



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

ΑΝΟΣΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΤΟΠΙΣΗΣ ΤΟΥ  
ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ  
ΜΥΪΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS OF ESTROGEN  
RECEPTOR LOCALIZATION IN SKELETAL MUSCLE  
TISSUE

Νηφόρος-Γκαρσία Γεώργιος

Λάρισα 2022

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

**ΨΑΡΡΑ ANNA-MARIA:** Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΨΑΡΡΑ ANNA-MARIA:** Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

**ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ:** Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

**ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ:** Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	5
Περίληψη.....	6
Abstract .....	7
Εισαγωγή .....	8
Πυρηνικοί Υποδοχείς.....	8
Δομή πυρηνικών υποδοχέων .....	9
Υποδοχείς οιστρογόνων .....	10
Δομή και ισομορφές των υποδοχέων οιστρογόνων .....	11
Κατανομή των υποδοχέων ERα και ERβ .....	12
Μηχανισμοί δράσης υποδοχέων οιστρογόνων .....	13
Γενωμική προσδετοεξαρτώμενη μεταγωγή σήματος.....	14
Ανεξάρτητη του προσδέτη μεταγωγή σήματος .....	15
Δράση του συμπλόκου E2-ER ως συμπαράγοντας .....	16
Μη γενωμική μεταγωγή σήματος.....	17
Βασικές διαφορές υποδοχέων ERα και ERβ .....	18
Σχέση ERα-ERβ.....	19
ER και μιτοχόνδριο .....	20
ERα και παθοφυσιολογία.....	21
Σκελετικός μυς.....	23
Δομή σκελετικού μυός .....	23
Σύσπαση σκελετικού μυ .....	24
Μοριακός μηχανισμός σύσπασης.....	26
Τύποι μυϊκών ινών .....	26
Ανοσοϊστοχημεία .....	27
Εισαγωγή .....	27
Αντίσωμα.....	28
Ελαφριά αλυσίδα .....	29
Βαριά αλυσίδα .....	29
Πρωτεϊνικές επικράτειες .....	29
Πρωτογενή αντισώματα.....	30
Δευτερογενή αντισώματα .....	31
Σκοπός .....	32

Πειραματικό μέρος.....	33
Οργανολογία .....	33
Υλικά .....	33
Χημικά .....	33
Διαλύματα .....	34
Ανοσοϊστοχημεία .....	34
Δοκιμασία ΑΤΡάσης .....	34
Μέθοδοι .....	35
Ανοσοϊστοχημεία .....	35
Ιστοχημική ανάλυση τύπου τύπου μυϊκών ινών .....	38
Αρχή.....	38
Μεθοδολογία .....	39
Αποτελέσματα .....	40
Ανοσοϊστοχημεία .....	40
Μυϊκός ιστός χοίρου .....	40
Μυϊκός ιστός ποντικού.....	43
Ιστοχημική ανάλυση τύπου μυϊκών ινών ( Δοκιμασία ΑΤΡάσης).....	46
Μυϊκός ιστός χοίρου .....	46
Μυϊκός ιστός ποντικού.....	47
Συζήτηση .....	48
Βιβλιογραφία .....	50

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου και για την ευκαιρία να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής της ομάδας. Η βοήθεια και η καθοδήγησή της ήταν ύψιστης σημασίας για την διεκπεραίωση της παρούσας μελέτης, ενώ οι γνώσεις που μου προσέφερε κατά την διάρκεια των σπουδών μου συνέβαλαν σημαντικά στην εξέλιξή μου τα τελευταία χρόνια. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στην Δρ. Χριστίνα Καρατζαφέρη και στον Δρ. Γεώργιο Σακκά, καθηγητές του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Τμήμα Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, για τις χρήσιμες συμβουλές και την υποστήριξη τους κατά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου της χρώσης των διαφόρων τύπων σκελετικών μυϊκών ινών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον κύριο Λεωνίδα Δημήτριο, Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς και τον κύριο Νικόλαο Μπαλατσό, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο, υποψήφιο διδάκτορα του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την αστείρευτη υπομονή που έδειξε, την καθοδήγηση του σε κάθε βήμα, και το ενδιαφέρον να μας μεταδώσει τις γνώσεις του, καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, όπου και εκπονήθηκε η παρούσα διπλωματική εργασία, για την άψογη συνεργασία.

## Περίληψη

Τα οιστρογόνα είναι ευρέως γνωστά στις γυναίκες καθώς αποτελούν τις κύριες φυλετικές ορμόνες, και ευθύνονται για την ανάπτυξη αρκετών δευτερευόντων σεξουαλικών χαρακτηριστικών τους, όπως: η ανάπτυξη του στήθους, της λεκάνης και των μαστικών αδένων μεταξύ αυτών. Συγκεκριμένα, κύρια μέλη της οικογένειας των οιστρογόνων είναι η οιστρόνη (E1), η 17-β οιστραδιόλη (E2), η οιστριόλη (E3), και η εσπετρόλη (E4) η οποία παράγεται μόνο κατά την εγκυμοσύνη, με την οιστρόνη και την οιστριόλη να αποτελούν προϊόντα του μεταβολισμού της οιστραδιόλης. Η οιστραδιόλη, η οποία είναι η πιο άφθονη και δραστική μορφή των οιστρογόνων παράγεται φυσιολογικά και στον ανδρικό οργανισμό, ωστόσο σε σημαντικά μειωμένα επίπεδα. Πέρα από τα γυναικεία σεξουαλικά χαρακτηριστικά, η οιστραδιόλη E2 συμμετέχει στην φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου μέσω της νευροπροστατευτικής της δράσης, στην διατήρησης της οστικής μάζας, αλλά και στην καλή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος.

Η οιστραδιόλη είναι ένα λιπόφιλο μόριο το οποίο μπορεί και διαπερνά την κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω διάχυσης και προσδέεται σε ενδοκυτταρικούς υποδοχείς οι οποίοι λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες εξαρτώμενοι από τον προσδέτη και ρυθμίζουν την μεταγραφή γονιδίων-στόχων, συγκεκριμένων για κάθε ιστό. Οι κύριοι αναγνωρισμένοι υποδοχείς οιστρογόνων είναι ο υποδοχέας οιστρογόνων α (ERα) και ο υποδοχέας οιστρογόνων β (ERβ), οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, και κωδικοποιούνται από τα γονίδια ESR1 και ESR2 αντίστοιχα. Πρόσφατα έχουν βρεθεί και μεμβρανοσύνδετοι υποδοχείς οιστρογόνων όπως ο GPER-30, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των 7-TM διαμεμβρανικών υποδοχέων. Αντιθέτως με την κλασική εντόπιση των πυρηνικών υποδοχέων, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι οι υποδοχείς οιστρογόνων α και β εντοπίζονται και στο μιτοχόνδριο του κυττάρου και μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων του mtDNA, καθιστώντας τους έναν ενδιαφέρον στόχο για μελέτη, με σκοπό να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στην μιτοχονδριακή λειτουργία αλλά και σε μιτοχονδριακά σχετιζόμενες ασθένειες.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο ανοσοϊστοχημικός χαρακτηρισμός του υποδοχέα οιστρογόνων ERα σε τομές μυϊκού ιστού ποντικού και χοίρου. Οι εικόνες που λήφθηκαν από συνεστιακό μικροσκόπιο δείχνουν με ακρίβεια και στοχευμένα την θέση του υποδοχέα οιστρογόνων α (ERα) στον μυϊκό ιστό και των δύο ειδών, ο οποίος εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα της μυϊκής ίνας, σε κοντινή απόσταση από τους πυρήνες. Επιπλέον, για να εξετάσουμε την ενδεχόμενη παρουσία του υποδοχέα ERα στα μιτοχόνδρια της μυϊκής ίνας, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία για το μιτοχονδριακό ένζυμο COXIV. Επίσης, πραγματοποιήθηκε βιοχημική δοκιμασία χαρακτηρισμού των τύπων των μυϊκών ινών και των δύο ειδών, η οποία στηρίζεται στο ένζυμο ATPάση της μυοσίνης, με σκοπό να ελέγξουμε εάν υπάρχει κάποιο διαφορετικό πρότυπο υποκυτταρικής κατανομής του υποδοχέα ERα στους διαφορετικούς τύπους μυϊκών ινών.

## Abstract

Estrogens are widely known in females because they are the main female hormones, and are responsible for the development of a number of secondary sexual characteristics, such as the growth of the chest, hip width and the mammary gland, among others. Specifically, the members of the estrogen hormone family are estrone (E1), 17- $\beta$  estradiol (E2), estriol (E3), and estetrol (E4), which is present only during pregnancy, while estrone and estriol are the byproducts of estradiol metabolism. Estradiol, is the most abundant and active form of the estrogens and is also normally synthesized in males, but in significantly reduced levels. Beyond its role in developing the secondary female characteristics, E2 is implicated in maintaining normal brain function via its neuroprotective effect, the maintenance of bone density, and for maintaining a healthy cardiovascular system.

Estradiol is a lipophilic molecule, and it is capable of passively entering the cell via cytoplasmic membrane diffusion, where it binds to intracellular receptors, that function as ligand-activated transcriptional factors and regulate the expression of genes, specific for each tissue. The main identified estrogen receptors are estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ), which belong to the nuclear receptors family, and are encoded by the ESR1 and ESR2 genes respectively. Recently, membrane-bound estrogen receptors have been identified, like GPER-30, that belong to the 7-TM transmembrane receptors. Unlike to the standard nuclear receptor localization, there is data supporting that the estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  can also localize in the mitochondria of the cell and can regulate the expression of mitochondrial encoded genes, making them an interesting target of study, in order to unveil their role in mitochondria function and mitochondria-related diseases.

Specific goal of this thesis was to define immunohistochemically the subcellular localization of the ER $\alpha$  isoform in sections of mouse and pork muscle tissue. We received confocal microscope pictures which demonstrate with high precision the location of the estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) in muscle tissue. ER $\alpha$  can be seen in the cytoplasm, in close proximity to the nucleus. Also, we carried out a biochemical assay for the identification of the muscle fibers of both species, based on the activity of the myosin ATPase enzyme, in order to investigate if there is a differential pattern of subcellular distribution of the estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) in different types of muscle fibers.

## Εισαγωγή

### Πυρηνικοί Υποδοχείς

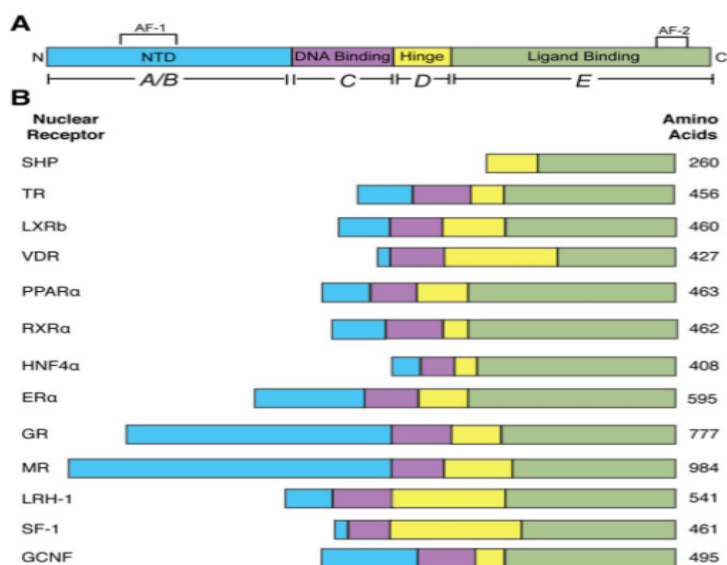
Οι πυρηνικοί υποδοχείς αποτελούν μία υπεροικογένεια προσδετοεξαρτώμενων υποδοχέων οι οποίοι δρουν σχεδόν αποκλειστικά ως μεταγραφικοί παράγοντες, ρυθμίζοντας την γονιδιακή έκφραση. Οι περισσότεροι πυρηνικοί υποδοχείς βρίσκονται σε ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα, δεσμευμένοι με πρωτεΐνες συνοδούς, και ενεργοποιούνται μέσω της σύνδεσης του αντίστοιχου προσδέτη. Η ενεργοποίηση μπορεί να συμβεί με την πρόκληση ομο- ή ετεροδιμερισμού, ή την μεταφορά τους εντός του πυρήνα. Οι προσδέτες των πυρηνικών υποδοχέων είναι λιπόφιλα μόρια τα οποία διαπερνούν παθητικά την κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω διάχυσης, όπως οι στεροειδείς ορμόνες, ορισμένες βιταμίνες, και ξενοβιοτικά. Εντός του πυρήνα, οι πυρηνικοί υποδοχείς προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες που ονομάζονται HREs (Hormone Response Elements). Η συναινετική αλληλουχία για την πρόσδεση τους είναι RGGTCA, όπου R ισοδυναμεί με πουρίνη, στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων, όπου προσελκύουν ή διευκολύνουν την συναρμολόγηση του μεταγραφικού συμπλόκου ώστε να επιτευχθεί η μεταγραφή των γονιδίων στόχων. Γενικά, έχει βρεθεί ότι η θέση πρόσδεσης των πυρηνικών υποδοχέων έγκειται σε περιοχές ενισχυτών, μακριά από τον υποκινητή. Οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω με βάση τον μηχανισμό δράσης τους σε 4 τάξεις: Τάξη I,II,III,IV. Η τάξη I αποτελείται από τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών, δηλαδή στην τάξη αυτή ανήκουν οι υποδοχείς ανδρογόνων, οιστρογόνων και προγεστερόνης, ο υποδοχέας αλατοκορτικοστεροειδών και ο υποδοχέας γλυκοκορτικοστεροειδών. Η HRE περιοχή των υποδοχέων αυτών αποτελείται από δύο τμήματα τα οποία χωρίζονται μεταξύ τους από αριθμό βάσεων που ποικίλει, ενώ η δεύτερη καθοδικά αλληλουχία είναι ανεστραμμένη σε σχέση με το πρώτο μισό. Η τάξη αυτή χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη του υποδοχέα στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή μορφή μέσω της δέσμευσης τους με πρωτεΐνες συνοδούς, όπως η Heat-shock Protein 90 (HSP90). Η σύνδεση του προσδέτη προκαλεί δομικές αλλαγές που επιτρέπουν την αποδέσμευση του υποδοχέα από την πρωτεΐνη-μοριακό συνοδό. Αυτό προκαλεί τον ομο- ή ετεροδιμερισμό, την έκθεση της αλληλουχίας πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και κατά συνέπεια την μεταφορά του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέτη στον πυρήνα, όπου ασκούν την βιολογική τους δράση. Η τάξη II αποτελείται από τους υποδοχείς θυροειδών ορμονών (TRα και TRβ), τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος, τον υποδοχέα της βιταμίνης D, και τους υποδοχείς πολλαπλασιασμού των περοξισωμάτων PPARα, PPARβ και PPARγ. Οι υποδοχείς της τάξης αυτής εντοπίζονται στον πυρήνα χωρίς την μεσολάβηση του προσδέτη, συνδεδεμένοι στις αντίστοιχες αλληλουχίες απόκρισης τους. Επίσης, δημιουργούν ετεροδιμερή με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος RXR. Έχει βρεθεί πως απουσία προσδέτη οι υποδοχείς τάξης II ενεργούν ως καταστολείς της γονιδιακής έκφρασης, μέσω της σύνδεσης τους με ανασταλτικά σύμπλοκα (SMRT και NCoR) που σχετίζονται με απακευλάσες ιστονών, με συνέπεια την συσπείρωση της χρωματίνης και τον χωροταξικό αποκλεισμό των μεταγραφικών παραγόντων και τον σχηματισμό του μεταγραφικού μηχανισμού. Η σύνδεση των προσδετών προκαλεί την αποδέσμευση των υποδοχέων από τον RXR, και επιτρέπει την σύνδεση τους με συν-ενεργοποιητές, όπως ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών. Η



χρωματίνη με αυτό τον τρόπο αποσυσπειρώνεται και επιτρέπεται η γονιδιακή έκφραση. Οι υποδοχείς τύπου III και IV χαρακτηρίζονται ως 'ορφανοί' υποδοχείς, καθώς προς το παρόν δεν έχει ταυτοποιηθεί ή βρεθεί ο αντίστοιχος προσδέτης τους. Οι υποδοχείς της τάξης III ομοιάζουν με τους υποδοχείς της τάξης II με την διαφορά ότι το δεύτερο τμήμα της HRE αλληλουχίας είναι ίδιας κατεύθυνσης με το πρώτο τμήμα της περιοχής, ενώ οι υποδοχείς τάξης IV συνδέονται σε μονομερή μορφή σε HRE που αποτελούνται από μία περιοχή (Sever R, et al, 2013).

### Δομή πυρηνικών υποδοχέων

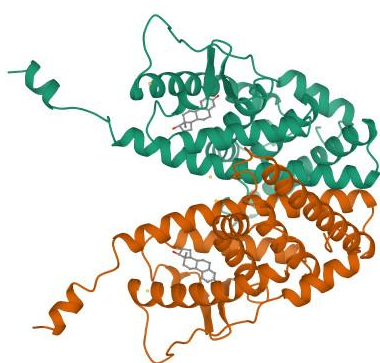
Παρά τις μεγάλες διαφορές σε προσδέτες, μέγεθος και λειτουργικότητα, οι πυρηνικοί υποδοχείς ακολουθούν ένα συγκεκριμένο δομικό πρότυπο το οποίο αποτελείται από 5 διακριτές επικράτειες A έως E. Κάθε μία από αυτές τις περιοχές έχει συγκεκριμένο ρόλο και μεσολαβεί σε συγκεκριμένη δράση του υποδοχέα. Η αμινοτελική επικράτεια αποτελείται από τις επικράτειες A/B. Η επικράτεια αυτή εμπεριέχει την περιοχή AF-1 (Activator Function-1), η οποία έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρά με πληθώρα παραγόντων-ενεργοποίησης της μεταγραφής, ενώ δέχεται το μεγαλύτερο μέρος των μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων του υποδοχέα, όπως ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, SUMOύλιωση. Ακολουθεί η C επικράτεια, όπου περιέχει την περιοχή DBD (DNA Binding Domain). Η επικράτεια αυτή εμφανίζει την μεγαλύτερη συντήρηση μεταξύ των επικρατειών των πυρηνικών υποδοχέων, καθώς είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στην χρωματίνη. Περιέχει 4 κατάλοιπα κυστεΐνης τα οποία προσανατολίζουν ένα ιόν ψευδαργύρου (Zn) με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργείται η συντηρημένη δομή zinc finger, που ευθύνεται για την πρόσδεση στο DNA. Η επικράτεια D σχηματίζει βρόχο μη συγκεκριμένης δομής, που ευθύνεται για την σύνδεση και την συγκράτηση της περιοχής δέσμευσης DNA με την περιοχή δέσμευσης του προσδέτη. Σε μερικές περιπτώσεις περιέχει μία αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού. Τέλος, η επικράτεια E συνιστά την LBD περιοχή (Ligand Binding Domain), όπου συμβαίνει η πρόσδεση του εκάστοτε προσδέτη. Η επικράτεια αυτή περιέχει την περιοχή AF-2, η οποία διαμορφώνεται κατά τέτοιο τρόπο μετά την σύνδεση του προσδέτη που αλληλεπιδρά με πληθώρα ρυθμιστικών και συνενεργοποιητικών πρωτεϊνών (Weikum ER. et al, 2018).



