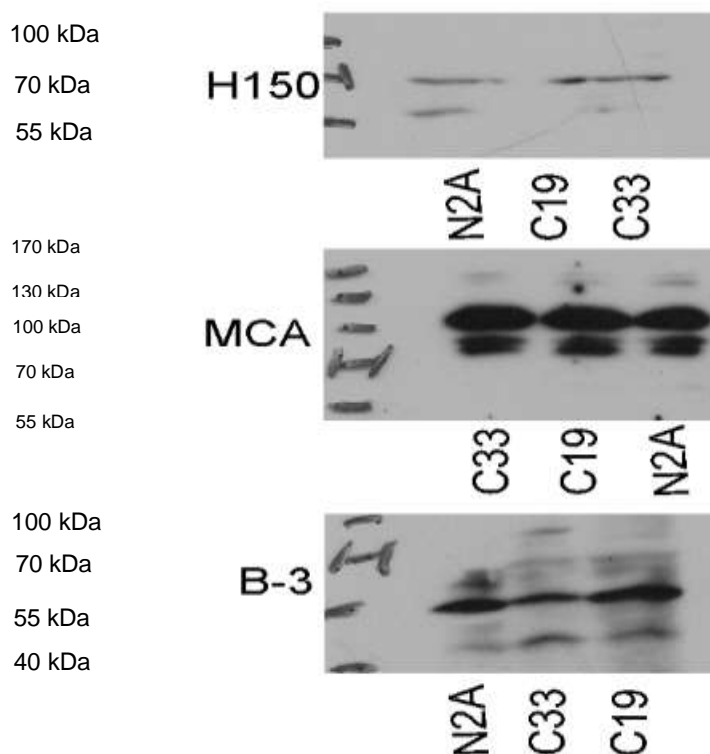
Λόγω του γεγονότος ότι κατά την πρώτη απόπειρα δεν ήταν δυνατή η εντόπιση ειδικού σήματος που να αντιστοιχεί στην υβριδική πρωτεΐνη GFPERβ, όπως αποδείχθηκε και από άλλα πειράματα της ερευνητικής μας ομάδας επιχειρήθηκε για δεύτερη φορά η κατασκευή της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. Ακολουθούν τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία για την εύρεση κατάλληλων αντισωμάτων έναντι ERβ που ανιχνεύουν και την υβριδική GFPERβ πρωτεΐνη, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν για τη μετέπειτα αξιολόγηση των νέων αποικιών, που συλλέχθηκαν.

Τα αντισώματα αξιολογήθηκαν με την εφαρμογή της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικά εκχυλίσματα των αποικιών της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ κατά την δεύτερη απόπειρα σχηματισμού της. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι θετικές ως προς την έκφραση της GFPERβ αποικίες C33 & C7 και η αρνητική ως προς την έκφραση της GFPERβ αποικία C19. Η κυτταρική σειρά Neuro-2a αγρίου τύπου χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Ο χαρακτηρισμός των παραπάνω αποικιών έγινε από μέλη της ερευνητικής μας ομάδα με μεθόδους μικροσκοπίας φθορισμού και ανοσοκυταροχημείας.



Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση σε 10% SDS πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης 0.45μm. Χρήση κυτταρικών εκχυλισμάτων από τη Neuro-2a κυτταρική σειρά και τις αποικίες 19, 7 που συλλέχθηκαν από την δεύτερη απόπειρα σχηματισμού της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. Τα παραπάνω δείγματα μελετήθηκαν ως προς την παρουσία ενδογενούς ERβ και GFPERβ. Η μεμβράνη επώαστηκε με πρωτογενή αντισώματα έναντι του ERβ (MCA, H150, B-1, B-3).

Τα δεδομένα της εικόνας 15 υποδεικνύουν ότι μέσω της χρήσης του MCA ανιχνεύονται μη ειδικά σήματα σε μοριακό βάρος κοντά στα 100 kDa. Αντίθετα, με το H-150, το B-1 και το B-3 παρατηρούνται ζώνες πρωτεϊνικών επιπέδων σε μοριακό βάρος λίγο υψηλότερο των 55 kDa σε όλα τα δείγματα. Πρόκειται και πάλι για ανίχνευση μόνο των ενδογενών επιπέδων του ERβ.