Εικόνα 1: Α) Βασική δομή των πυρηνικών υποδοχέων, όπου φαίνονται οι διακριτές περιοχές A-E. Β) Δομή μελών της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων (Weikum ER. et al, 2018).

## Υποδοχείς οιστρογόνων

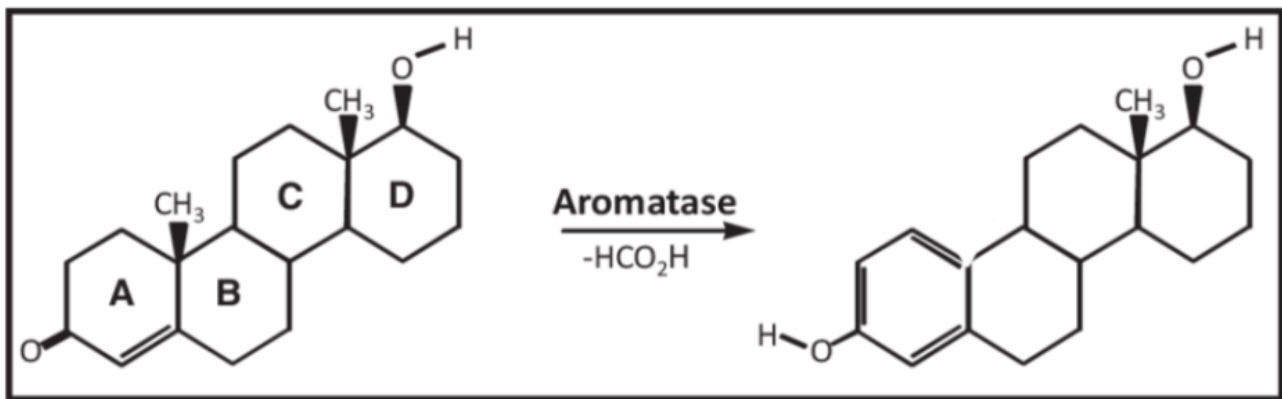
Οι υποδοχείς οιστρογόνων αποτελούν υποκατηγορία των πυρηνικών υποδοχέων και χαρακτηρίζονται από τα δομικά χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν. Οι υποδοχείς οιστρογόνων εμπλέκονται σε μία ευρεία γκάμα φυσιολογικών λειτουργιών που εξασφαλίζουν την ομοιόσταση του οργανισμού, όπως η σεξουαλική ωρίμανση, η καρδιαγγειακή προστασία, η νευροπροστασία, και η ρύθμιση του μεταβολισμού, ενώ είναι και υπεύθυνοι, όταν τα φυσιολογικά επίπεδα τους μεταβάλλονται για παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος του μαστού και ο καρκίνος του προστάτη. Κύριος προσδέτης των υποδοχέων αυτών αποτελεί η 17β οιστραδιόλη, το ισχυρότερο οιστρογόνο του οργανισμού. Η 17β οιστραδιόλη είναι μια στεροειδής ορμόνη, και όπως συμβαίνει με όλες τις στεροειδείς ορμόνες, αποτελεί παράγωγο της χοληστερόλης μέσω ενός μονοπατιού που καταλύεται από ένζυμα της οικογένειας του κυτοχρώματος P450. Η σύνθεση των οιστρογόνων στα ώριμα ωοθυλάκια βρίσκεται υπό τον έλεγχο των γοναδοτροπινών FSH και LH (Cui J. et al, 2013). Σε γυναίκες μετά το πέρας της εμμηνόπαυσης αλλά και στους άντρες, η παραγωγή της οιστραδιόλης συμβαίνει μέσω της μετατροπής της τεστοστερόνης και της ανδροστενδιόνης, εξαιτίας της δράσης ενός ενζύμου της οικογένειας του κυτοχρώματος P450, την αρωματάση. Η αρωματάση παράγει τοπικά οιστραδιόλη στους ιστούς που εντοπίζεται. Η οιστραδιόλη έπειτα απελευθερώνεται στην κυκλοφορία, όπου το μεγαλύτερο ποσοστό της προσδέεται με μεταφορικές πρωτεΐνες (SHBG και αλβουμίνη) στο πλάσμα και παραμένει μη διαθέσιμο (Benton Y. et al, 2011). Το μικρό ποσοστό που παραμένει ελεύθερο στην κυκλοφορία είναι υπεύθυνο για τις ποικίλες δράσεις της οιστραδιόλης. Η κατανομή της αρωματάσης είναι ευρεία, καθώς μπορεί να εντοπιστεί σε ιστούς όπως ο εγκέφαλος, ο μαστός, το ήπαρ και ο λιπώδης ιστός, ενώ εμφανίζει μεγαλύτερη κατανομή στον πλακούντα, τα επινεφρίδια, και τον λιπώδη ιστό. Η κυτταρική σηματοδότηση των οιστρογόνων πραγματοποιείται κυρίως μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων ERα (Estrogen Receptor-α) ή αλλιώς NR3A1 ( Nuclear Receptor Subfamily 3, group A, member 1), και ERβ (Estrogen Receptor-β) ή αλλιώς NR3A2(Nuclear Receptor Subfamily 3, group A, member 2).



Εικόνα 2: Κρυσταλλική δομή του υποδοχέα ERβ με την μέθοδο ακτίνων Χ συζευγμένη οιστραδιόλη στο ενεργό κέντρο (Textor, L. et al, 2017)



Εικόνα 3: Κρυσταλλική δομή υποδοχέα ERα με την μέθοδο ακτίνων Χ με συζευγμένη οιστραδιόλη στο ενεργό κέντρο (Tanenbaum, D.M et al, 1998)

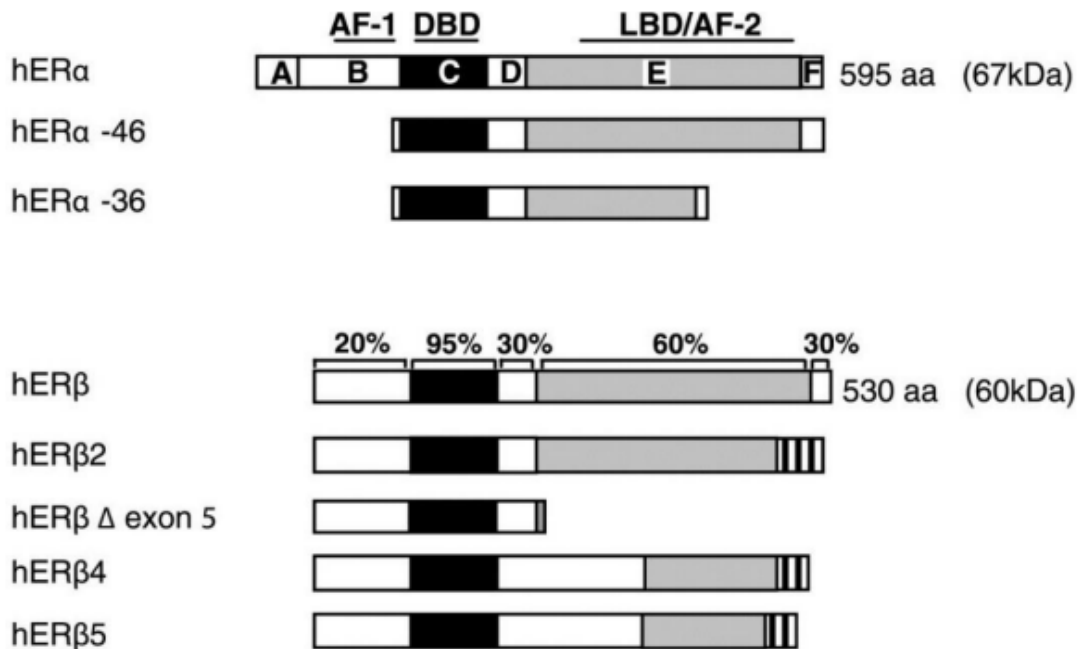


Εικόνα 4: Αντίδραση μετατροπής τεστοστερόνης σε οιστραδιόλη, που καταλύεται από το ένζυμο P450 αρωματάση (Ami P Raval et al, 2011)

### Δομή και ισομορφές των υποδοχών οιστρογόνων.

Ο υποδοχέας ERα και ο υποδοχέας ERβ κωδικοποιούνται από τα γονίδια ESR1 και ESR2 αντίστοιχα, ενώ τα συγκεκριμένα γονίδια εδράζονται και σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Το γονίδιο ESR1 εντοπίζεται συγκεκριμένα στην περιοχή 6q25.1 και αποτελείται από 472948bp, ενώ το γονίδιο ESR2 εντοπίζεται στην περιοχή 14q23.2. Σύμφωνα με την βάση δεδομένων UniProt, ο ERα πρόκειται για μία πρωτεΐνη της οποίας η κυρίαρχη ισομορφή (P03372-1) αποτελείται από 595 αμινοξέα με μοριακό βάρος 66kDa, ενώ έχουν αναφερθεί και 4 προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Η 'μικρή' ισομορφή P03372-2 διαφέρει με την κυρίαρχη στο ότι δεν περιέχει τα αμινοξέα 255 έως 366, ενώ η λειτουργία της δεν είναι γνωστή. Η ισομορφή P03372-3 χρησιμοποιεί έναν εναλλακτικό υποκινητή κατά την μεταγραφή της, και συνεπώς απουσιάζουν τα αμινοξέα 1-173, και κατά συνέπεια και η περιοχή AF-1. Το προϊόν που προκύπτει ονομάζεται ERα46, είναι μεγέθους 46 kDa, ενώ έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε ποσοστό 70% σε όγκους του μαστού, ενώ η υπερέκφρασή του αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων MCF7 σε απόκριση στην οιστραδιόλη (Chantalat E. et al, 2016). Τέλος, πρόσφατα βρέθηκε η ισομορφή ERα36, η οποία στερείται πέρα από την αμινοξική περιοχή 1-173, και την περιοχή 458-595 και επομένως διαθέτει μόνο την περιοχή πρόσδεσης στο DNA. Έχει βρεθεί σε καρκινικά κύτταρα του μαστού και φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην μη γενωμική σηματοδότηση διαμεσολαβούμενη από ER, ενώ εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Pagano MT. et al, 2020). Ο υποδοχέας ERβ αποτελείται από 530 κατάλοιπα και το μοριακό βάρος ανέρχεται στα 59,216 kDa, διαθέτει 9 ισομορφές οι οποίες δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς έως τώρα, από τις οποίες όμως φαίνεται μόνο η κύρια ισομορφή (ERβ-1) να είναι πλήρως λειτουργική και σύμφωνη με τα πρότυπα πυρηνικού υποδοχέα. Οι ισομορφές ERβ-2, ERβ-4, ERβ-5 δεν μπορούν να δημιουργήσουν ομοδιμερή και δεν είναι βιολογικώς δραστικές σε μονομερή μορφή. Φαίνεται ωστόσο να έχουν ρυθμιστικό ρόλο, καθώς παρουσία αγωνιστή μπορούν να συμβάλουν στην ενεργοποίηση του ERβ-1, ενώ η ισορροπία μεταξύ ομοδιμερών και έτεροδιμερών φαίνεται να ρυθμίζει τα επίπεδα μεταγραφικής ενεργοποίησης (Leung YK. et al, 2006).

Οι υποδοχείς ERα και ERβ παρά τις όποιες διαφορές, εμφανίζουν εξελικτικά υψηλή ομολογία στις δομικές και λειτουργικές τους περιοχές. Συγκεκριμένα, υπάρχει ομολογία της τάξης του 97% για την περιοχή DBD, 60% για την περιοχή πρόσδεσης του αγωνιστή AF-2. Και οι δύο διαθέτουν τις περιοχές AF-1 και AF-2, ενώ η μικρότερη ομολογία παρατηρείται στο αμινοτελικό άκρο όπου εντοπίζεται η AF-1 περιοχή, μόλις 16%.

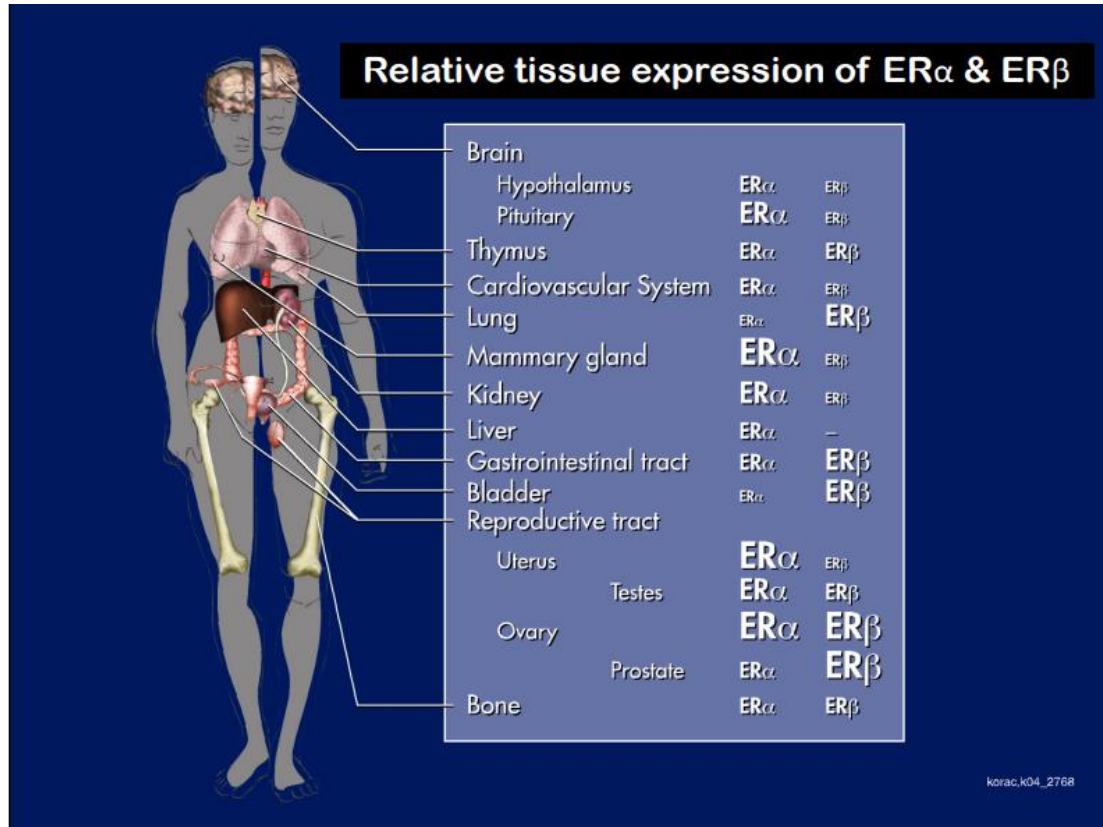


Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση των σημαντικότερων ισομορφών των υποδοχέων ERα και ERβ με την σειρά που αναφέρονται. Φαίνονται οι επικράτειες των υποδοχέων (A-F) και οι λειτουργικές περιοχές που τους συνιστούν (AF-1, DBD, LBD, AF-2). Στην κύρια ισομορφή του υποδοχέα ERβ αναγράφονται και τα ποσοστά ομολογίας μεταξύ αυτής και της κύριας ισομορφής του ER α (Heldring et al., 2007).

### Κατανομή των υποδοχέων ERα και ERβ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων μπορούν να ανιχνευθούν σε όλο τον ανθρώπινο οργανισμό και σε περισσότερο του ενός κυτταρικούς τύπους, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τα οιστρογόνα και ο μηχανισμός δράσης τους ρυθμίζει πολλές βιογενετικές διαδικασίες και είναι κύριας σημασίας για την ομοιοστάση του οργανισμού. Γενικά οι υποδοχείς παρουσιάζουν ένα κοινό πρότυπο κατανομής στον ανθρώπινο οργανισμό με ορισμένες διαφορές. Ο ERα εντοπίζεται σε σημαντικές ποσότητες στην μήτρα, τα ωάρια, στους όρχεις, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στους μαστούς, στα οστά και στον εγκέφαλο, στα επινεφρίδια, το σπλήνα, στον μυϊκό ιστό, και στους λεμφαδένες. Ο υποδοχέας ERβ εμφανίζει μειωμένο πρότυπο έκφρασης σε σχέση με τον ERα, με τις μέγιστες συγκεντρώσεις να παρατηρούνται στις ωοθήκες, στον θύμο αδένα, τον προστάτη, στην σπλήνα και στους πνεύμονες (Paterni I. et al, 2014). Η ισορροπία μεταξύ των δύο υποδοχέων φαίνεται να είναι αυτή που καθορίζει την απόκριση του ιστού στόχου στην παρουσία της οιστραδιόλης. Για παράδειγμα, σε μία έρευνα πάνω σε 8 διαφορετικές καρκινικές σειρές PaCa (Pancreatic Cancer), όπου και οι 8 είχαν διαφορετικό λόγο συγκέντρωσης ERβ/ERα, από 0,4 έως 11, βρέθηκε ότι ο οιστρογονοεξαρτώμενος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων εξαρτάται και μπορεί να προβλεφθεί άμεσα από τον λόγο συγκέντρωσης των υποδοχέων αυτών (Konduri S. et al, 2007). Η παρουσία των δύο υποδοχέων είναι καλά καταγεγραμμένη κατά μήκος του κεντρικού νευρικού συστήματος. Εκφράζονται σε όμοια ποσοστά στην προοπτική ζώνη, στον βασικό πυρήνα της

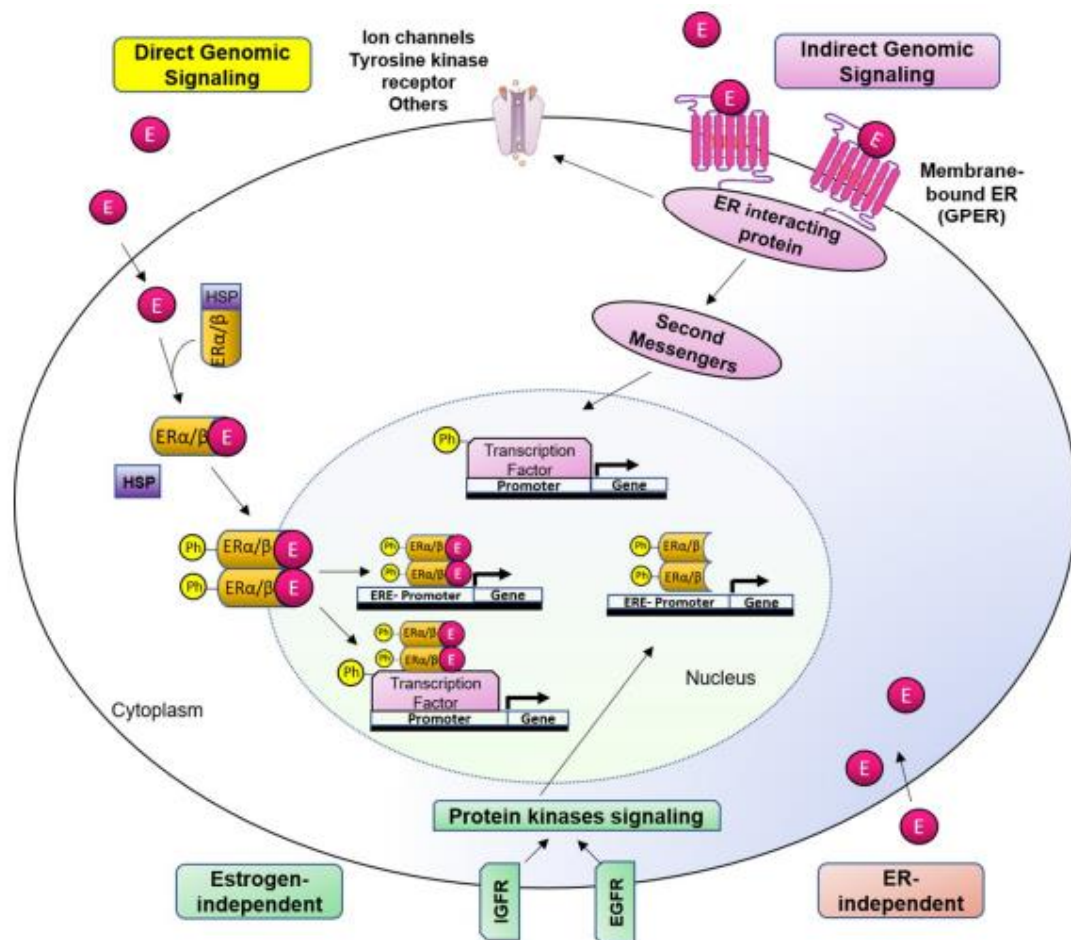
τελικής ταινίας, μέση αμυγδαλή και στον πυρήνα της μονήρους δεσμίδας. Ο ERα κυριαρχεί σε συγκεκριμένες περιοχές όπως στον μεσοκοιλιακό και τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου, ενώ ο ERβ σε περιοχές όπως στον υπερχιασματικό πυρήνα, τον υπόκαμπο, τον φλοιό και την παρεγκεφαλίδα. Τέλος, και οι δύο υποδοχείς εντοπίζονται και σε νευρογλοιακά κύτταρα, τα οποία έχουν υποστηρικτικό ρόλο. (Almeida A. et al, 2015).