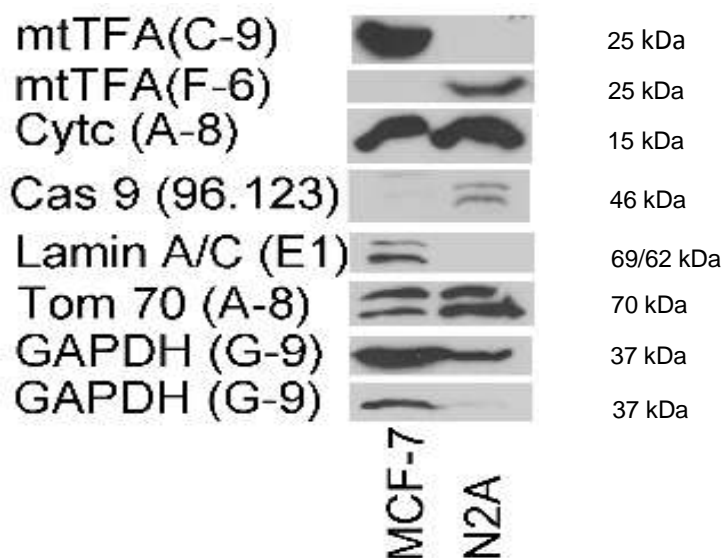
Εικόνα 16 : Ηλεκτροφόρηση σε 10% SDS πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης 0.45μm. Χρήση κυτταρικών εκχυλισμάτων από τη Neuro-2a κυτταρική σειρά και τις αποικίες 19, 33 που συλλέχθηκαν από την δεύτερη απόπειρα σχηματισμού της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. Τα παραπάνω δείγματα μελετήθηκαν ως προς την παρουσία ενδογενούς ERβ και GFPERβ . Η μεμβράνη επώαστηκε με πρωτογενή αντισώματα έναντι του ERβ (H150, MCA, B-3).

Στην παραπάνω εικόνα εμφανίζονται μη ειδικά σήματα μέσω της χρήσης του αντισώματος MCA. Μέσω του H150 παρατηρούμε το ίδιο αλλά και μια αχνή ζώνη στα 55kDa που ίσως αντιστοιχεί στα ενδογενή πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ. Τέλος με τη χρήση του B-3 αποτυπώνονται ξεκάθαρα τα ενδογενή πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ καθώς και τα επίπεδα της GFPERβ πρωτεΐνης, στα 83kDa, και μόνο στην αποικία C33, που αναμένεται να είναι θετική, ως προς την ύπαρξη της χιμαιρικής mtGFPERβ πρωτεΐνης.

3.4) ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ

Μέσω της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western έγινε προσπάθεια χαρακτηρισμού μορίων που εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στη σηματοδότηση των οιστρογόνων. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι του mtTFA

[C-9 (SC:376672) και F-6 (SC:166965)], της λαμίνης A/C [E1 (SC:376248)], του Tom 70 [A-8 (SC:390545)], του κυτοχρώματος c [A-8 (SC:13156)] και της κασπάσης 9 [96.123 SC:56076] στις MCF-7 και N2A κυτταρικές σειρές. Όλα τα αντισώματα προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Santa Cruz.



Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση σε 10% SDS πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ηλεκτρομεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0.45μm. Χρήση κυτταρικών εκχυλισμάτων από τη Neuro-2a και την MCF-7 κυτταρικές σειρές. Τα παραπάνω δείγματα μελετήθηκαν ως προς την παρουσία mtTFA, κυτοχρώματος c, κασπάσης 9, Lamin A/C, Tom 70 και GAPDH. Η μεμβράνη επωάστηκε με αντισώματα έναντι του mtTFA (C-9, F-6), του κυτοχρώματος c, της κασπάσης 9, της λαμίνης A/C, του Tom 70 και της GAPDH.

Με βάση τα δεδομένα της παραπάνω εικόνας παρατηρούμε ότι με τη χρήση των δύο αντισωμάτων έναντι του mtTFA ανιχνεύονται πρωτεϊνικά επίπεδα αυτού και στις 2 κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του Tom 70 και του κυτοχρώματος c φαίνονται περίπου ίσα και στους δύο τύπους κυτάρων. Επίσης, ανιχνεύονται ζώνες πρωτεϊνικών επιπέδων της Lamin A/C στην κυτταρική σειρά MCF-7 και της κασπάσης 9 στην κυτταρική σειρά Neuro-2a.

4) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs) ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και ειδικότερα στους υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην ομοίωση, στην ανάπτυξη και στον μεταβολισμό. Επίσης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλά συστήματα, όπως το νευρικό, το σκελετικό, το καρδιαγγειακό, το ανοσοποιητικό και το ενδοκρινικό (Heldring et al, 2007, Deroo et al, 2010 & Lee et al, 2012). Κατά κύρια βάση ενεργοποιούνται από τη δέσμευση ενός προσδέτη, με ισχυρότερο προσδέτη τους να είναι η 17-β οιστραδιόλη (17β-estradiol, E2). Οι δύο υπότυποι των ERs εμφανίζουν διαφορετικό μοτίβο κατανομής στον οργανισμό, με τον ERα να εκφράζεται κυρίως στους αναπαραγωγικούς ιστούς, ενώ τον ERβ κυρίως στους μη αναπαραγωγικούς. Αυτές οι διαφορές οδηγούν στις

διακριτές βιολογικές λειτουργίες τους (Hall et al,1999 & Cui et al, 2013). Οι οιστρογονικές δράσεις ασκούνται μέσω διαφόρων μονοπατιών σηματοδότησης. Οι ERs συνδέονται είτε άμεσα είτε και έμμεσα με το DNA. Άμεσα συνδέονται σε ειδικές αλληλουχίες που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (Estrogen Response Elements, EREs), ενώ έμμεσα αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες, ώστε να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων-στόχων τους. Επιπλέον, παρατηρούνται μη γενωμικές δράσεις που διαμεσολαβούνται μέσω ενεργοποίησης διαφόρων πρωτεϊνικών κινασών, οι οποίες στην συνέχεια ελέγχουν τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Τέλος, εντοπίζονται περιπτώσεις σύγκλισης των γενωμικών και μη γενωμικών δράσεων των ERs με αποτέλεσμα να ασκούν τις δράσεις τους, μέσω ενός μηχανισμού διασταυρούμενης επικοινωνίας (Marino et al, 2006, Klinge et al, 2008 & Vrtačnik et al, 2014).

Τα μιτοχόνδρια είναι σημαντικά υποκυτταρικά οργανίδια, καθώς συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης παρέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό της απαιτούμενης ενέργειας του κυττάρου. Ακόμη, εμπλέκονται σε αρκετά στάδια του μεταβολισμού και είναι βασικά συστατικά της απόκρισης στο στρες μέσω της παραγωγής ROS. Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν το δικό τους γονιδίωμα που κωδικοποιεί μικρό ποσοστό των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Οι υπόλοιπες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του πυρήνα. Συνεπώς, η εύρυθμη λειτουργία των μιτοχονδρίων βασίζεται στη συνεργασία τους με τον πυρήνα. Τέλος, διαταραχές των μιτοχονδριακών λειτουργιών έχουν συσχετιστεί αιτιολογικά με νευροεκφυλιστικές ασθένειες και με καρκίνο (Psarra & Sekeris, 2008).

Πολλές μελέτες υποδεικνύουν ότι ο ERβ εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια αρκετών κυτταρικών τύπων, συμβάλλοντας στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Οι μιτοχονδριακές δράσεις του ERβ περιλαμβάνουν τη διατήρηση της παραγωγής ενέργειας, την κυτταρική επιβίωση σε καταστάσεις στρες, την αύξηση της μιτοχονδριακής βιογένεσης, τη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και την αναστολή της απόπτωσης (Psarra & Sekeris, 2008, Simpkins, 2008, Liao et al, 2015).