Εικόνα 6: Συγκριτική κατανομή των υποδοχέων ERα και ERβ. Το μέγεθος της γραμματοσειράς του κάθε υποδοχέα αντιστοιχεί και στην σχετική συγκέντρωσή του στον ιστό. Τα δεδομένα προέρχονται από μελέτες μεταγραφομικής και πρωτεομικής σε άνθρωπο, αρουραίο και ποντικό. (Mueller et al. 2005).

### Μηχανισμοί δράσης υποδοχέων οιστρογόνων.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία και πολλές μελέτες, η σηματοδότηση διαμεσολαβούμενη από οιστρογόνα παρουσιάζει παραπάνω από ένα μηχανισμούς οι οποίοι αλληλοσυμπληρώνονται είτε εναντιώνονται. Σε πολλές περιπτώσεις παρουσία οιστραδιόλης το κύτταρο ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων υπεύθυνα για διαδικασίες όπως η προαγωγή του κυτταρικού κύκλου και η σύνθεση DNA, ενώ από την άλλη σημαντικός αριθμός γονιδίων καταστέλλεται από την παρουσία οιστραδιόλης, όπως προ-αποπτωτικά γονίδια και γονίδια επιδιόρθωσης DNA (Ikeda K. et al, 2015). Αν ληφθεί υπόψη η πληθώρα βιολογικών διεργασιών που ρυθμίζονται από την οιστραδιόλη, αυτό μπορεί να θεωρηθεί αναμενόμενο. Πιο συγκεκριμένα, η μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων φαίνεται να πραγματοποιείται με τους εξής μηχανισμούς: 1) Γενομική προσδετοεξαρτώμενη μεταγωγή σήματος, 2) Ανεξάρτητη του προσδέτη μεταγωγή σήματος 3) Δράση του συμπλόκου E2-ER ως συμπαράγοντας 4) Μη γενωμική μεταγωγή σήματος. (Hall JM. et al, 2001)



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση των 4 μηχανισμών ενεργοποίησης της σηματοδότησης διαμεσολαβούμενη από οιστρογόνα. (Nathalie Fuentes et al, 2019)

### Γενωμική προσδετοεξαρτώμενη μεταγωγή σήματος

Ονομάζεται και κλασικός μηχανισμός ενεργοποίησης, και σύμφωνα με τον μηχανισμό αυτό, οι υποδοχείς έχουν δράση προσδετοεξαρτώμενων μεταγραφικών παράγοντων. Ο υποδοχέας υπάρχει στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή μορφή, δεσμευμένος με δεσμευτικές πρωτεΐνες που αποτρέπουν τον όμο- ή έτεροδιμερισμό του. Η πρωτεΐνη συνοδός Heat Shock Protein 90 (HSP90) έχει την ικανότητα να δεσμεύει πυρηνικούς υποδοχείς και να αποτρέπει την ενεργοποίησή τους μέσω δομικών αλλαγών που προκαλεί. Στην περίπτωση του υποδοχέα οιστρογόνων, έχει βρεθεί πως η HSP90 αλληλεπιδρά με μεγάλο μέρος της LBD επικράτειας αλλά και τμήμα της DBD, το οποίο είναι απαραίτητο για την σταθερή πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA. Ωστόσο, ο Albert E. Fliss και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι παρουσία ενός ανταγωνιστή της HSP90, υπήρξε μείωση της συγγένειας της οιστραδιόλης για τους υποδοχείς οιστρογόνων. Συνεπώς, πέρα από τον αρνητικό ρυθμιστικό ρόλο της HSP90, φαίνεται να είναι αναγκαία για την ικανοποιητική πρόσδεση της οιστραδιόλης στον ανενεργό υποδοχέα.

Επίσης, η προηγούμενη δεν είναι η μόνη ρυθμιστική πρωτεΐνη των ERs, καθώς έχει δειχθεί ότι σε ανενεργή μορφή οι ERs μπορούν να σχηματίσουν ανασταλτικά πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα και να μεταφερθούν στον πυρήνα (Hall JM. et al, 2001).

Η παρουσία της οιστραδιόλης απελευθερώνει τους υποδοχείς οιστρογόνων από τα ρυθμιστικά σύμπλοκα στα οποία ευρίσκονταν και οι δομικές αλλαγές που προκαλούνται ευνοούν τον όμο ή έτεροδιμερισμό τους (Le Dily F. et al, 2018). Το σύμπλοκο ER/E2 μεταφέρεται στον πυρήνα όπου προσδένεται στα cis-ρυθμιστικά στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (ERE's) των γονιδίων στόχων, τις περιοχές ERE, όπου και μπορούν είτε άμεσα είτε έμμεσα να ρυθμίζουν την μεταγραφική δραστηριότητα προσελκύνοντας ρυθμιστικούς παράγοντες, ορισμένοι από τους οποίους είναι οι πρωτεΐνες CBP/p300, SRC-1, GRIP1, PGC-, AIB1, TRAP220, PGC-1. Η περιοχή AF-2 είναι κύριας σημασίας για την στρατολόγηση ενεργοποιητικών συμπαραγόντων της μεταγραφής, καθώς διαθέτει μια υψηλά συντηρημένη αμφιπαθή α-έλικα (H12), η οποία είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση με τους μεταγραφικούς παράγοντες τις οικογένειας SRC (Henttu PM. et al, 1997) . Με όμοιο τρόπο δρα και η περιοχή AF-1, ενώ ανάλογα τον κυτταρικό τύπο και το είδος του υποκινητή, μπορούν να στρατολογήσουν ίδιους ή διαφορετικούς ρυθμιστικούς παράγοντες.

Παρότι υπάρχει μια συναινετική αλληλουχία για την περιοχή ERE στην οποία το σύμπλοκο ER/E2 προσδένεται με μέγιστη συγγένεια, πολλά από τα γονίδια τα οποία ρυθμίζονται από την οιστραδιόλη αποκλίνουν από αυτή, με συνέπεια να μην υπάρχει η ίδια μεταγραφική ενεργοποίηση για όλα τα γονίδια. Με ολιστικές γονιδιωματικές μεθόδους βρέθηκε ότι υπάρχουν περίπου 70.000 ERE περιοχές διάσπαρτες στο γονιδίωμα, με μόνο 17.000 να βρίσκονται κοντά σε σημεία έναρξης μεταγραφής, ενώ μόνο 660 έδειξαν συντήρηση ανάμεσα σε είδη (Bourdeau V. et al, 2014). Οι περιοχές αυτές έχουν χαρακτηριστικά και ενισχυτών αφού μπορούν να εντοπιστούν έως και 5kb ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής. Τέλος, έχει βρεθεί ότι ορισμένες αλληλουχίες ERE μπορούν να προκαλέσουν αλλοστερικές αλλαγές στην δομή του συμπλόκου ER-E2, με τέτοιο τρόπο ώστε να τροποποιούν την συγγένεια του συμπλόκου με συνενεργοποιητές και άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να τροποποιείται η βιολογική δραστηριότητα της οιστραδιόλης (Hall JM. et al, 2002).

### **Ανεξάρτητη του προσδέτη μεταγωγή σήματος**

Όπως οι περισσότεροι πυρηνικοί υποδοχείς, έτσι και οι υποδοχείς οιστρογόνων έχει βρεθεί ότι μπορούν να φωσφορυλιωθούν σε πολλαπλά κατάλοιπα από ενδοκυτταρικές κινάσες. Για παράδειγμα, για τον υποδοχέα ERα, έχουν ταυτοποιηθεί 5 κατάλοιπα τα οποία επιδέχονται φωσφορυλίωση *in vivo*, συγκεκριμένα τα κατάλοιπα Ser104, Ser106, Ser118, Ser167 και η Tyr537. Παρουσία οιστραδιόλης, ο ERα είναι υπερφωσφορυλιωμένος, με το κύριο κατάλοιπο αποδέκτη να είναι η Ser118 (Arnold SF. et al, 1995). Κινάσες όπως η cdk2 (cyclin dependant kinase 2), η cdk7 και η κινάση της καζεΐνης έχουν βρεθεί να φωσφορυλιώνουν τον υποδοχέα ERα στην AF-1 επικράτεια. Η φωσφορυλίωση της Ser118 είναι απαραίτητη για την έκφραση γονιδίων στόχων της οιστραδιόλης στα οποία το σύμπλοκο E2-ER δεν προσδένεται απευθείας στο DNA, αλλά ρυθμίζει την μεταγραφή μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, καθώς σε μία μελέτη όπου η ser118 αντικαταστάθηκε με αλανίνη, κατάλοιπο το οποίο δεν επιδέχεται μέτα-μεταφραστική τροποποίηση, υπήρξε καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων της οιστραδιόλης c-myc και cyclin D1. Απουσία Ser118 υπήρξε σημαντική μείωση στα επίπεδα γονιδίων στόχων όπου το σύμπλοκο E2-ER δρα μέσω ERE περιοχών,

όπως το γονίδιο pS2. Το τελευταίο αποδείχθηκε και με μειωμένο σήμα από ένα κατασκευάσμα ERE-Λουσιφεράσης (Duplessis TT. et al, 2011). Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα ERβ είναι λιγότερο μελετημένη σε σχέση με τον ERα, με μόλις μία ερευνητική ομάδα να έχει ασχοληθεί. Βρέθηκε στην μελέτη αυτή ότι αποδέκτες φωσφορυλίωσης στον ERβ είναι τα κατάλοιπα ser106 και ser 124, τα οποία εντοπίζονται σε συναινετική αλληλουχία φωσφορυλίωσης από την MAPK κινάση. (Tremblay A. et al, 1999).

Το γεγονός ότι ο υποδοχέας ERα επιδέχεται φωσφορυλίωση τον καθιστά ικανό να αποκρίνεται σε καταρράκτες σηματοδότησης από κινάσες άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών. Η παρατήρηση αυτή ξεκίνησε από το γεγονός ότι όταν χορηγήθηκε ένας ενεργοποιητής της PKA, το 8-bromo-cAMP, και ένας μη επιλεκτικός αναστολέας φωσφατάσης, παραδόξως υπήρξε έντονη μεταγραφή ενός καλά χαρακτηρισμένου γονιδίου στόχου της οιστραδιόλης, του cPRA, που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της προγεστερόνης, απουσία της οιστραδιόλης. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα σάλπιγγας όρνιθας (Denner LA. et al, 1990). Το γεγονός αυτό έθεσε υπό ερώτηση το δόγμα ότι οι πυρηνικοί υποδοχείς απαιτούν την παρουσία του προσδέτη τους για να εκδηλώσουν βιολογική δράση. Πέρα από την κινάση PKA, η κινάση PKC και εξωτερικά ερεθίσματα όπως πεπτιδικό αυξητικό παράγοντες, κυτοκίνες και νευροδιαβιβαστές, αλλά και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου έχουν βρεθεί να επηρεάζουν την βιολογική δραστηριότητα του υποδοχέα ER. Επίσης, έχει βρεθεί ότι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGF έχει παρόμοια αποτελέσματα με την χορήγηση οιστραδιόλης στην μήτρα ποντικών και δρα ως μερικός αγωνιστής, καθώς η χορήγηση ενός συνθετικού ανταγωνιστή της οιστραδιόλης (ICI164,384) μειώνει σε μεγάλο βαθμό τις δράσεις του EGF στον ER, χωρίς όμως να επηρεάζεται το κλασικό μονοπάτι σηματοδότησης EGF. Άλλοι πεπτιδικό αυξητικό παράγοντες με παρόμοια δράση με τον EGF είναι η ινσουλίνη, ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας IGF-1, και ο TGF-β. (Ignar-Trowbridge et al, 1996). Η επικοινωνία μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών φαίνεται να μεσολαβείται από την πρωτεΐνη p21, που ανήκει στην οικογένεια των RasGTPασών, και την MAPK κινάση, η οποία φωσφορυλιώνει τον ER στην Ser118, η οποία εντοπίζεται στην δομική επικράτεια AF-1 (Kato S. et al, 1995). Διαφορετικοί αυξητικοί παράγοντες φαίνεται να στοχεύουν διαφορετικά αμινοξέα του ER, καθώς στην περίπτωση της νευρικής κυτταρικής σειράς SK-N-BE μετά από χορήγηση ινσουλίνης, το κατάλοιπο-αποδέκτης της φωσφορυλίωσης εντοπίζεται στην AF-2 περιοχή (Patrone C. et al, 1998)

### **Δράση του συμπλόκου E2-ER ως συμπαράγοντας**

Για πάρα πολλά χρόνια υπήρχε η πεποίθηση ότι οι υποδοχείς οιστρογόνων είναι απαραίτητο για να εκδηλώσουν οποιαδήποτε βιολογική δράση ότι πρέπει να προσδεθούν απευθείας στο DNA σε κάποια ERE περιοχή. Σήμερα, γνωρίζουμε πως αυτό δεν συμβαίνει, καθώς το σύμπλοκο E2-ER μπορεί να λειτουργήσει ως συμπαράγοντας και να διαδραματίσει επικουρικό ρόλο στην μεταγραφή γονιδίων. Η δράση αυτή ως συμπαράγοντας έρχεται σε συμφωνία με το γεγονός ότι το 35% των γονιδίων που έχει βρεθεί να ρυθμίζονται από την οιστραδιόλη, δεν περιέχουν ERE περιοχή ανοδικά ή καθοδικά της θέσης έναρξης μεταγραφής (Marino et al, 2006). Ο μηχανισμός αυτός λειτουργεί μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και την παρουσία διαφορετικών στοιχείων απόκρισης. Ένας σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας που αποτελεί σκαλωσιά για το σύμπλοκο E2-ER είναι η πρωτεΐνη Sp-1. Η Sp-1 αποτελείται από 785 κατάλοιπα και το μοριακό της βάρος ανέρχεται στα 81 kDa. Διαθέτει τρία μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου στο καρβοξυτελικό της άκρο με τα οποία προσδέεται σε GC πλούσιες περιοχές των υποκινητών, και έχουν ρόλο στην αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Li L. et al, 2014).



Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι η παρουσία υποδοχέων οιστρογόνων βοηθά τον μεταγραφικό παράγοντα να προσδεθεί στις GC περιοχές των υποκινητών, με ορμονο-ανεξάρτητο τρόπο. Κάποια χαρακτηριστικά γονίδια τα οποία ρυθμίζονται μεταγραφικά από το σύμπλοκο Sp-1-ER είναι: ο υποδοχέας LDL, ο υποδοχέας προγεστερόνης β, η επιθηλιακή νιτρική συνθάση, οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT5 και GATA1 και οι υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος 1<sup>α</sup> (Fuentes N. et al, 2019).

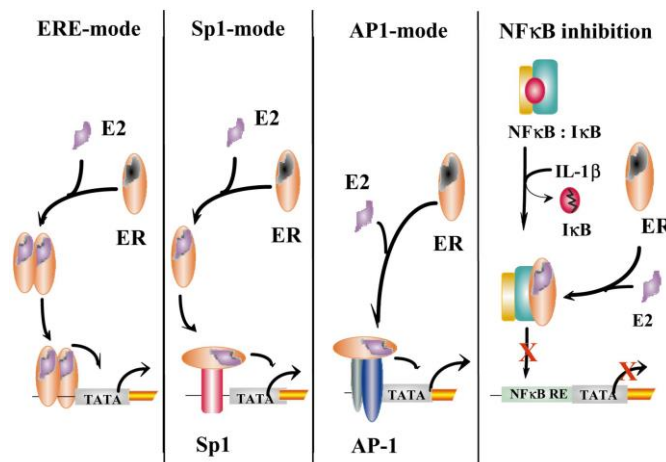
Επιπλέον, οι υποδοχείς ER μπορούν και δεσμεύονται με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ μέσω της c-rel υπομονάδας του. Αυτή η αλληλεπίδραση αποτρέπει τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ από το να προσδεθεί στον υποκινητή της Il-6, το οποίο εξηγεί την αντιφλεγμονώδη δράση των οιστρογόνων (Kalaitzidis D. et al, 2005). Επίσης, οι υποδοχείς ERs έχει βρεθεί να αλληλεπιδρούν με μία πληθώρα άλλων μεταγραφικών παραγόντων, μεταξύ αυτών οι ATF-2, c-jun, CREB και NF-Υ. Οι υποδοχείς οιστρογόνων μπορούν επιπλέον να ενισχύσουν την μεταγραφή γονιδίων τα οποία ρυθμίζονται από τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1. Ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 πρόκειται για ετεροδιμερές το οποίο συνίσταται από πρωτεΐνες της οικογένειας ATF c- c-Jun, Fos και τους συνεργάτες διμερισμού της Jun (JDP) (Raegan O'Lone et al, 2014). Το ενδιαφέρον με την αλληλεπίδραση με τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1 έγκειται στο γεγονός ότι παρόλο που και ο ERα και ο ERβ ρυθμίζουν την μεταγραφή γονιδίων εξαρτώμενων από τον AP-1, το κάνουν με αντίθετα αποτελέσματα παρουσία οιστραδιόλης (Paech K. et al, 1997) Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει, με την χρήση ενός κατασκευάσματος AP1-ERE-Luciferase, ότι η E2 δρα ως ενεργοποιητής της μεταγραφής γονιδίων ελεγχόμενα από AP-1 κατά την ύπαρξη μόνο ERα, ενώ παρουσία μόνο ERβ, η μεταγραφή αναστέλλεται. Παραδόξως, η ίδια ομάδα βρήκε ότι παρουσία των αντιοιστρογονικών ουσιών tamoxifen και raloxifene, επιτράπηκε η εξαρτώμενη από AP-1 μεταγραφή, παρουσία ERβ. Ο μηχανισμός που εξηγεί το φαινόμενο αυτό προτείνει ότι η περιοχή DBD του συμπλόκου αντιοιστρογόνου- ERβ μπορεί και δεσμεύει συν-απενεργοποιητές του AP-1. Συνεπώς, η μεταγραφή των γονιδίων που ρυθμίζονται από AP-1 δεν εξαρτάται από τις AF-1 και AF-2 περιοχές (Webb P. et al, 1998).

### **Μη γενωμική μεταγωγή σήματος**

Η κλασική προσέγγιση για την ενεργοποίηση της σηματοδότησης από τους υποδοχείς ER, προϋποθέτει την δέσμευση ενός λιπόφιλου μορίου από τον υποδοχέα, τον όμο- ή έτεροδιμερισμό του, την μετατόπιση του στον πυρήνα, και την δέσμευση στις αλληλουχίες ERE και την συναρμολόγηση του μεταγραφικού συμπλόκου στην περιοχή του, την δημιουργία mRNA, ώστε τελικά να μεταφραστεί από τα ριβοσώματα και να παραχθεί το τελικό προϊόν. Ωστόσο η επιστημονική κοινότητα παρατήρησε ότι κάποιες αποκρίσεις στην ύπαρξη οιστρογόνων ήταν πάρα πολύ ταχείες για να είναι προϊόντα κλασικής ρύθμισης από οιστρογόνα. Οι πρώτες αναφορές για ταχείες αποκρίσεις προέρχονται από το 1960-1980, όπου δύο ομάδες έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική μεταβολή στα επίπεδα c-AMP αλλά και στην κινητοποίηση των επιπέδων ασβεστίου (Pietras RJ et al, 1975). Αργότερα, το 1997 ταυτοποιήθηκε ένας διαμεμβρανικός 7TM υποδοχέας, ο οποίος ονομάστηκε GPR30 (Carmeci C. et al, 1997). Η πολύ υψηλή ομολογία ως προς την αμινοξική του αλληλουχία με τον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 8 και με τον υποδοχέα της αγγειοτενσίνης 2, έκανε τους ερευνητές να πιστεύουν ότι ο προσδέτης του ήταν κάποια κυτοκίνη ή κάποιο πεπτίδιο, χωρίς αυτό να είναι αληθές. Το 2004, μία ομάδα έδειξε ότι το πρωτο-ογκογονίδιο c-fos ήταν αυξορυθμισμένο σε μία κυτταρική σειρά (f SKBr3) η οποία ήταν ERKO. Η ίδια ομάδα βρήκε ότι με παροδική σίγηση του GPR30 η αλλαγή στα μεταγραφικά επίπεδα του c-fos εξισορροπείται, δίνοντας μία πρώτη απάντηση για τον προσδέτη του GPR30 (Maggiolini M. et al, 2004). Ακολούθησαν και άλλες ομάδες οι οποίες με την σειρά τους επιβεβαίωσαν ότι ο in vivo αγωνιστής του GPR30 είναι η οιστραδιόλη, και πως δρα ως ένας μεμβρανοσύνδετος

ER. Ως συνέπεια, ο GPR30 αναγνωρίστηκε επισήμως και μετονομάστηκε σε GPER (G-protein coupled ER) από την Παγκόσμια Ένωση Βασικής και Κλινικής Φαρμακολογίας το 2007.

Η κατανομή του GPER ακολουθεί αυτή των κλασικών ER, ενώ εντοπίζεται και σε ιστούς όπως ο πλακούντας, το ήπαρ, ο εγκέφαλος, ο προστάτης, οι ωθήκες, το αγγειακό σύστημα, το μυοσκελετικό σύστημα, τα κύτταρα ανοσοποιητικού και στον λιπώδη ιστό μεταξύ άλλων (Luo J et al, 2020). Όσο αφορά τον μηχανισμό δράσης, ο GPER ενεργοποιεί τον EGFR κυρίως μέσω της Gβγ υπομονάδας του, και έπειτα ξεκινά ένα μονοπάτι σηματοδότησης όπου φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται οι MAPK κινάσες, η PI3K κινάση, αυξάνεται η συγκέντρωση c-AMP που ενεργοποιεί την PKA, και αυξάνονται οι ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις (Fuentes N. et al, 2019). Οι κινάσες αυτές μέσω των δικών τους μονοπατιών σηματοδότησης ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Η Gα<sub>s</sub> υπομονάδα του GPER είναι υπεύθυνη για την PKA σηματοδότηση (Thomas P. et al, 2010). Οι κινάσες που αναφέρθηκαν έχει βρεθεί να φωσφορυλιώνουν πλήθος μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι πρωτεΐνες Elk-1, CREB(C/EBPβ), NF-κB, και τους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας STAT (Fuentes N. et al, 2019). Γονίδια που έχει βρεθεί να ελέγχονται από τον υποδοχέα GPER είναι f c-fos, CTGF, Egr1, μεταξύ άλλων (Puro et al, 2012). Τέλος, ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι μελέτες υποκυτταρικής εντόπισης έδειξαν πως ο GPER υποδοχέας μπορεί να εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ωστόσο εντοπίζεται στο μεγαλύτερο ποσοστό του στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Ο GPER πρόκειται για έναν παράδοχο GPCR, καθώς σε αδιαφοροποίητους μυοβλάστες εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, ενώ κατά την πρόοδο της διαφοροποίησης μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα όπου και ρυθμίζει την απόκριση σε E2 (Ronda AC et al, 2015) ενώ αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ενεργοποιείται ενδοκυτταρικά, μεταναστεύει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και εκδηλώνει με αυτή ως αφητηρία την δράση του (Revankar CM et al, 2005).



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση των κύριων μηχανισμών ενεργοποίησης της σηματοδότησης μέσω ER υποδοχέων. Αρχικά φαίνεται ο κλασικός προσδετοεξαρτώμενος μηχανισμός, ενώ στην συνέχεια φαίνεται ο έμμεσος μηχανισμός ενεργοποίησης που μεσολαβείται από τους μεταγραφικούς παράγοντες Sp1 και AP-1. Τέλος, φαίνεται η καταστολή της μεταγραφής γονιδίων μέσω δέσμευσης του NF-κB, αποτρέποντας τον να συνδεθεί στα στοιχεία απόκρισης του (Stefan Nilsson et al, 2001).

### Βασικές διαφορές υποδοχέων ERα και ERβ

Ο υποδοχέας οιστρογόνων α ήταν ο πρώτος υποδοχέας οιστρογόνων που ταυτοποιήθηκε, μόλις το 1973 (Jensen EV et al, 1973). Είναι ο κύριος υποδοχέας μέσω του οποίου εκδηλώνονται οι βιολογικές δράσεις των οιστρογόνων στους ιστούς. Εντοπίζεται σχεδόν

οικουμενικά στο σώμα, κυρίως στα αναπαραγωγικά όργανα, αλλά και στο μαστό, στο ήπαρ, στο μυοσκελετικό, στον λιπώδη ιστό, στον εγκέφαλο και στους νεφρούς. Έχει συσχετιστεί με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων εκ των οποίων αρκετές είναι απειλητικές για την ζωή, όπως για παράδειγμα διάφοροι τύποι καρκίνου και στα δύο φύλλα. Ο ERα κωδικοποιείται από την χρωμοσωμική περιοχή 6q25.1, ενώ ο ERβ κωδικοποιείται από την χρωμοσωμική περιοχή 14q23.2. Διαθέτουν, όπως είναι κοινό για πυρηνικούς υποδοχείς, τις επικράτειες AF-1, όπου ρυθμίζεται η ανεξάρτητη του προσδέτη ενεργοποίηση, μία περιοχή DBD, υπεύθυνη για την πρόσδεση του συμπλόκου στο γονιδίωμα, μία περιοχή AF-2 που μεσολαβεί την ανεξάρτητη από προσδέτη ενεργοποίηση των ERs. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως μεταξύ των υποδοχέων ERα και ERβ, υπάρχει μόλις 16% ομολογία μεταξύ των AF-1 περιοχών, σχεδόν πλήρης ομολογία μεταξύ των DBD περιοχών, ενώ 59% ομολογία για την περιοχή AF-2, που περιέχει την θέση πρόσδεσης της οιστραδιόλης. Ωστόσο, οι διαφορές στον σημείο πρόσδεσης της οιστραδιόλης είναι ελάχιστες. Η σχετικά υψηλή αλλά όχι απόλυτη ομολογία των AF-2 περιοχών έχει επιτρέψει στους επιστήμονες να δημιουργήσουν επιλεκτικούς αγωνιστές/αναστολείς για κάθε υποδοχέα ξεχωριστά. Συγκεκριμένα, η πρόπυλοπυραζοτριόλη (PPT) αποτελεί επιλεκτικό αγωνιστή του υποδοχέα ERα, ενώ το 2,3-δι(4-υδροξυφενυλο)-προπιονιτρίλιο (DPN) είναι επιλεκτικός αγωνιστής του υποδοχέα ERβ. Η ανάπτυξη επιλεκτικών αγωνιστών είναι εξαιρετικά χρήσιμη κατά την βασική μελέτη των δύο υποδοχέων οιστρογόνων (Jia M. et al, 2015).

Με βάση ολιστικές μελέτες, η υψηλή ομολογία μεταξύ των DBD περιοχών συνεπάγεται και με κοινά πρότυπα πρόσδεσης στο γονιδίωμα, με πολλές από τις θέσεις πρόσδεσης των δύο υποδοχέων να αλληλεπικαλύπτονται. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η πρόσδεση ενός υποδοχέα μπορεί να μεταβάλλει τα πρότυπα πρόσδεσης του άλλου υπότυπου (Jia M. et al, 2015). Επιπλέον, οι υποδοχείς ERα και ERβ παρουσιάζουν διαφορετικές βιολογικές δράσεις, οι οποίες είναι πιθανό να μεσολαβούνται από τις ελάχιστες ομοιότητες που παρουσιάζουν στην AF-1 περιοχή. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η περιοχή AF-1 του ERα είναι εξαιρετικά ικανή να προκαλέσει την μεταγραφή ενός γονιδίου μάρτυρα, υπό την παρουσία E2 και ERE περιοχής, ενώ η ενεργοποίηση από την AF-1 περιοχή του ίδιου κατασκευάσματος, υπό της ίδιες συνθήκες, από τον ERβ βρέθηκε να είναι αμελητέα (Cowley SM. et al, 1997). Επιπροσθέτως, φαίνεται πως οι διαφορές στην περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη και για την διαφορετική απόκριση που παρατηρείται υπό την παρουσία δυο συνθετικών, καλά καθιερωμένων αντιοιστρογόνων, που χρησιμοποιούνται ευρέως στην θεραπεία του καρκίνου του μαστού, το tamoxifen και το raloxifene. Συγκεκριμένα, οι δύο αυτές ουσίες παρουσιάζουν δράση μερικού αγωνιστή όσο αφορά τον ERα, ενώ επιτελούν δράση μη συναγωνιστικού αναστολέα όσο αφορά τον ERβ (McDonnell DP et al, 1995).

### **Σχέση ERα-ERβ**

Οι δύο αυτοί υποδοχείς φαίνεται να έχουν συγκεκριμένες λειτουργίες, ενώ μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ERα και ERβ knock out μεταλλάγματα σε καρκινικές σειρές και μη, αποκαλύπτουν ότι η σχέση μεταξύ των δύο είναι κατά κύριο λόγο ανταγωνιστική. Αρχικά, ο υποδοχέας ERα εκφράζεται σε ποσοστό όχι περισσότερο του 10% των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων του μαστού, ενώ ο ERβ έχει μία πολύ μεγαλύτερη κατανομή, καθώς εκφράζεται περίπου 80% του φυσιολογικού μαστικού επιθηλίου. Ωστόσο, σε όγκους του μαστού, φαίνεται να υπάρχει σημαντική υπερέκφραση του ERα, με το ποσοστό έκφρασης να ανέρχεται σε 50-80% (Jia M. et al, 2015). Παράλληλα, υπάρχει σημαντική μείωση στα ποσοστά του ERβ, ο οποίος εκφράζεται σε πολύ μειωμένο βαθμό, ενώ σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές, υπάρχει ολοκληρωτική έλλειψη του. Το φαινόμενο αυτό, σύμφωνα με

έρευνα, οφείλεται στο γεγονός ότι η περιοχή υποκινητή του ERβ υπερμεθυλιώνεται ( Zhao C. et al, 2008) . Είναι γνωστό ότι η υπερμεθυλίωση σχετίζεται με μη μεταγραφικά ενεργές περιοχές, καθώς προκαλεί συσπείρωση της χρωματίνης, αποκλείοντας την πρόσβαση μεταγραφικών παραγόντων στα στοιχεία υποκινητή. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο ERβ έχει προστατευτική δράση και ανταγωνίζεται τις μιτογόνες δράσεις του ERα. Μελέτες σε ERα ΚΟ ποντικούς δείχνουν ότι είναι υπεύθυνος για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, και την ανάπτυξη του μαστικού αδένου (Couse JF. et al, 1999). Το 80% των μαστικών όγκων, εκφράζουν τον υποδοχέα ERα και αντιμετωπίζονται με ανταγωνιστές του. In vitro μελέτες έδειξαν ότι η επανέκφραση του υποδοχέα ERβ σε καρκινικές σειρές κατάφερε να σταματήσει τον επαγόμενο από ERα κυτταρικό πολλαπλασιασμό, να προωθήσει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων αλλά και να ενισχύσει την απόδοση των χημειοθεραπευτικών ουσιών (Trecek O. et al, 2020). Μάλιστα, σε μία μελέτη όπου έγινε παροδική έκφραση του υποδοχέα ERβ στην μαστική καρκινική σειρά T47D, η οποία κανονικά αποκρίνεται στην παρουσία οιστραδιόλης αποκλειστικά μέσω ERα, βρέθηκε ότι η παρουσία του υποδοχέα ERβ, όταν τα mRNA τους εκφράζονται ισόποσα, καταστέλλει πλήρως την ανάπτυξη τους παρουσία οιστραδιόλης. Με αναλύσεις qPCR, βρέθηκε ότι ο ERβ προκαλεί την μείωση έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (G1→S), και συγκεκριμένα προκαλεί την μείωση της κυκλίνης E, της Cdc25A (ενός κύριου ρυθμιστή της Cdk2, της p45<sup>Skp2</sup> (ρυθμιστής της πρωτεόλυσης του μορίου p27<sup>Kip1</sup>), και κατά συνέπεια αύξηση της p27<sup>Kip1</sup> που αποτελεί αναστολέα της Cdk (Ström A. et al, 2004). Συνεπώς, φαίνεται ότι ο ERβ αποτελεί ένα σημαντικό θεραπευτικό στόχο και είναι ανάγκη να μελετηθούν επιλεκτικοί αγωνιστές του ως πιθανή απάντηση σε ERα θετικούς όγκους.

### **ER και μιτοχόνδριο**

Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά οργανίδια μεγέθους 1μm κατά προσέγγιση, τα οποία έχουν κοκκιώδη μορφή και απαντώνται σε διαφορετικό αριθμό ανάλογα με τον ιστό, με τον μεγαλύτερο αριθμό να παρατηρείται σε ενεργειακά πολυδάπανους ιστούς. (καρδιακός μυς, σκελετικοί μύες). Το κύτταρο παρέχει τα βασικά υποστρώματα στο μιτοχόνδριο, το οποίο μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης τα μετατρέπει σε ATP, το βασικό ενεργειακό νόμισμα του οργανισμού. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια έχουν κύριο ρόλο στην αδρανοποίηση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), οι οποίες είναι επιζήμιες για την φυσιολογία του κυττάρου. Το μιτοχόνδριο διατηρεί δικό του γονιδίωμα, το οποίο κωδικοποιεί για τις περισσότερες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την οξειδωτική φωσφορυλίωση και για άλλες μεταβολικές διεργασίες. Ωστόσο, δεν κωδικοποιεί όλη την απαραίτητη πληροφορία και η γονιδιακή έκφραση των πρωτεϊνών αυτών ρυθμίζεται κατά κύριο λόγο από πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες.

Τα οιστρογόνα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική δράση και στην υγεία των μιτοχονδρίων. Ενεργοποίηση των υποδοχέων ERα και ERβ από την οιστραδιόλη μεσολαβεί για την έκφραση γονιδίων και μεταγραφικών παραγόντων που είναι απαραίτητα για τις μεταβολικές λειτουργίες των μιτοχονδρίων. Η οιστραδιόλη έχει προστατευτική δράση για τα μιτοχόνδρια, η οποία εκδηλώνεται με άμεσο ή έμμεσο τρόπο. Επίσης, η ρύθμιση του μεγέθους των μιτοχονδρίων αλλά και της λειτουργίας μεσολαβούμενη από τα οιστρογόνα εμπλέκεται στην προστασία του αγγειακού, νευρικού και καρδιακού ιστού, ενώ ρυθμίζουν τις περισσότερες διαδικασίες που πραγματοποιούνται εντός του μιτοχονδρίου, όπως η παραγωγή ATP, η παραγωγή ROS, η αντιοξειδωτική άμυνα, η ρύθμιση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης και η ρύθμιση των επιπέδων ασβεστίου. Επίσης, τα οιστρογόνα

εμπλέκονται στην μιτοχονδριακή βιογένεση μέσω της έκφρασης και καταστολής πυρηνικών και μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, μέσω της σύνδεσης του συμπλόκου E2/ER σε ρυθμιστικές περιοχές ERE. Ένας κύριος μεταγραφικός παράγοντας απαραίτητος για την ενεργειακή ομοιοστάση και την βιογένεση των μιτοχονδρίων, ο PGC-1<sup>α</sup>, όπως και η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NRF ρυθμίζονται άμεσα από τα επίπεδα οιστραδιόλης. Συγκεκριμένα, ο NRF1 φαίνεται να εμπλέκεται στην έκφραση πυρηνικά-κωδικοποιούμενων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, αλλά και μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Η τελευταία δράση συμβαίνει εξαιτίας της έκφρασης του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα mtTFA. Μετά από πρωτεομική ανάλυση καρδιακού ιστού σε ποντίκια που είχαν υποστεί χειρουργική αφαίρεση των ωαρίων, βρέθηκε αξιοσημείωτη μείωση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, την οξειδωτική φωσφορυλίωση, τον μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων, αλλά και πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μεταβολικό στρες και την απόπτωση (Lancaster TS. et al, 2012). Επιπλέον, σε ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε ποντικούς που δεν εκφράζαν τους ERs στους σκελετικούς μυς, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα κατανάλωσης οξυγόνου σε ηρεμία αλλά και υπό άσκηση, και υπέρμετρη παραγωγή ROS. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε δυσλειτουργία στο αναπνευστικό σύμπλοκο I, το οποίο αποδόθηκε στην μειωμένη έκφραση της μιτοχονδριακής DNA πολυμεράσης Polg1 (Hevener AL. et al, 2020).