Εδώ και χρόνια το ενδιαφέρον της δικής μας ερευνητικής ομάδας, αλλά και άλλων, έχει στραφεί στο ρόλο που διαδραματίζει ο ERβ στον καρκίνο. Ο ERβ ασκεί τόσο αντιπολλαπλασιαστικές όσο και πολλαπλασιαστικές επιδράσεις, εμφανίζοντας έναν πολύπλευρο ρόλο, που διαφοροποιείται από ιστό σε ιστό (Liao et al, 2015). Όσον αφορά τον νευρικό ιστό, έχει αποδειχθεί ότι τα οιστρογόνα, μέσω και των δύο κύριων υποδοχέων τους, ασκούν νευροπροστατευτικές δράσεις. Ένας μηχανισμός τους είναι μέσω αύξησης των αντιαποπτωτικών σε σχέση με τους προαποπτωτικούς παράγοντες (Dhandapani et al, 2002, Arevalo et al, 2015).

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερες μελέτες πραγματοποιούνται προκειμένου να γίνουν γνωστά περισσότερα στοιχεία της γενικότερης δράσης της βήτα μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων (ERβ) και ειδικότερα της δράσης του στο μιτοχόνδριο, αντικείμενο μελέτης και της ερευνητικής μας ομάδας. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε από τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Τσιάλτα Ιωάννη η κυτταρική σειρά Neuro-2a (N2A) έτσι ώστε να παρασκευάσει την σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά N2AmtGFPERβ, η οποία υπερεκφράζει σταθερά τον ERβ, ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescence protein, GFP), με μιτοχονδριακή (mitochondrial, mt) στόχευση. Η κυτταρική σειρά Neuro-2a, νευροβλάστωμα ποντικού, επιλέχθηκε λόγω του καθοριστικού ρόλου που

διαδραματίζει ο υποδοχέας στον συγκεκριμένο ιστό. Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η εύρεση αποτελεσματικών και εξειδικευμένων αντισωμάτων για το χαρακτηρισμό της σταθερά διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ.

Αρχικά με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western πραγματοποιήθηκε έλεγχος αντισωμάτων έναντι των δύο υποτύπων του υποδοχέα οιστρογόνων. Στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οκτώ διαφορετικά αντισώματα από τα οποία μόνο τα έξι έδωσαν το επιθυμητό αποτέλεσμα. Τα αντισώματα D-12, F-10, B-3, MCA, H150 και B-1 φαίνεται να ανιχνεύουν εξειδικευμένα τους στόχους τους, ERα και ERβ. Αντίθετα, η χρήση των C-311 και 1531 προκάλεσε την εμφάνιση μη ειδικών σημάτων.

Σε επόμενο στάδιο έγινε προσπάθεια για τον χαρακτηρισμό των αποικιών της σταθερά διαμολυσμένης κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. Τόσο με τη χρήση αντισωμάτων έναντι GFP όσο και έναντι ERβ δεν ανιχνεύτηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της υβριδικής πρωτεΐνης GFPERβ. Οι ζώνες που λήφθηκαν με την επώαση και των δύο αντισωμάτων αφορούν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GFP στα 27 kDa και του ERβ στα 55 kDa αντίστοιχα. Ένας μηχανισμός που μπορεί να προταθεί είναι ο διαχωρισμός της υβριδικής πρωτεΐνης στα δύο κύρια συστατικά της, GFP και ERβ, σε κάποιο στάδιο κατά τη διάρκεια ή και μετά την έκφρασή της. Στο συμπέρασμα αυτό μας οδηγούν τα αποτελέσματα μετά τη χρήση του αντισώματος έναντι GFP. Όμως, και πάλι δεν είναι απόλυτο καθώς μετά τη χρήση αντισωμάτων έναντι του ERβ ανιχνεύονται μόνο τα ενδογενή επίπεδα της κυτταρικής σειράς και όχι κάποια υπερέκφραση. Σε κάθε περίπτωση βέβαια απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