Η παρουσία των υποδοχέων οιστρογόνων  $\alpha$  και  $\beta$  έχει ταυτοποιηθεί πειραματικά στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων πληθώρας κυτταρικών τύπων. Την αυξημένη παρουσία των υποδοχέων συνόδεψε το γεγονός ότι βρέθηκε σημαντική αλλαγή στα μεταγραφικά επίπεδα μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Χορήγηση του μη συναγωνιστικού αναστολέα (ICI-182780) των ERs κατέστειλε τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω ότι οι υποδοχείς οιστρογόνων ρυθμίζουν βιολογικά την λειτουργία των μιτοχονδρίων (Chen JQ et al, 2004). Επιπλέον, με την βοήθεια βιοπληροφορικών μεθόδων ταυτοποιήθηκε μία αμινοξική αλληλουχία στον ER $\beta$  που πιθανώς μετέχει στην μεταβίβαση του στο μιτοχόνδριο, ενώ έχουν βρεθεί και αρκετές αλληλουχίες EREs στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Φαίνεται ωστόσο ότι η  $\beta$  ισομορφή είναι εκείνη που μεσολαβεί τις περισσότερες δράσεις των οιστρογόνων. Ερευνητές υπερέκφρασαν τον υποδοχέα ER $\beta$  σε μιτοχόνδρια νευρικών κυττάρων N2A, και βρήκαν ότι τα κύτταρα αυτά έδειξαν αυξημένη αντίσταση στην απόπτωση διαμεσολαβούμενη από σταυροσπορίνη και υπεροξειδίο του υδρογόνου, το οποίο επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από τα μειωμένα επίπεδα κασπάσης 3 και 9, τα αυξημένα επίπεδα ATP, αλλά και την αντίσταση στην αναστολή της φυσιολογικής μιτοχονδριακής λειτουργίας παρουσία E2 (Tsiatas I. et al, 2021). Οι μηχανισμοί δράσης του ER $\alpha$  δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι και παραμένουν υπό διερεύνηση.

## **ER $\alpha$ και παθοφυσιολογία**

### **Καρκίνος του μαστού**

Η οιστραδιόλη είναι η κύρια ορμόνη υπεύθυνη για την ανάπτυξη των θηλυκών δευτερευόντων χαρακτηριστικών. Ο μαστικός αδένας εξαρτάται από την οιστραδιόλη για την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των μαστικών κυττάρων. Το 80% των όγκων του μαστού, εκφράζουν τον υποδοχέα ER $\alpha$ , και εξαρτώνται από την οιστραδιόλη για την ανάπτυξη και την επιβίωση τους. Η παρουσία ER $\alpha$  στα καρκινικά μαστικά κύτταρα αποτελεί θετικό σημάδι

πρόγνωσης, καθώς μέσω χορήγησης αντιοιστρογονικών ουσιών, οι οποίες δρουν ως μη αντιστρεπτοί ανταγωνιστές του υποδοχέα ERα, μπορεί να καταπολεμηθεί η ανάπτυξη του όγκου. Χαρακτηριστικό αντικαρκινικό φάρμακο έναντι του καρκίνου του μαστού με τέτοια δράση είναι το tamoxifen, το οποίο χορηγείται σε ERα θετικούς όγκους. Ωστόσο, φαίνεται πως το 30-50% των πασχόντων υποτροπιάζουν, καθώς ο όγκος αποφεύγει την εξελικτική πίεση μειορρυθμίζοντας την έκφραση του υποδοχέα ERα. Επίσης, η ισομορφή του υποδοχέα οιστρογόνων α, ERα36 έχει βρεθεί να σχετίζεται με την επιθετικότητα, την πιθανότητα μετάστασης αλλά και τις πιθανότητες θεραπείας του όγκου. Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας οιστρογόνων ERα36 ανταγωνίζεται με τον υποδοχέα οιστρογόνων ERα για τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης, αλλά επειδή εντοπίζεται κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, η δράση του μεσολαβείται κυρίως από καταρράκτες μη-γενωμικής σηματοδότησης. Σε μελέτες, βρέθηκε ότι η υπερέκφραση της ισομορφής ERα36 προκαλεί την αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων MCF-7, ενώ αναστέλλει την μεταγραφή γονιδίων που ρυθμίζονται από τον υποδοχέα οιστρογόνων ERα, όπως αυτά της κυκλίνης D1 αλλά και του pS2 (Jia M. et al, 2015).

### Ενδομητρίωση

Η ενδομητρίωση είναι μια συχνή και χρόνια φλεγμονώδης καλοήθης γυναικολογική πάθηση με επιπτώσεις στην υγεία, την αναπαραγωγή και την ποιότητα ζωής, που εμφανίζεται στο 6-10% των γυναικών. Σε γυναίκες που πάσχουν από ενδομητρίωση, παρατηρείται ανάπτυξη ιστού που μοιάζει με ενδομήτριο έξω από την κοιλότητα της μήτρας. Σημεία που μπορεί να παρατηρηθεί εκτοπική ανάπτυξη είναι οι ωθήκες, οι σάλπιγγες, το πυελικό περιτόναιο, το παχύ και λεπτό έντερο και σπανιότερα ακόμα και σε άλλα όργανα. Τα κλασικά συμπτώματα που παρατηρούνται είναι ο πυελικός πόνος εκτός έμμηνου κύκλου, δυσμηνόρροια, δυσπαρέυνια αλλά και υπογονιμότητα. Σε ορισμένες περιπτώσεις δεν παρατηρούνται συμπτώματα. Τα ενδομητριοειδή κύτταρα υφίστανται τις κυκλικές μεταβολές των ορμονών που παράγουν οι ωθήκες κατά τον καταμήνιο κύκλο και ανταποκρίνονται με παρόμοιο τρόπο με τα κύτταρα του ενδομητρίου, και κατά συνέπεια εκφράζουν τους υποδοχείς ERα και ERβ. Η επικρατέστερη θεωρία για την εγκαθίδρυση του εκτοπικού ιστού υποστηρίζει πως είναι φαινόμενο της ανάδρομης έμμηνης ρύσης, όπου επιθηλιακά και στρωματικά κύτταρα της μήτρας εμφυτεύονται στο περιτόναιο. Μελέτες έδειξαν πως ο ERα είναι απαραίτητος για την προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και την νεοαγγειογένεση, που συμβάλλει στην επιβίωση του εκτοπικού ιστού. (Burns KA. et al, 2012). Παρά τον σημαντικό ρόλο του ERα, ο λόγος ERα/ERβ είναι αισθητά μειωμένος σε σχέση με το φυσιολογικό ενδομήτριο, με τον ERβ να υπερτερεί. Μελέτες έχουν δείξει πως τα χαμηλά επίπεδα του ERα μπορεί να προέρχονται από μεσολαβούμενη από ERβ καταστολή (Trukhacheva E. et al., 2009), αλλά και σε ανώμαλη μεθυλίωση της περιοχής T-MDR (Tissue-dependent and Differentially-Methylated Region), καταστέλλοντας την μεταγραφή.

### Καρκίνος του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη είναι μια ασθένεια η οποία εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τα ανδρογόνα για την ανάπτυξη της. Ωστόσο, φαίνεται πως και τα οιστρογόνα συμμετέχουν σε σημαντικό βαθμό. Συγκεκριμένα, μελέτη σε ERα KO ποντικούς έδειξε ότι υπάρχει δυσγένεση στις χαρακτηριστικές διακλαδώσεις που σχηματίζει ο προστάτης (Omoto Y. et al , 2015).

Γενικά, ο καρκίνος του προστάτη μπορεί να κατηγοριοποιηθεί, ανάλογα το στάδιο ανάπτυξης, σε τρία στάδια: ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία, τοπικός όγκος, προηγμένο αδενοκαρκίνωμα του προστάτη, και εν τέλει μεταστατικός όγκος του προστάτη. Έρευνες έδειξαν ότι τα επίπεδα του ERα αυξάνονται κατά την προαγωγή της νόσου, τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο και έχουν ενεργό ρόλο στην καρκινογένεση (Ricke WA. et al, 2008). Στο φυσιολογικό επιθήλιο, μικρά επίπεδα ERα ανιχνεύονται, ενώ ο ERβ είναι ο επικρατέστερος υποδοχέας. Στον όγκο του προστάτη, τα επίπεδα του ERβ μειώνεται δραματικά όσο προσδεύει η νόσος, εξαιτίας υπερμεθυλίωσης του υποκινητή. In vitro πειράματα σε κυτταρικές σειρές προστατικών όγκων έδειξαν ότι χορήγηση αναστολέων DNA μεθυλοτρανσφερασών και απακετυλασών των ιστονών, μείωσαν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού και αύξησαν τα επίπεδα απόπτωσης των κυττάρων (Walton TJ. et al, 2008).

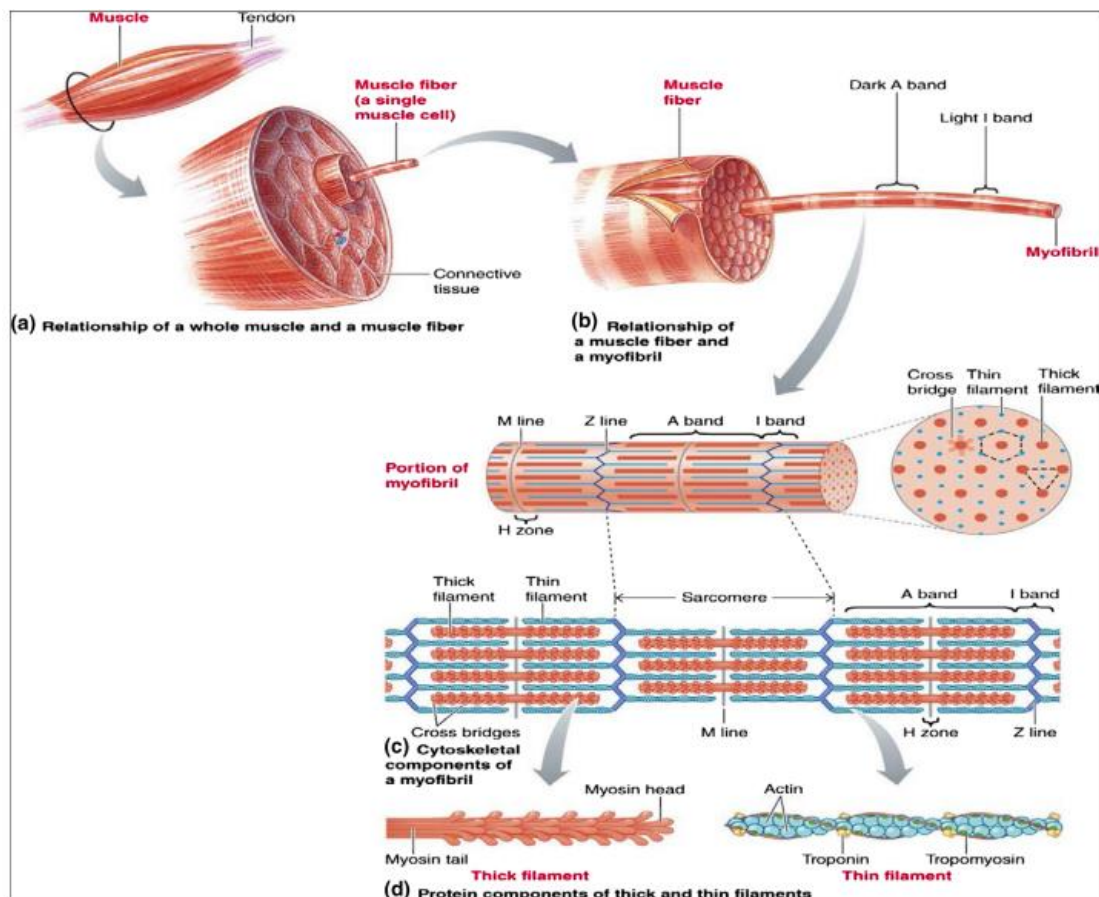
### **Σκελετικός μυς**

Οι σκελετικοί μύες ανήκουν στην κατηγορία των γραμμωτών μυών, μαζί με τον καρδιακό μυ, του ανθρώπινου σώματος, εξαιτίας της χαρακτηριστικής δομής που παρουσιάζουν κάτω από το μικροσκόπιο. Έχει βρεθεί ότι συνιστούν το 40% της ολικής σωματικής μάζας στους άντρες, και 32% στις γυναίκες, ενώ οι λείοι μύες και ο καρδιακός αποτελούν το 10%. Βασικό χαρακτηριστικό των σκελετικών μυών είναι ότι ανήκουν στους εκούσιους μυς, δηλαδή η σύσπαση τους ρυθμίζεται από την θέληση.

### **Δομή σκελετικού μυός**

Κάθε σκελετικός μυς αποτελείται από πολυάριθμες μυϊκές ίνες, οι οποίες αποτελούν την βασική δομική μονάδα. Οι μυϊκές ίνες είναι μεγάλα επιμήκη κύτταρα, σχήματος κυλινδρικού, και περιβάλλονται από συνδετικό ιστό που ονομάζεται ενδομύιο. Οι μυϊκές ίνες, μαζί με τον συνδετικό ιστό που τις περιβάλλει, πακετάρονται μεταξύ τους με αποτέλεσμα να σχηματίζουν δεσμίδες μυϊκών ινών. Οι δεσμίδες των μυϊκών ινών περιβάλλονται και αυτές από συνδετικό ιστό, που ονομάζεται περιμύιο, ενώ ο μυς συνολικά περιβάλλεται και αυτός από συνδετικό ιστό που ονομάζεται επιμύιο. Οι μυϊκές ίνες προκύπτουν αναπτυξιακά από την συγχώνευση βλαστικών μυϊκών κυττάρων που ονομάζονται μυοβλάστες. Ως αποτέλεσμα, ένα χαρακτηριστικό των μυϊκών ινών είναι ότι διαθέτουν πολυάριθμους πυρήνες, κατανομημένους κυρίως στην περιφέρεια. Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό είναι ότι διαθέτουν ένα μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων, λόγω των αυξημένων απαιτήσεων σε ενέργεια, που είναι αναγκαία για την σύσπαση. Με την σειρά τους, οι μυϊκές ίνες αποτελούνται από μεγάλο αριθμό μυϊκών ινιδίων ή μυοϊνιδίων, κυλινδρικές δομές με διάμετρο 1μm που εκτείνονται κατά μήκος της μυϊκής ίνας. Τα μυϊκά ινίδια αποτελούν το 80% του όγκου της ίνας. Συνιστώνται από δύο τύπους κυτταροσκελετικών ινιδίων τα οποία είναι οργανωμένα με συγκεκριμένο τρόπο, τα παχέα νημάτια, τα οποία έχουν διάμετρο 12-18nm, και τα λεπτά νημάτια, με διάμετρο 5-8nm. Τα παχέα νημάτια αποτελούνται κυρίως από συμπλέγματα της πρωτεΐνης μυοσίνη, ενώ τα λεπτά νημάτια αποτελούνται από ακτίνη. Κατά την παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, γίνονται ορατές κάποιες συγκεκριμένες ζώνες που οριοθετούν το μυϊκό ινίδιο. Για παράδειγμα, η ζώνη A (ή αλλιώς σκοτεινή ζώνη A) αποτελείται από τα παχέα νημάτια, μαζί με τμήματα λεπτών νηματίων τα οποία επικαλύπτονται από τα δύο άκρα των παχέων νηματίων. Η ζώνη H, εμφανίζεται λιγότερο σκοτεινή, και είναι η περιοχή εκείνη στην οποία εντοπίζονται τα κεντρικά τμήματα των παχέων νηματίων που δεν επικαλύπτονται από λεπτά νημάτια. Την γραμμή M συνιστούν υποστηρικτές πρωτεΐνες των οποίων ο ρόλος είναι να διατηρούν τα παχέα νημάτια σε παράλληλη μεταξύ τους διάταξη. Η ζώνη I αποτελείται από τα υπόλοιπα τμήματα των λεπτών νηματίων που δεν επικαλύπτονται από

παχέα νημάτια. Στην μέση κάθε ζώνης I είναι ορατή μια πυκνή κάθετη γραμμή, γνωστή ως γραμμή Z. Μεταξύ δύο γραμμών Z, οριοθετείται το σαρκομερίδιο, το οποίο είναι και η λειτουργική μονάδα των μυών. Η γραμμή Z αποτελείται από πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, των οποίων ο ρόλος είναι να συνδέουν και να συγκρατούν τα λεπτά νημάτια δύο γειτονικών σαρκομεριδίων. Η ανάπτυξη του μυός οφείλεται στην προσθήκη νέων σαρκομεριδίων και όχι στην αύξηση του μεγέθους των υπαρχόντων (Sherwood et al, Human Physiology: From cell to systems).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός σκελετικού μυ, όπου φαίνονται όλα τα διακριτά μέρη. Στην εγκάρσια διατομή φαίνονται οι δεσμίδες των μυϊκών ινών, οι οποίες συγκρατούνται από το ενδομύιο. Η μυϊκή ίνα αποτελείται από πολυάριθμα μυϊκά ινίδια, τα οποία φέρουν διακριτές ζώνες με συγκεκριμένες λειτουργίες. Τέλος, φαίνεται το σαρκομερίδιο του μυϊκού ινιδίου, το οποίο αποτελείται από τα παχέα και τα λεπτά νημάτια, τα οποία συνεργάζονται για να επιτευχθεί η σύσπαση του μυ. (Walter R Frontera et al, 2014)

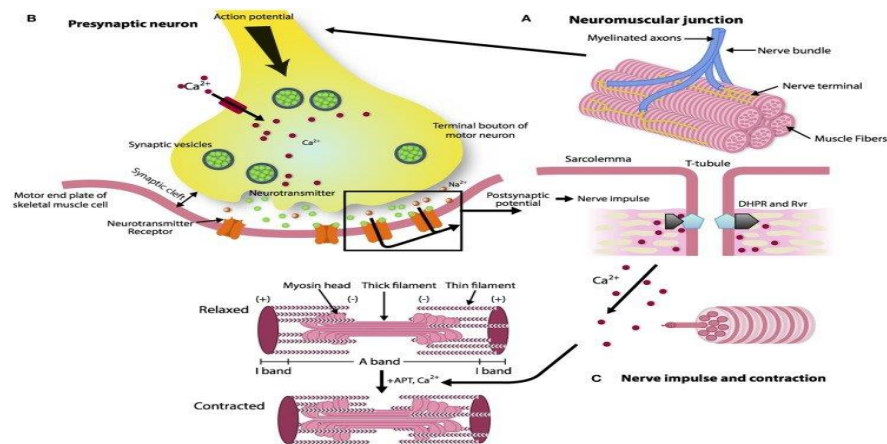
## Σύσπαση σκελετικού μυ

Η σύσπαση των μυών πραγματοποιείται μέσω της δυναμικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των παχέων και των λεπτών νημάτων, και συγκεκριμένα μεταξύ των μορίων μυοσίνης και ακτίνης. Η μυοσίνη είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο πανομοιότυπες υπομονάδες, και παρατηρούνται δύο διακριτά τμήματα. Αρχικά, τα επιμήκη ουριαία τμήματα περιελίσσονται το ένα στο άλλο, σε ένα σημείο κάμπτονται και εμφανίζεται μία άρθρωση, ενώ η κάθε υπομονάδα καταλήγει σε μία κεφαλή. Κάθε κεφαλή φέρει δύο βιοδραστικές θέσεις. Συγκεκριμένα, κάθε κεφαλή φέρει μία θέση πρόσδεσης της ακτίνης, και



μία θέση με ενεργότητα ΑΤΡάσης. Από την άλλη, τα λεπτά νημάτια αποτελούνται κυρίως από ακτίνη, ενώ συμμετέχουν και άλλες δύο πρωτεΐνες με συγκεκριμένους ρόλους, η τροπονίνη και η τροπομουσίνη. Κάθε μόριο ακτίνης διαθέτει μία θέση πρόσδεσης για την κεφαλή της μυοσίνης που προσδένει ακτίνη. Τα μόρια της ακτίνης πολυμερίζονται και δημιουργούν μια υπερελικωμένη μορφή όμοια με αυτή του δίκλωνου DNA. Η τροπομουσίνη, είναι μια πρωτεΐνη η οποία καλύπτει τις θέσεις πρόσδεσης της μυοσίνης όταν η μυϊκή ίνα βρίσκεται σε χάλαση. Τέλος, η τροπονίνη, μία πρωτεΐνη τριών πολυπεπτιδικών θέσεων, φέρει 3 θέσεις πρόσδεσης. Μία θέση ευθύνεται για την πρόσδεση της ακτίνης, μία θέση προσδένει την τροπομουσίνη, και η τελευταία θέση προσδένει ιόντα ασβεστίου. Ο ρόλος της είναι να σταθεροποιεί την τροπομουσίνη σε τέτοια διαμόρφωση ώστε οι θέσεις πρόσδεσης μυοσίνης να είναι πλήρως μη διαθέσιμες.