Λόγω της δυσκολίας ανίχνευσης των επιπέδων έκφρασης της υβριδικής πρωτεΐνης GFPERβ στα κυτταρικά εκχυλίσματα των αποικιών της N2AmtGFPERβ κυτταρικής σειράς θεωρήθηκε αναγκαίο να παρασκευαστεί εκ νέου. Στη δεύτερη απόπειρα από τον υποψήφιο διδάκτορα κ Τσιάλλα Ιωάννη ακολουθήθηκαν πιο αυστηρές συνθήκες καθ' όλη την πειραματική διαδικασία.

Μέσω της μικροσκοπίας φθορισμού και της ανοσοκυτταροχημείας, που πραγματοποιήθηκαν από τον συνάδελφο Γκαντούνα Ιωάννη, έγινε μια πρώτη αξιολόγηση των αποικιών, που προέκυψαν από την διαμόλυνση της N2A κυτταρικής σειράς με το πλασμίδιο pmEGFPERβ, διαθέσιμο στο εργαστήριο μας. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν θετικές και αρνητικές ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης GFPERβ αποικίες, ώστε να εντοπιστεί το κατάλληλο αντίσωμα έναντι του ERβ που θα ανιχνεύει και την GFPERβ. Λαμβάνοντας υπόψιν το σύνολο των αποτελεσμάτων των παραπάνω διαδικασιών γίνεται αντιληπτό ότι το καταλληλότερο αντίσωμα για τον χαρακτηρισμό των αποικιών ως προς την ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της υβριδικής πρωτεΐνης GFPERβ είναι το B-3.

Τέλος, έγινε προσπάθεια χαρακτηρισμού μορίων που εμπλέκονται στην οιστρογονική σηματοδότηση. Τα μόρια αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά για την κατανόηση των σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω των οποίων ασκούνται οι μηχανισμοί οιστρογονικής δράσης από τους ERs. Στο βήμα αυτό πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα που εξετάστηκαν προέρχονται από τις Neuro-2a και MCF-7 κυτταρικές σειρές. Στη συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι του mtTFA, της λαμίνης A/C, του Tom 70, του κυτοχρώματος c και της κασπάσης 9.

Ο mtTFA ή αλλιώς TFAM είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που κωδικοποιείται από το πυρηνικό γονιδίωμα. Η E2 προκαλεί την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NRF-1 μέσω ER-ERE στον πυρήνα. Έτσι, ο NRF-1 ενεργοποιεί τη μεταγραφή πυρηνικών γονιδίων, που κωδικοποιούν την έκφραση μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο TFAM που ρυθμίζει την έναρξη της μιτοχονδριακής μεταγραφής. (Gupte et al, 2015). Οι λαμίνες τύπου A (λαμίνες A και C) κωδικοποιούνται από το γονίδιο LMNA και αποτελούν τα κυριότερα συστατικά του πυρηνικού ελάσματος. Το πυρηνικό έλασμα είναι μια σύνθετη δομή που λειτουργεί ως ικρίωμα για πρωτεϊνικά σύμπλοκα που ρυθμίζουν την πυρηνική δομή και τις πυρηνικές λειτουργίες. Οι λαμίνες τύπου A εμπλέκονται σε μια ευρεία ποικιλία ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων με τις οδούς μεταγωγής σήματος. Συγκεκριμένα, πολλές μελέτες εμπλέκουν τις πρωτεΐνες του ελάσματος ως ρυθμιστές της δραστηριότητας αρκετών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως της MAPK (Vicente Andrés et al, 2009). Το σύμπλοκο TOM είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την δράση του ERβ στα μιτοχόνδρια. Οι περισσότερες γνωστές πυρηνικές πρωτεΐνες με μιτοχονδριακή δράση εισέρχονται στα οργανίδια αυτά μέσω του συμπλόκου της τρανσλοκάσης της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, γνωστό ως σύμπλοκο TOM. Το σύμπλοκο αυτό αναγνωρίζει την αλληλουχία-οδηγό και βοηθά στην είσοδο των πρωτεϊνών αυτών στο μιτοχόνδριο. Περιλαμβάνει τους υποδοχείς Tom20, Tom70, Tom22, το κανάλι Tom40 και τη μικρή Tom6-7, με τους δύο πρώτους υποδοχείς να αποτελούν τους κυρίαρχους του συμπλόκου και τα υπόλοιπα μέλη να είναι συστατικά του πόρου της μετατόπισης (Simpkins, 2008). Το κυτόχρωμα c (Cyt c) μεταφέρει τα ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο III της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στο σύμπλοκο IV. Όταν απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια διεγείρει τον κυτταρικό θάνατο μέσω πρόσληψης και ενεργοποίησης της προκάσπασης 9, αλληλεπιδρώντας με τον Araf-1 (Apoptotic protease activating factor 1). Ο Araf-1 και η κασπάση 9 συναρμολογούν ένα πολυμερές σύμπλεγμα γνωστό ως αποπτώσωμα. Το κυτόχρωμα c φαίνεται να καταλύει τη συναρμολόγηση του αποπτωσώματος, αλλά δεν εμπεριέχεται σ αυτό (Vempati et al, 2007). Όταν ενεργοποιείται η κασπάση 9 μπορεί άμεσα να διασπάσει και να ενεργοποιήσει την κασπάση 3 και την κασπάση 7. Η ενεργοποίηση της κασπάσης 3 οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο (Brentnall et al, 2013).