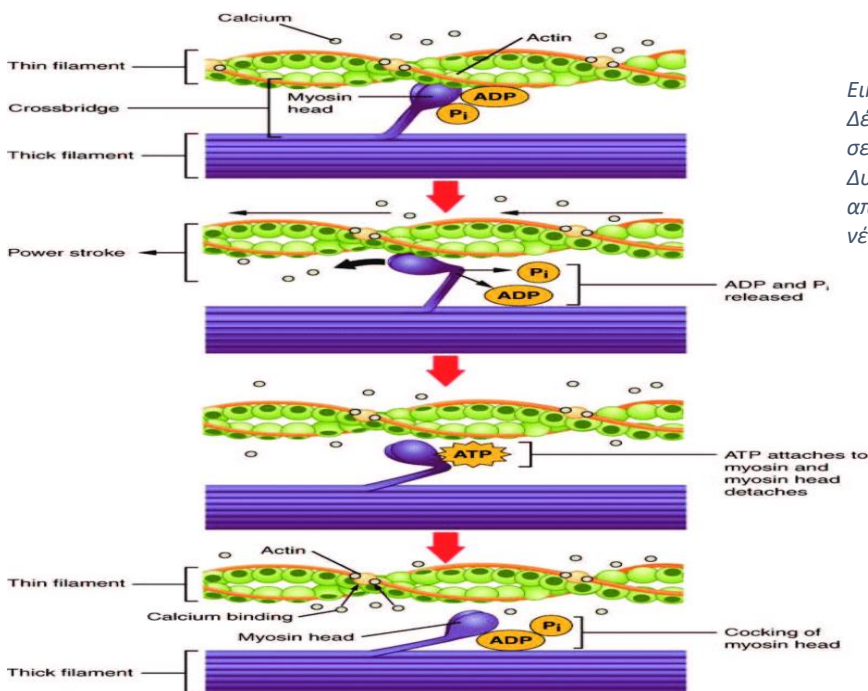
Κάθε μυϊκή ίνα νευρώνεται από έναν κινητικό νευρώνα, δημιουργώντας την νευρομυϊκή σύναψη. Ο κινητικός νευρώνας ευθύνεται για την μετάδοση του μηνύματος της σύσπασης, μέσω του κύριου νευροδιαβιβαστή του παρασυμπαθητικού νευρικού συστήματος, την ακετυλοχολίνη. Η πρόσδεση της ακετυλοχολίνης στους υποδοχείς της, επάγει την αυξημένη διαπερατότητα σε ιόντα Na. Η απότομη είσοδος ιόντων νατρίου επάγει την εκπόλωση της μεμβράνης και την δημιουργία ενός δυναμικού δράσης το οποίο μεταφέρεται κατά μήκος της μυϊκής ίνας. Στο σαρκοπλασματικό δίκτυο της μυϊκής ίνας, ένα τροποποιημένο ενδοπλασματικό δίκτυο το οποίο περιβάλλει κάθε μυϊκό ινίδιο, εντοπίζονται εγκοιλώσεις της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίες σχηματίζουν εγκάρσια σωληνάκια, τα οποία είναι γνωστά και ως σωληνάκια T. Επίσης, το σαρκοπλασματικό δίκτυο σχηματίζει συγκεκριμένες δομές οι οποίες ονομάζονται τελικές δεξαμενές ή αλλιώς πλευρικοί σάκοι. Οι πλευρικοί σάκοι αποθηκεύουν ασβέστιο. Τα σωληνάκια T διατρέχουν τους πλευρικούς σάκους, και η μετάδοση ενός δυναμικού ενέργειας στα σωληνάκια T προκαλεί την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου. Συγκεκριμένα, οι υποδοχείς διυδροξυπυριδίνης της μεμβράνης των σωληναρίων T λειτουργούν ως αισθητήρες τάσης, με τέτοιο τρόπο ώστε όταν ανιχνευθεί αλλαγή στο δυναμικό ενέργειας, ενεργοποιούνται, και με την σειρά τους πυροδοτούν την διάνοιξη των υποδοχέων ρυανοδίνης, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται μεγάλες ποσότητες ασβεστίου. Το ασβέστιο προσδένεται στα μόρια τροπονίνης, προκαλεί αλλαγή διαμόρφωσης τροπονίνης-τροπομουσίνης, με αποτέλεσμα να είναι πλέον διαθέσιμες οι θέσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης (Sherwood et al, Human Physiology: From cell to systems).



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της νευρομυϊκής σύναψης. Ένα δυναμικό ενέργειας καταφθάνει στον κινητικό νευρώνα, ο οποίος απελευθερώνει τον νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη στην νευρομυϊκή σύναψη. Η ακετυλοχολίνη προσδένεται στους υποδοχείς της, αυξάνει την διαπερατότητα σε Na<sup>+</sup>, με αποτέλεσμα το νέο δυναμικό ενέργειας να μεταφέρεται έως τα T σωληνάκια, όπου μέσω της αλληλεπίδρασης του τασεοεξαρτώμενου υποδοχέα διυδροξυπυριδίνης (DHPR) και του υποδοχέα ρυανοδίνης (Rvr), απελευθερώνεται Ca<sup>2+</sup>, το οποίο εκκινεί τον μοριακό μηχανισμό σύσπασης (Marta Gonzalez-Freire et al. , 2014)

## Μοριακός μηχανισμός σύσπασης

Ακόμα και όταν δεν έχει δοθεί εκούσια εντολή για σύσπαση, η κεφαλή της μυοσίνης δεσμεύει ATP (δράση ATPάσης) στην θέση πρόσδεσης που διαθέτει, και το υδρολύει σε ADP και  $P_i$ , συγκρατώντας την ενέργεια η οποία έχει προέλθει από την διάσπαση του ATP, καθώς και τα ADP και  $P_i$ . Με αυτό τον τρόπο, η κεφαλή της μυοσίνης είναι έτοιμη να επιτελέσει το έργο της όταν δοθεί εντολή από το κεντρικό νευρικό σύστημα, οποιαδήποτε χρονική στιγμή. Όταν απομακρυνθεί η τροπομυοσίνη από τις θέσεις πρόσδεσης μυοσίνης των λεπτών νηματίων, η μυοσίνη προσδένεται με την ακτίνη, και κάμπτεται κατά 45 μοίρες προς το εσωτερικό του σαρκομεριδίου, με αποτέλεσμα να έλκει συνολικά το λεπτό νηματίο. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται δυναμική έλξη. Μετά το πέρας αυτής, το ADP και  $P_i$  απομακρύνονται, και απαιτείται ένα νέο μόριο ATP ώστε να αποδεσμευτεί η κεφαλή της μυοσίνης. Με αυτό το τρόπο, το μόριο μυοσίνης είναι ελεύθερο και ξανά διαθέσιμο ώστε να επιτελέσει μία νέα δυναμική έλξη. Σημειώνεται ότι, κάθε δυναμική έλξη μετατοπίζει κατά ένα μικρό ποσοστό τα λεπτά νηματία, και άρα βραχύνει λίγο το σαρκομερίδιο, ωστόσο υπάρχει τεράστιος αριθμός μορίων μυοσίνης, ενώ κάθε μόριο μπορεί να επαναλάβει την διαδικασία παραπάνω από μία φορά, συντελώντας έτσι στην βράχυνση του μυός. Το μοντέλο αυτό ονομάζεται μηχανισμός διολίσθησης των νηματίων (sliding filament mechanism) (Sherwood et al, Human Physiology: From cell to systems).



Εικόνα 11: Στάδια του μηχανισμού διολίσθησης νηματίων. 1) Δέσμευση και υδρόλυση ATP από την υπομονάδα της μυοσίνης σε ADP και  $P_i$ , μετατροπή χημικής σε δυναμική ενέργεια. 2) Δυναμική έλξη, αποδέσμευση ADP,  $P_i$ . 3) Επαναδέσμευση ATP, απελευθέρωση μυοσίνης 4) Υδρόλυση ATP και ετοιμότητα για νέα δυναμική έλξη. (Ivana Prokic, 2013).

## Τύποι μυϊκών ινών

Οι μυϊκές ίνες που υπάρχουν εντός του σκελετικού μύ δεν είναι όλες πανομοιότυπες, και μπορούν καταταχθούν σε 'τύπους' μυϊκών ινών με βάση συγκεκριμένα κριτήρια. Τέτοια κριτήρια είναι ρυθμοί μετακίνησης, απόκριση σε νευρικά ερεθίσματα, αλλά και μεταβολικά προφίλ. Σε γενικές γραμμές, οι σκελετικές μυϊκές ίνες κατηγοριοποιούνται σε βραδείας σύσπασης (Τύπου I) και ταχείας σύσπασης (Τύπου II). Με βάση την ισομορφία της βαριάς αλυσίδας που εκφράζεται στην εκάστοτε μυϊκή ίνα, οι τύπου II ίνες κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε 3 μεγάλους υπότυπους, IIA, IIB, IIX. Συνδυαστική έκφραση ισομορφών της

βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης επιτρέπουν σύνθετες κατηγοριοποιήσεις μυϊκών ινών (I/IIA, IIA/IIIX, IIIX/2B). Βασική διαφορά των μυϊκών ινών τύπου I και II είναι η διαδικασία παραγωγής ATP που απαιτείται για την σύσπαση. Οι μυϊκές ίνες βραδείας σύσπασης (I) αλλά και οι ίνες 2A χρησιμοποιούν τον μηχανισμό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, ενώ οι ίνες 2A και 2X χρησιμοποιούν τον μηχανισμό της γλυκόλυσης για άμεση παραγωγή ATP. Περισσότερες διαφορές φαίνονται στην εικόνα που ακολουθεί. Γενικά, κάθε σκελετικός μυς εμφανίζει μία συγκεκριμένη σύσταση σκελετικών μυϊκών ινών, ανάλογα με την λειτουργία του. Για παράδειγμα, ο πελματικός μυς, ο οποίος εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως το περπάτημα και η στήριξη του σώματος και βρίσκεται διαρκώς σε χρήση, αποτελείται κυρίως από μυϊκές ίνες βραδείας σύσπασης τύπου I, ενώ οι μυϊκές ίνες του βραχιόνιου τρικεφάλου αποτελούνται από μυϊκές ίνες ταχείας σύσπασης τύπου II. Δηλαδή, κατά την αερόβια άσκηση (τρέξιμο χαλαρού ρυθμού, κολύμβηση κ.α) χρησιμοποιούνται ίνες κυρίως τύπου I, ενώ όταν πραγματοποιούνται κινήσεις που απαιτούν εκρηκτικότητα και δύναμη, αναλαμβάνουν οι μυϊκές ίνες τύπου II (σπριντ, άρση βαρών). Ωστόσο, υπάρχει πλαστικότητα στον φαινότυπο των μυϊκών ινών κάθε μύ, το οποίο αποσκοπεί στην προσαρμογή του ιστού στην χρήση στην οποία υπόκειται. Κύριος οδηγός για την φαινοτυπική αυτή αλλαγή είναι η άσκηση και η φυσική δραστηριότητα. Για παράδειγμα, στους δρομείς μεγάλων αποστάσεων παρατηρείται σημαντική αύξηση των μυϊκών ινών τύπου I σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό. Επιπλέον, φαίνεται πως και παθολογικές καταστάσεις όπως η παχυσαρκία έχουν επίδραση στην σύσταση των σκελετικών μυϊκών ινών. Συγκεκριμένα, στα παχύσαρκα άτομα παρατηρείται μείωση των μυϊκών ινών τύπου I και αύξηση των μυϊκών ινών τύπου IIIX. Άλλες ασθένειες που έχουν συσχετιστεί με αλλαγές στην μυϊκή σύσταση είναι η μυϊκή δυστροφία Duchenne, η νόσος Pompe, και οι μυοτονικές δυστροφίες τύπου I και II, μεταξύ άλλων (Talbot J. et al, 2016; Sherwood et al, Human Physiology: From cell to systems).

	Τύπου I	Τύπου IIA	Τύπου IIB
Ρυθμός σύσπασης	Βραδύς	Γρήγορος	Πολύ γρήγορος
Αντίσταση στην κόπωση	Υψηλή	Μεσαία	Χαμηλή
Παραγωγή δύναμης	Χαμηλή	Μεσαία	Υψηλή
Μιτοχονδριακή πυκνότητα	Υψηλή	Υψηλή	Χαμηλή
Αγγειακή πυκνότητα	Υψηλή	Υψηλή	Χαμηλή
Οξειδωτική ικανότητα	Υψηλή	Υψηλή	Χαμηλή
Γλυκολυτική ικανότητα	Χαμηλή	Υψηλή	Υψηλή
Κύριο μεταβολικό καύσιμο	Τριγλυκερίδια	Φωσφοκρεατίνη, Γλυκογόνο	Φωσφοκρεατίνη, Γλυκογόνο

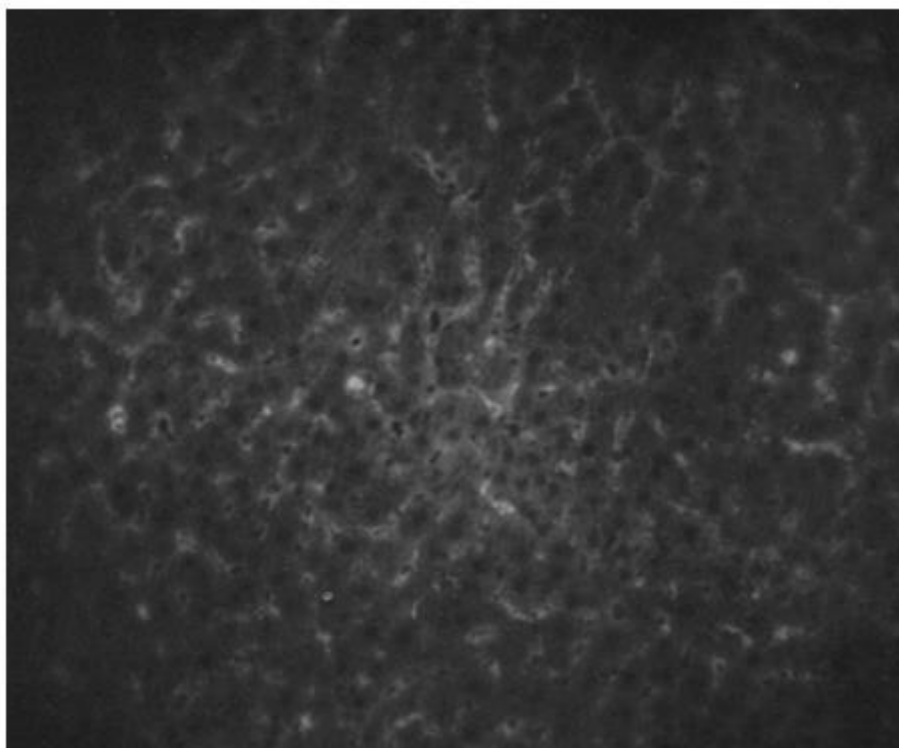
Πίνακας 1: Στον πίνακα φαίνονται συνοπτικά οι βασικές διαφορές μεταξύ των μυϊκών ινών τύπου I, IIA και IIB (Karp, Jason R.. "Muscle Fiber Types and Training Types of Muscle Fibers." (2004).

## Ανοσοϊστοχημεία

### Εισαγωγή

Η προσέγγιση κατά την οποία χρησιμοποιείται ένα σημασμένο αντίσωμα για τον προσδιορισμό ενός αντιγονικού επιτόπου σε δείγμα ιστού ονομάζεται ανοσοϊστοχημεία. Η τεχνική εμπεριέχει την χρήση αντισωμάτων (πρωτογενών, δευτερογενών) που είναι φυσικό

παράγωγο της ανοσολογικής απόκρισης ενός οργανισμού. Η απεικόνιση της πρόσδεσης ενός αντισώματος με το αντίστοιχο αντιγόνο του οπτικοποιείται άμεσα ή έμμεσα μέσω μιας ετικέτας, η οποία μπορεί να είναι έγχρωμη χημική ουσία, φθορίζον μόριο, ή ένζυμο το οποίο καταλύει μία αντίδραση, το προϊόν της οποίας μπορεί να ανιχνευθεί (φθορισμός, έγχρωμο προϊόν). Υπήρξαν πάρα πολλοί σταθμοί στην εγκαθίδρυση της τεχνικής ως μία από τις σημαντικότερες για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς, από την περιγραφή και την εμφάνιση για πρώτη φορά του όρου 'αντισώματος' από τον Paul Ehrlich το 1900, την πρώτη καταγεγραμμένη σύνδεση αντισώματος με χημική ουσία, με σκοπό την καταπολέμηση του βακτηρίου της σύφυλλης από τον ίδιο τον Ehrlich το 1910, έως και την παρασκευή και απομόνωση αθάνατων β-κλώνων που παράγουν πρωτογενή αντισώματα (Köhler G. et al, 1975).



Εικόνα 12: Η πρώτη δημοσιευμένη εικόνα από ανοσοϊστοχημεία. Στην εικόνα φαίνεται συκώτι ποντικού ο οποίος έπασχε από πνευμονιόκοκκο.. Χρησιμοποιήθηκε καρβάμιδο-φλουοροσκεΐνη, συζευγμένη με αντίσωμα έναντι του πνευμονιόκοκκου. Στην αρχική δημοσίευση τους οι ερευνητές περιγράφουν ότι με μαύρο φαίνονται τα αιμοφόρα αγγεία, με γκρι φαίνεται ο αυτοφθορισμός των ηπατικών κυττάρων μετά από μονιμοποίηση με φορμαλίνη, ενώ με άσπρο φαίνεται ο φθορισμός της φλουοροσκεΐνης. Σημειώνεται ότι η εικόνα δημοσιεύτηκε ασπρόμαυρη λόγω εποχής, ενώ οι ερευνητές περιέγραψαν επακριβώς τα χρώματα στην λεζάντα (Coons et al, 1942)

### **Αντίσωμα**

Το αντίσωμα ή ανοσοσφαιρίνη, όπως αλλιώς ονομάζεται, είναι παράγωγο των ενεργοποιημένων β-λεμφοκυττάρων, και είναι βασικό συστατικό της χυμικής ανοσίας. Είναι μία μεγάλου μοριακού βάρους πρωτεΐνη, η οποία έχει χαρακτηριστικό Y σχήμα, που χρησιμοποιείται από το ανοσοποιητικό σύστημα ώστε να εντοπίζει λοιμογόνους παράγοντες και να τους εξουδετερώνει, είτε άμεσα είτε έμμεσα. Άμεσα στην περίπτωση που η πρόσδεση του αντισώματος σε συγκεκριμένο αντιγονικό επίτοπο αποτρέπει μια λειτουργία του λοιμογόνου παράγοντα, όπως στην περίπτωση ορισμένων ιών, όπου το αντίσωμα μπλοκάρει απαραίτητους υποδοχείς για την διαμόλυνση νέων κυττάρων του ξενιστή, ενώ έμμεσα, στρατολογώντας μία σειρά από κύτταρα τελεστές του ανοσοποιητικού, αντιμετωπίζοντας αποτελεσματικά την μόλυνση. Υπάρχουν 5 τάξεις αντισωμάτων με ξεχωριστούς μηχανισμούς

λειτουργίας, και είναι οι τάξεις IgG, IgE, IgA, IgD και IgM. Η πολυπληθέστερη κατηγορία αντισωμάτων, η ανοσοσφαιρίνη G ή IgG, είναι πρωτεΐνες μοριακού βάρους 150kDa, οι οποίες αποτελούνται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, μία που χαρακτηρίζεται ως ελαφριά (25kDa), με την δεύτερη να χαρακτηρίζεται ως βαριά (50 kDa) αλυσίδα. Κάθε IgG μόριο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη δύο ελαφρών και δύο βαρέων αλυσίδων, με τις βαριές αλυσίδες να συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ η σύνδεση μεταξύ βαριάς και ελαφριάς αλυσίδας πραγματοποιείται με μόλις ένα δισουλφιδικό δεσμό. Σε κάθε μόριο ανοσοσφαιρίνης, οι 2 ελαφριές αλυσίδες αλλά και οι 2 βαριές αλυσίδες είναι πανομοιότυπες μεταξύ τους, δίνοντας έτσι την ικανότητα να προσδένεται σε δύο ίδιες αντιγονικές περιοχές ταυτόχρονα. Ως αντιγόνα μπορούν να δράσουν, ξένες πρωτεΐνες, λιπίδια, γλυκολιπίδια, λιποσακχαρίτες, μέχρι και ανόργανα μόρια. Τα αντισώματα βρίσκουν εφαρμογή σε ένα ευρύ πεδίο λόγω της μεγάλης εξειδίκευσης τους έναντι συγκεκριμένου αντιγόνου, αλλά και της δυνατότητας να συνδέονται με ουσίες και μόρια. Χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα (Ανοσοϊστοχημεία/ανοσοκυτταροχημεία, ELISA, στήλες καθαρισμού), για διαγνωστικούς σκοπούς (βιοδείκτες), αλλά και για φαρμακευτικούς σκοπούς.

### **Ελαφριά αλυσίδα**

Υπάρχουν δύο τύποι ελαφριάς αλυσίδας που συνιστούν κάθε αντίσωμα. Συγκεκριμένα, οι ελαφριές αλυσίδες κ και λ. Κάθε αντίσωμα αποτελείται εξ ολοκλήρου είτε από κ είτε από λ, αλυσίδες. Έως τώρα, δεν έχει βρεθεί καμία λειτουργική διαφορά μεταξύ της κ και λ αλυσίδας, ωστόσο φαίνεται πως η αναλογία μεταξύ τους μεταβάλλεται από οργανισμό σε οργανισμό. Για παράδειγμα, η αναλογία κ:λ στον άνθρωπο είναι 2:1, ενώ στον ποντικό, η αναλογία ανέρχεται σε 20:1. Ο λόγος για αυτή την διαφορά μεταξύ των ειδών παραμένει άγνωστος

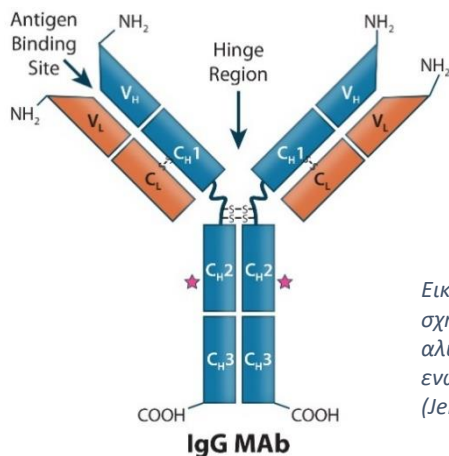
### **Βαριά αλυσίδα**

Οι βαριές αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών είναι και εκείνες οι οποίες καθορίζουν την τάξη του αντισώματος και κατά επέκταση και τον μηχανισμό διαμεσολάβησης της ανοσίας. Οι 5 τάξεις αντισωμάτων που περιγράφηκαν νωρίτερα καθορίζονται από την αντίστοιχη βαριά αλυσίδα, η οποία περιγράφεται με το μικρό γράμμα της ελληνικής αλφαβήτου (γ,ε,α,δ,μ). Το καρβοξυτελικό άκρο της βαριάς αλυσίδας είναι και αυτό που ορίζει τον μηχανισμό δράσης, ενώ οι ελαφριές αλυσίδες δεν συνεισφέρουν. Γενικά, η IgG τάξη εμφανίζεται κατά πλειοψηφία και έχει μελετηθεί περισσότερο, καθώς όσο αφορά την δομή οι τάξεις δεν αποκλίνουν σημαντικά από αυτή της IgG.

### **Πρωτεϊνικές επικράτειες**

Οι αμινοξικές αλληλουχίες βαρέων και ελαφρών αλυσίδων έχουν προσδιοριστεί σε πάρα πολλά αντισώματα, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται κάποια κοινά πρότυπα. Συγκεκριμένα, κάθε αλυσίδα αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αμινοξέων, της τάξης των 110 καταλοίπων. Οι περιοχές αυτές έχουν την ικανότητα να αναδιπλώνονται αυτόνομα, και να συνιστούν μία ξεχωριστή πρωτεϊνική επικράτεια. Συγκεκριμένα, οι ελαφριές αλυσίδες αποτελούνται από 2 τέτοιες περιοχές, ενώ οι βαρέες αλυσίδες της IgG από 4 περιοχές. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι δεν υπάρχει συντήρηση μεταξύ αντισωμάτων όσο αφορά τη αμινοτελικές επικράτειες και των δύο τύπων αλυσίδων. Οι περιοχές αυτές χαρακτηρίζονται ως μεταβλητές περιοχές (V regions,) και αφορούν τα πρώτα 110 αμινοξέα των V<sub>H</sub> (V-heavy) και V<sub>L</sub> (V-light) περιοχών. Οι V<sub>H</sub> και V<sub>L</sub> περιοχές συνεργατικά αποτελούν την θέση πρόσδεσης του αντιγόνου, και οφείλονται για την ειδικότητα κάθε αντισώματος έναντι του στόχου του. Οι C περιοχές (Constant) τόσο των ελαφρών και βαρέων αλυσίδων (C<sub>H</sub> και C<sub>L</sub>) αφορούν περιοχές οι οποίες παρουσιάζουν συντήρηση μεταξύ ιδίων υποτύπων ανοσοσφαιρινών. Οι

ελαφριές αλυσίδες αποτελούνται από μία  $C_L$  περιοχή, ενώ οι βαρέες αλυσίδες αποτελούνται από 3 περιοχές ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  και  $C_{H3}$ ). Οι περιοχές C καθορίζονται από το είδος του αντισώματος και μπορεί να διαφέρουν ανάμεσα στους υποτύπους. Μελέτες πέψης που έχουν γίνει με πρωτεάσες έχουν ξεχωρίσει λειτουργικά τα τμήματα των ανοσοσφαιρινών. Συγκεκριμένα, περιορισμένη πέψη με το ένζυμο παπαΐνη ξεχώρισε την ανοσοσφαιρίνη σε 3 F περιοχές, 2 Fab και 1 Fc. Η περιοχή Fab αποτελείται από τους δύο πανομοιότυπους βραχίονες, δηλαδή από τις περιοχές  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_{H1}$  και  $C_L$ . Η Fc περιοχή κρυσταλλώνεται εύκολα, και αποτελείται από τις περιοχές των βαρέων αλυσίδων  $C_{H2}$  και  $C_{H3}$ . Μεταξύ των  $C_{H1}$  και  $C_{H2}$  παρατηρείται μία περιοχή εύκαμπτου συνδέσμου (hinge region) η οποία επιτρέπει στις Fab περιοχές να κινούνται αυτόνομα στο χώρο, όπως έχουν δείξει μελέτες ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας. Επίσης, σημειώνεται ότι οι  $C_{H2}$  περιοχές συνδέονται με υδατάνθρακες μέσω N-γλυκοζιλιτικών δεσμών, αλλά και O-γλυκοζιλιτικών δεσμών στους υποτύπους IgA1 και IgD. Σύμφωνα με έρευνες, φαίνεται πως η γλυκοζυλίωση των ανοσοσφαιρινών διαδραματίζει σημαντικό βιολογικό ρόλο. Συγκεκριμένα, έχει συσχετιστεί με την πρωτεϊνική σταθερότητα, την ικανότητα να δημιουργούνται ανοσοσφαιρινικά σύμπλοκα, την αναγνώριση υποδοχέα-προσδέτη αλλά και την συγγένεια σύνδεσης, ενεργότητα, και αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου. Για παράδειγμα, οι γλυκάνες που βρίσκονται στην IgG έχει βρεθεί πως συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση των συστατικών του συμπληρώματος, αλλά και στην αναγνώριση των Fc περιοχών (Charles A Janeway et al, Immunobiology 5<sup>th</sup> edition).



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της ανοσοσφαιρίνης IgG. Στο σχήμα φαίνονται οι V και C περιοχές τόσο των ελαφρών όσο και βαρέων αλυσίδων, η περιοχή εύκαμπτου συνδέσμου μεταξύ των  $C_{H2}$  και  $C_{H1}$  περιοχών, ενώ με αστεράκια φαίνονται οι θέσεις γλυκοζυλίωσης στις  $C_{H2}$  επικράτειες. (Jennifer Bratt et al, 2017)

### Πρωτογενή αντισώματα

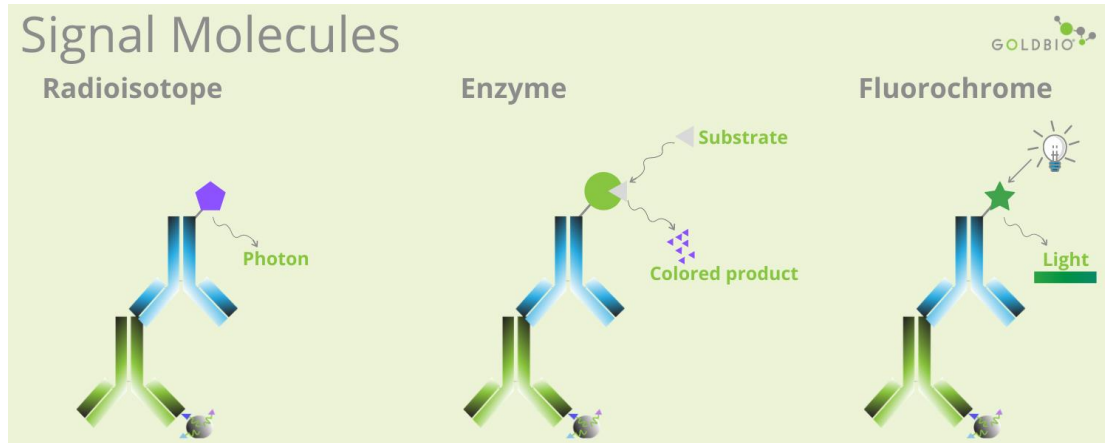
Πρωτογενές αντίσωμα ονομάζεται το αντίσωμα το οποίο διαθέτει περιοχές πρόσδεσης του αντιγόνου ενδιαφέροντος και διευκολύνει την ανίχνευση ή/και την ποσοτικοποίηση του. Τα πρωτογενή αντισώματα παράγονται ειδικά μέσω της ανοσοποίησης ενός ζώου με το αντιγόνο το οποίο θέλουμε να μελετήσουμε, αν και τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια τάση εγκατάλειψης των κλασικών αυτών μεθόδων και μεταστροφή σε σύνθεση μέσω τεχνολογιών ανασυνδιασμένου DNA, αξιοποιώντας κυτταρικές σειρές μυελώματος (καρκινικών β-λεμφοκυττάρων). Η διαδικασία ξεκινάει από την ένεση του ζώου με το αντιγόνο ενδιαφέροντος, την απομόνωση του ορού μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, και τον καθαρισμό του πρωτογενούς αντισώματος έναντι του αντιγόνου που χορηγήθηκε. Οι πιο κοινοί ξενιστές για την ανάπτυξη πρωτογενών αντισωμάτων είναι ο ποντικός, η γίδα, ο αρουραίος και ο λαγός. Τα πρωτογενή αντισώματα μπορεί να είναι μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά. Μονοκλωνικά αντισώματα ονομάζονται εκείνα τα οποία έχουν προκύψει από έναν διαφοροποιημένο κλώνο β-λεμφοκυττάρων, και χαρακτηριστικό τους είναι ότι αναγνωρίζουν μόλις ένα αντιγονικό επίτοπο. Αντιθέτως, πολυκλωνικά αντισώματα

ονομάζονται εκείνα τα οποία προέρχονται από διάφορους κλώνους β-λεμφοκυττάρων, και έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν παραπάνω από έναν επίτοπο του ίδιο αντιγόνου που μελετάται. Για παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα κύρια είδη που χρησιμοποιούνται είναι ο ποντικός και ο λαγός. Υπάρχουν ορισμένες ποιοτικές διαφορές ως προς την χρήση μονοκλωνικών είτε πολυκλωνικών πρωτογενών αντισωμάτων τις οποίες πρέπει να λάβει υπόψη ο ερευνητής. Η βασική διαφορά είναι ότι τα μονοκλωνικά αντισώματα εμφανίζουν υψηλότερη εξειδίκευση, ενώ τα πολυκλωνικά αντισώματα εμφανίζουν υψηλότερη ευαισθησία. Υψηλότερη εξειδίκευση σημαίνει ότι υπάρχει πιο ειδική σύνδεση αντισώματος αντιγόνου, περιορίζοντας έτσι τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, ενώ μεγαλύτερη ευαισθησία σημαίνει ότι το αντιγόνο εντοπίζεται από τα αντισώματα ευκολότερα και άρα υπάρχει ικανοποιητικό σήμα ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις αντιγόνου, το οποίο είναι απόρροια του γεγονότος ότι τα πολυκλωνικά αντισώματα προσδένουν πολλαπλούς επιτόπους ενός αντιγόνου. Επίσης, τα πολυκλωνικά αντισώματα είναι πιο σταθερά σε αλλαγές του περιβάλλοντος (pH, θερμοκρασία) και δεν επηρεάζονται από αλλαγές σε συγκεκριμένο επίτοπο. Σε γενικές γραμμές, προτιμούνται τα μονοκλωνικά αντισώματα για φαρμακευτικούς και διαγνωστικούς σκοπούς, λόγω της αυξημένης εξειδίκευσης (Lipman NS. et al, 2005).

### **Δευτερογενή αντισώματα**

Ως δευτερογενή αντισώματα ορίζονται εκείνα τα αντισώματα τα οποία δεν προσδένονται απευθείας στο αντιγόνο ενδιαφέροντος, αλλά στο πρωτογενές αντίσωμα. Ανάλογα με την εφαρμογή, μπορούν να προσδένονται στις Fab περιοχές του πρωτογενούς (Western blotting), είτε στις Fc περιοχές, που προτιμάται στην ανοσοϊστοχημεία. Επειδή οι Fc περιοχές είναι αμετάβλητες μεταξύ των ειδών, η παραγωγή των δευτερογενών αντισωμάτων είναι πολύ ευκολότερη σε σχέση με τα πρωτογενή αντισώματα, καθώς η παραγωγή τους είναι ανεξάρτητη από το είδος του αντιγόνου που εξετάζεται. Τα δευτερογενή αντισώματα παράγονται με όμοιο τρόπο, μέσω ανοσοποίησης ενός ξενιστή έναντι του πρωτογενούς αντισώματος. Ωστόσο, υφίστανται περαιτέρω τροποποίηση ώστε να τους αποδοθεί μία ετικέτα μάρτυρας, το οποίο μπορεί να είναι ραδιοϊσότοπο, ένζυμο, ή φθοροφόρο. Οι πιο συνηθισμένες ετικέτες είναι ένζυμα και φθοροφόρα. Χαρακτηριστικά ένζυμα είναι η HRP (Horse Radish Peroxidase) και η AP (Αλκαλική Φωσφατάση), και βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε μεθόδους όπως η ανοσοαποτύπωση κατά Western και ELISA, λόγω των έγχρωμων προϊόντων, στην περίπτωση της αλκαλικής φωσφατάσης. Από τα πιο χαρακτηριστικά φθοροφόρα είναι οι ενώσεις Alexa Fluor, οι οποίες υπό την διέγερση μέσω laser, εκπέμπουν φως σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και μαρτυρούν την θέση του αντιγόνου. Για παράδειγμα, η Alexa Fluor 488, που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη ως ετικέτα του δευτερογενούς αντισώματος, διεγείρεται σε μήκος κύματος 488nm και εκπέμπει φως σε μήκος κύματος 520nm, το οποίο αντιστοιχεί σε πράσινο χρώμα. Συχνά, τα δευτερογενή αντισώματα είναι συνδεδεμένα με βιοτίνη. Αυτό αποσκοπεί στην ενίσχυση του σήματος σε περίπτωση που η συγκέντρωση του αντιγόνου είναι πολύ χαμηλή και βρίσκει εφαρμογή κυρίως στην ELISA.