Άμεσοι μελλοντικοί στόχοι είναι ο χαρακτηρισμός των αποικιών της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ με εφαρμογή της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρήση αντισώματος έναντι του ERβ, B-3, καθώς και αντισώματος έναντι GFP. Στη συνέχεια θα ακολουθήσει εκτίμηση των επιπέδων του mRNA του ERβ με τη μέθοδο της real-time PCR και χρήση κατάλληλων εκκινητών. Απώτερος στόχος όλων των παραπάνω είναι η διεύρυνση των γνώσεων μας σχετικά με το ρόλο της βητα μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων στο μιτοχόνδριο.

5) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) V. Andrés and J.M. González, (2009), Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization, *The Journal of Cell Biology*
- 2) Arevalo MA, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2015) The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nature reviews Neuroscience* 16: 17-29
- 3) Beato M, Klug J, (2000) Steroid Hormone Receptors: An Update, *Human Reproduction*, Vol. 6, No. 3, 225-236
- 4) M. Brentnall, L. Rodriguez-Menocal, R.L. De Guevara, E. Cepero and L.H.Boise, (2013), Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis, *Cell Biology*
- 5) J.-Q. Chen, P. R. Cammarata, C. P. Baines, J. D. Yager, (2009) Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogenreceptors and physiological, pathological and pharmacological implications, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, 1540–1570
- 6) Cui J, Shen Y, Li R (2013) Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine* 19: 197-209
- 7) Karin Dahlman-Wright, Vincent Cavailles, Suzanne A. Fuqua, V. Craig Jordan, John A. Katzenellenbogen, Kenneth S. Korach, Adriana Maggi, Masami Muramatsu, Malcolm G. Parker, And Jan-Åke Gustafsson, (2006) International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors. *Pharmacol Review* 58:773–781
- 8) Deroo BJ, Buensuceso AV (2010) Minireview: Estrogen receptor-beta: mechanistic insights from recent studies. *Molecular Endocrinology* 24: 1703-1714
- 9) Krishnan M. Dhandapani, Darrell W. Brann, (2002), Protective Effects of Estrogen and Selective Estrogen Receptor Modulators in the Brain, *Biology of reproduction*, 67,1379–1385
- 10) Geeta N.Eick, Joseph W.Thornton (2011), Evolution of steroid receptors from an estrogen-sensitive ancestral receptor, *Molecular and Cellular Endocrinology* 334, 31-38
- 11) Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological reviews* 58: 685-704
- 12) Gupta N, Mayer D (2013) Interaction of JAK with steroid receptor function. *Jak-Stat* 2: e24911
- 13) Gupte AA, Pownall HJ, Hamilton DJ (2015) Estrogen: an emerging regulator of insulin action and mitochondrial function. *Journal of diabetes research* 2015: 916585
- 14) Hall JM, Mcdonnell DP (1999) The Estrogen Receptor b-Isoform (ER β) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER α Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular

- Response to Estrogens and Antiestrogens. *Endocrinology* 140: 5566– 5578
- 15) Nina Heldring, A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Strom, E. Treuter, M. Warner, JA Gustafsson, (July 2007), Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets, *The American Physiological Society*, vol 87, 905–931
 - 16) Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA (2015) Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 29: 557-568
 - 17) Klinge CM (2008) Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 105: 1342-1351
 - 18) Lee H-R, Kim T-H, Choi K-C, (2012) Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse, *Laboratory Animal Research*, 28, 71-76
 - 19) T-L Liao, C-R Tzeng, C-L Yu, Y-P Wang, S-H Kao, (2015), Estrogen receptor – β in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis, *Annals of the New York Academy of sciences*, 1350, 52–60
 - 20) D.J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schiitq, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and RM. Evans (1995), *The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade*, *Cell*, Vol. 83, 835-839
 - 21) Marino M., Galluzzo P., P. A (2006) Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. *Current Genomics* 7: 497-508
 - 22) Olefsky J., (2001), Nuclear Receptor Minireview Series, *Journal of Biological Chemistry*, 276(40): 36863-36864
 - 23) Planey SL, Kumar R, Arnott JA (2014) Estrogen receptors (ER α versus ER β): friends or foes in human biology? *Journal of receptor and signal transduction research* 34: 1-5
 - 24) Psarra A. M. G., Sekeris C., (2008), Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(1): 1-11
 - 25) Psarra A. M. G., Sekeris C., (2008), Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria, *IUBMB Life*, 60(4): 210-223
 - 26) Psarra G. A. M., Solakidi S., Sekeris C., (2006), The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: Presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 246(1-2): 21-33
 - 27) Renaud J. P., Moras D, (2000), Structural studies on nuclear receptors, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(12): 1748-1769
 - 28) Robinson-Rechavi M., Escriva H., Laudet V., (2003), The nuclear receptor superfamily, *Journal of Cell Science*, 116(4): 585-586
 - 29) Sever R., Glass C., (2013), Signaling by Nuclear Receptors, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5(6): 1-4

- 30) Simpkins J. W., Yi K. D., Yang S. H., Dykens, James A, (2010), Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1800(10): 1113-1120
- 31) Simpkins J. W., Yang S.H (2008), Estrogen actions on mitochondria - Physiological and pathological implications, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290, 51-59
- 32) Sladek M.F, (2011), What are nuclear receptor ligands? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 334: 3-13
- 33) U.D. Vempati, F. Diaz, A. Barrientos, S. Narisawa, A.M. Mian, J.L. Millan, L.H. Boise, and C.T. Moraes, (2007), Role of Cytochrome c in Apoptosis: Increased Sensitivity to Tumor Necrosis Factor Alpha Is Associated with Respiratory Defects but Not with Lack of Cytochrome c Release, *molecular and cellular biology*, p. 1771–1783
- 34) Vrtačnik P., Ostanek B., Mencej-Bedrač S., Marc J., (2014), The many faces of estrogen signaling, *Biochimica Medica*, 24(3): 329-342
- 35) Yang S.H., Liu R., Perez E.J., (2004), Mitochondrial localization of estrogen receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12): 4130-4135
- 36) Yang S.H., (2009), Estrogen receptor β as a mitochondrial vulnerability factor, *Journal of Biological Chemistry*, 284(14): 9540-9548
- 37) Zhao C., Dahlman-Wright K., Gustafsson J.A., (2007), Estrogen receptor β : an overview and update, *Nuclear Receptor Signaling*, 4: 1-10
- 38) Zhao L., Wu T.W., Brinton R. D., (2004), Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons, *Brain Research*, 1010(2): 22-34