# Signal Molecules



Εικόνα 14: Στην εικόνα φαίνεται ο μηχανισμός δράσης και η σχέση μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος. Στην πρώτη περίπτωση, το δευτερογενές αντίσωμα είναι σημασμένο με ραδιοϊσότοπο, το οποίο εκπέμπει φωτόνια, στην δεύτερη περίπτωση υπάρχει σύζευξη του δευτερογενούς με ένζυμο, το οποίο μεταβολίζει το υπόστρωμα του σε έγχρωμο προϊόν, όπως στην περίπτωση της αλκαλικής φωσφατάσης, είτε σε εκπομπή φωτός, στην περίπτωση της HRP. Τέλος, μπορεί να υπάρξει σύζευξη με φθοροφόρο, το οποίο μετά από ενεργοποίηση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, εκπέμπει φως. (<https://www.goldbio.com/articles/article/an-introduction-to-primary-antibodies-and-secondary-antibodies>)

## Σκοπός

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι πυρηνικοί υποδοχείς, και κατά επέκταση και ο υποδοχέας ERα, διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση του οργανισμού. Τα οιστρογόνα εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα δράσεων (νευροπροστασία, καρδιαγγειακή υγεία, φυλετικά χαρακτηριστικά κ.α.) και συνεπώς η απορρύθμιση των επιπέδων τους ή της ενεργότητάς τους στον οργανισμό μπορεί να συσχετιστεί με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων. Σε ανενεργή μορφή, οι υποδοχείς οιστρογόνων βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, δεσμευμένοι με πρωτεΐνες-συνοδούς. Παρουσία οιστραδιόλης, οι υποδοχείς όμο- ή έτεροδιμερίζονται, και μεταβαίνουν στον πυρήνα όπου ασκούν την δράση τους με είτε άμεσα είτε έμμεσα.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο έλεγχος της υποκυτταρικής εντόπισης του υποδοχέα ERα σε δύο τύπους μυϊκού ιστού. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός τόσο σε μυϊκό ιστό χοιρινού, όσο και σε τετρακέφαλο μοιραίο μύ ποντικού. Επίσης, δεδομένης της παρουσίας των υποδοχέων οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια, πραγματοποιήθηκε και ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός του ενζύμου COX IV, ένα αποκλειστικά μιτοχονδριακό μόριο που εμπλέκεται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, για τον προσδιορισμό της πιθανής εντόπισης του ERα στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε στους ίδιους ιστούς χημική δοκιμασία που βασίζεται στο ένζυμο της ATPάσης της μυοσίνης ώστε να προσδιοριστούν οι τύποι των μυϊκών ινών στους υπό μελέτη ιστούς και των δύο ειδών (τύπου I, τύπου II και τύπου IIx).

Για την επίτευξη των παραπάνω πειραματικών στόχων αποκτήθηκε τμήμα τετρακέφαλου μοιραίου μυ από ποντίκι την ίδια μέρα που θανατώθηκε, ευγενική παραχώρηση από το Τμήμα Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τμήμα από μυ χοίρου, εμπορικά αγορασμένο.



# Πειραματικό μέρος

## Οργανολογία

### Χώρος εργαστηρίου

- Ζυγός (Kern EN).
- Ζυγός (Kern 440-47N).
- Vortex (Bionvortex V1).
- Quick spin (NIPPON Genetics EUROPE GmbH)
- Πιπέτες , όγκων 0,1-2 μl, 2-20 μl, 20-200 μl, 100- 1.000 μl.
- Αντικειμενοφόροι πλάκες(Sigma)
- Κλίβανος (Biosan)
- pHάμετρο (Metrohm)

### Χώρος κρουτόμου

- Κρουτόμος (Slee Mainz)
- Νυστέρι
- Λαβίδα

### Χώρος μικροσκοπίας

- Συνεστιακό μικροσκόπιο ( Zeiss LSM 800 series )

## Υλικά

### Χημικά

### Ανοσοϊστοχημεία

- Μεθανόλη 100% (Honeywell)
- Ακετόνη 100% (Sigma)
- Χλωροφόρμιο 100% (AppliChem)
- Αιθανόλη 100% (Honeywell)
- PBS 10x (Gibco)
- PBS 1x – Tween 0,7% (Sigma)
- PVA
- Hoechst 33342 (Sigma)
- OCT (Sakura Finetek)

### Αντισώματα

#### 1<sup>α</sup> αντισώματα

- Anti-ERα (ProteinTech)
- Anti-COXIV (ProteinTech)

## 2<sup>ο</sup> αντίσωμα

- Anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen)

### Δοκιμασία ΑΤΡάσης

- Οξικό νάτριο (Merck)
- Χλωριούχο κάλιο (Emsure)
- Γλυκίνη (Serva)
- Χλωριούχο ασβέστιο (Merck)
- ATP (Sigma)
- Σουλφίδιο του αμμωνίου (Sigma)
- Χλωριούχο κοβάλτιο (Alfa Aesar)
- Απεσταγμένο νερό

## Διαλύματα

### Ανοσοϊστοχημεία

- PBS 1x

Αραίωση του PBS 10x σε 1x σε dH<sub>2</sub>O.

- Διάλυμα blocking FBS (10% v/v)

Διαλυτοποίηση 100ml FBS σε 900ml PBS-T.

- Διάλυμα blocking NMS (10% v/v)

Διαλυτοποίηση 100ml NMS σε 900ml PBS-T.

- Διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος 1:50 v/v

Το διάλυμα έχει τελική συγκέντρωση 1:50 σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας. Συνεπώς, διαλύθηκαν 3ml σε 147ml PBS-T 1x.

- Διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος 1:500 v/v + Hoechst 1μg/ml

Το διάλυμα έχει τελική συγκέντρωση 1:500 σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρείας. Συνεπώς, διαλύθηκαν 1ml δευτερογενούς αντισώματος (anti-rabbit Alexa Fluor 488) και 0,5ml Hoechst από stock συγκέντρωση 1mg/ml σε 498,5ml PBS-T 1x.

### Δοκιμασία ΑΤΡάσης

- 0,1M οξικό νάτριο, 0,1M χλωριούχο κάλιο pH=4,6

Για την επιθυμητή συγκέντρωση μετά από μαθηματικούς υπολογισμούς, προστέθηκαν 0,82g οξικού νατρίου και 0,745g σε 50ml απεσταγμένου νερού στήλης αρχικά, ώστε να γίνει η ρύθμιση του pH με οξικό οξύ 1M. Όταν επιτεύχθηκε pH=4,6, συμπληρώθηκε νερό στήλης σε τελικό όγκο 100ml.

- 0,1M οξικό νάτριο, 0,1M χλωριούχο κάλιο pH=4,4

Για την επιθυμητή συγκέντρωση μετά από μαθηματικούς υπολογισμούς, προστέθηκαν 0,82g οξικού νατρίου και 0,745g σε 50ml απεσταγμένου νερού στήλης αρχικά, ώστε να γίνει η ρύθμιση του pH με οξικό οξύ 1M. Όταν επιτεύχθηκε pH=4,4, συμπληρώθηκε νερό στήλης σε τελικό όγκο 100ml.

- 20mM γλυκίνη, 20mM χλωριούχο ασβέστιο pH=9,4

Για την επιθυμητή συγκέντρωση μετά από μαθηματικούς υπολογισμούς, προστέθηκαν 0,15g γλυκίνης και 0,294g χλωριούχο ασβεστίου σε 50ml απεσταγμένου νερού στήλης αρχικά, ώστε να γίνει η ρύθμιση του pH με NaOH 10M. Όταν επιτεύχθηκε pH=9,4, συμπληρώθηκε νερό στήλης σε τελικό όγκο 100ml.

- 40mM γλυκίνη, 20mM χλωριούχο ασβέστιο pH=9,4

Για την επιθυμητή συγκέντρωση μετά από μαθηματικούς υπολογισμούς, προστέθηκαν 0,3g γλυκίνης και 0,294g χλωριούχο ασβεστίου σε 50ml απεσταγμένου νερού στήλης αρχικά, ώστε να γίνει η ρύθμιση του pH με NaOH 10M. Όταν επιτεύχθηκε pH=9,4, συμπληρώθηκε νερό στήλης σε τελικό όγκο 100ml.

- 1% w/v χλωριούχο ασβέστιο

Για την παρασκευή του διαλύματος, προστέθηκαν 1g χλωριούχο ασβέστιο σε 100ml απεσταγμένου νερού στήλης.

- 2% w/v χλωριούχο κοβάλτιο

Για την παρασκευή του διαλύματος, προστέθηκαν 2g χλωριούχο κοβάλτιο σε 100ml απεσταγμένου νερού στήλης

- 1% w/v σουλφίδιο του αμμωνίου

Παρασκευάζεται από stock διάλυμα 20%, μέσω της διάλυσης 25ml αυτού σε 75ml νερό στήλης. Είναι πτητικό και χαρακτηριστική δυσάρεστη οσμή, συνεπώς παρασκευάζεται στον απαγωγό.

## **Μέθοδοι**

### **Ανοσοϊστοχημεία**

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- 1) Μεταφορά του δείγματος από τους -80° C στο χώρο του κρουτόμου

Η μεταφορά πραγματοποιείται όσο το γρηγορότερα γίνεται σε φελιζόλ το οποίο περιέχει πάγο και παγοκύστες, ώστε να εξασφαλιστεί η μη αλλοίωση του δείγματος λόγω απότομης αλλαγής θερμοκρασίας.

- 2) Τοποθέτηση του δείγματος σε ειδική κεφαλή του κρουτόμου

Προστίθεται μικρή ποσότητα κόλλας OCT σε κεφαλή του κρουτόμου και αμέσως τοποθετείται το δείγμα προσεκτικά με λαβίδα σε αυτή, ώστε να κολλήσει και να

σταθεροποιηθεί. Ο ιστός αφήνεται να σταθεροποιηθεί καλά στην κεφαλή για τουλάχιστον 10 λεπτά

### 3) Τομές ιστού

Η κεφαλή που φέρει τον ιστό τοποθετείται στην ειδική εσοχή της κρουστόμου. Ρυθμίζουμε αρχικά το πάχος των τομών στα 20μm, με σκοπό να λειανθεί η επιφάνεια του ιστού, ώστε αφενός η διαδικασία της κοπής να είναι πιο εύκολη και αφετέρου να υπάρχει όμοιο πάχος κατά μήκος της κάθε τομής. Όταν παρθούν μερικές ικανοποιητικές τομές στα 20μm, ρυθμίζουμε το πάχος στα 6μm, που είναι και το επιθυμητό πάχος. Παίρνουμε τις τομές που προκύπτουν ακουμπώντας απαλά την αντικειμενοφόρο πλάκα σε αυτές. Κατόπιν, αφαιρούμε το δείγμα από την κεφαλή προσεκτικά με νυστέρι, αφαιρώντας και την περίσσεια της κόλλας, και επιστρέφουμε το δείγμα στους -80° C. Τέλος, μεταφέρουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα με τον ιστό στο χώρο του εργαστηρίου.

### 4) Μονιμοποίηση τομών

Η μονιμοποίηση του ιστού αποσκοπεί στην προστασία του δείγματος από την αυτόλυση και τον εκφυλισμό, αλλά και προετοιμάζει τον ιστό για περαιτέρω κατεργασία καθώς καθιστά τις μεμβράνες διαπερατές. Για τον λόγο αυτό, η μονιμοποίηση γίνεται όσο γρηγορότερα γίνεται για να προστατευθεί η ποιότητα του ιστού. Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν διατηρούνται στους -20° C.

- Μονιμοποίηση συνεχών τομών ποντικού.

Για τις τομές ποντικού, ως μέσα μονιμοποίησης χρησιμοποιήθηκαν οι οργανικοί διαλύτες μεθανόλη και ακετόνη 100% αντίστοιχα. Σε δοχείο που χρησιμοποιείται μόνο για μονιμοποιήσεις, τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα, και προσθέτουμε επαρκή ποσότητα μεθανόλης ώστε να την σκεπάζει, και αφήνουμε στους -20° C για 10min. Όταν παρέλθει το διάστημα αυτό, αφαιρούμε την μεθανόλη και πραγματοποιούμε πλύσεις με PBS 1x ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητά. Κατόπιν, προσθέτουμε επαρκή ποσότητα ακετόνης, και αφήνουμε στους -20° C για 5min. Μετά το πέρας του διαστήματος, αφαιρούμε την ακετόνη και εκπλένουμε με PBS. Τέλος, μεταφέρουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα σε πλαστικό δοχείο που έχει την ικανότητα να κλείνει, αποτρέποντας να περάσει το φως.

- Μονιμοποίηση συνεχών τομών χοίρου

Για τις τομές χοίρου, ως μέσα μονιμοποίησης χρησιμοποιήθηκαν οι οργανικοί διαλύτες ακετόνη/χλωροφόρμιο σε αναλογία 1:1 και αιθανόλη 100%. Σε δοχείο που χρησιμοποιείται μόνο για μονιμοποιήσεις, τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα, και προσθέτουμε επαρκή ποσότητα από ακετόνη/χλωροφόρμιο 1:1 ώστε να την σκεπάζει, και αφήνουμε στους -20° C για 10min. Όταν παρέλθει το διάστημα αυτό, αφαιρούμε το διάλυμα ακετόνης/χλωροφορμίου και πραγματοποιούμε πλύσεις με PBS 1x ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα. Κατόπιν, προσθέτουμε επαρκή ποσότητα αιθανόλης, και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 30sec. Μετά το πέρας του διαστήματος, αφαιρούμε την αιθανόλη και εκπλένουμε με PBS. Τέλος, μεταφέρουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα σε πλαστικό δοχείο που έχει την ικανότητα να κλείνει, αποτρέποντας να περάσει το φως.

## 5) Blocking

Με τον όρο blocking (μπλοκάρισμα) ορίζεται η επώαση του δείγματος μας με ένα διάλυμα το οποίο είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες, όπως είναι ο ορός από ζώα, το γάλα, ή διάλυμα αλβουμίνης (BSA), με σκοπό την δημιουργία μη ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ αυτών, ώστε να περιοριστεί η μη-ειδική σύνδεση του πρωτογενούς αντισώματος. Είναι εξαιρετικά σημαντικό βήμα ώστε να εξασφαλίσουμε την απουσία ψευδώς θετικού φθορισμού κατά την ανάλυση στο μικροσκόπιο.

- Blocking συνεχών τομών ποντικού

Για το blocking των τομών ποντικού, χρησιμοποιήσαμε κανονικό ορό ποντικού (NMS) σε συγκέντρωση 10% v/v. Φροντίζουμε να σκεπάσουμε επαρκώς τις τομές και τις αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Μετά το πέρας της 1h, αφαιρούμε το διάλυμα NMS, και πραγματοποιούμε μερικές πλύσεις με PBS 1x ώστε να απομακρυνθεί πλήρως.

- Blocking συνεχών τομών χοίρου

Για το blocking των τομών χοίρου, χρησιμοποιήσαμε βόειο εμβρυϊκό ορό (FBS) σε συγκέντρωση 10% v/v. Φροντίζουμε να σκεπάσουμε επαρκώς τις τομές και τις αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Μετά το πέρας της 1h, αφαιρούμε το διάλυμα FBS, και πραγματοποιούμε μερικές πλύσεις με PBS 1x ώστε να απομακρυνθεί πλήρως.

## 6) Επώαση με διάλυμα πρωτογενούς αντισώματος

Παρασκευάζουμε το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος (βλ. Διαλύματα). Σκεπάζουμε με επαρκή ποσότητα πρωτογενούς αντισώματος, και επώαζουμε για 1h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Στην παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκαν και ποιοτικοί έλεγχοι για την ειδικότητα του δευτερογενούς αντισώματος έναντι του πρώτου. Στην περίπτωση αυτή το βήμα αυτό παραλείπεται

## 7) Επώαση με διάλυμα δευτερογενούς αντισώματος

Παρασκευάζουμε το διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος όπως αναγράφεται στα Διαλύματα. Η Hoechst είναι μια χρωστική η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται στην μικρή αύλακα του DNA, και συγκεκριμένα σε περιοχές πλούσιες σε αδείνη και θυμίνη. Υπό την διέγερση του laser του συνεστιακού μικροσκοπίου, φθορίζει μπλε χρώμα, και συνεπώς μας επιτρέπει την διάκριση πυρήνων. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι ειδικό έναντι του πρώτου και φέρει μια χημική ομάδα (Alexa Fluor 488) η οποία διεγείρεται από το laser του συνεστιακού μικροσκοπίου (488nm) και φθορίζει, με αποτέλεσμα να δίνει πράσινο χρώμα. Εξαιτίας αυτού, είναι εξαιρετικά φωτοευαίσθητο και πρέπει να ελαχιστοποιείται η παραμονή του στο φως. Αφού σκεπάσουμε τις τομές ιστού με επαρκή ποσότητα, επώαζουμε για 1h στο σκοτάδι. Μετά το πέρας της 1h, αφαιρούμε την περίσσεια του διαλύματος δευτερογενούς αντισώματος, και πραγματοποιούμε μερικές πλύσεις με PBS 1x.

## 8) Mounting

Με τον όρο mounting εννοούμε την προετοιμασία της αντικειμενοφόρου πλάκας για μικροσκοπία, η οποία πραγματοποιείται με την επίστρωση του δείγματος με κατάλληλο υλικό επίστρωσης, ώστε να παρέχεται η απαραίτητη προστασία, που συντελεί στην διατήρηση του ιστού. Στη συνέχεια ακολουθεί η κάλυψη των δειγμάτων με καλυπτρίδα. Η επικόλληση πραγματοποιείται με PVA. Το PVA διατηρείται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , είναι παχύρευστο, και φωτοευαίσθητο, Αφήνουμε μικρή ποσότητα σε διάφορα σημεία της καλυπτρίδας, και έπειτα με μια λαβίδα, την τοποθετούμε προσεκτικά πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Έπειτα, ασκούμε ελαφρώς πίεση με την λαβίδα, ώστε η περίσσεια του PVA να διαφύγει από πλάγια, με σκοπό να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες οι οποίες δημιουργούν πρόβλημα κατά την μικροσκοπία. Τέλος, αφήνουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα σε θερμοκρασία δωματίου το λιγότερο για 1h, σε σκοτάδι, ώστε να κολλήσει καλά η καλυπτρίδα. Αποθήκευση γίνεται στους  $4^{\circ}\text{C}$ , σε κασετίνα. Οποιαδήποτε μεταφορά εκτός κασετίνας γίνεται τυλίγοντας το δείγμα με αλουμινόχαρτο, ώστε να μην εκτίθεται στο φως.

### **Ιστοχημική ανάλυση τύπου τύπου μυϊκών ινών**

#### **Αρχή**

Όπως περιγράφηκε παραπάνω, υπάρχουν διάφοροι τύπου σκελετικών μυϊκών ινών. Για τον λόγο αυτό, έχει αναπτυχθεί μια μεθοδολογία η οποία επιτρέπει την οπτικοποίηση και την κατηγοριοποίηση των μυϊκών ινών με βάση το χρώμα που δίνουν μετά από χημική επεξεργασία. Η δοκιμασία αυτή πραγματοποιείται σε συνεχείς τομές ιστού. Στηρίζεται στην παρατήρηση πως η ΑΤΡάση της μυοσίνης δείχνει διαφορετικούς βαθμούς ευαισθησίας ανάλογα με τον τύπο της μυϊκής ίνας, μετά από κατεργασία με ειδικό διάλυμα όξινου pH, το οποίο σε ορισμένες ίνες ενεργοποιεί το ένζυμο, ενώ σε άλλες το καθιστά αδρανές. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται πως η επίδραση συγκεκριμένου pH μπορεί να αδρανοποιήσει την ΑΤΡάση. Στη συνέχεια, επωάζεται το δείγμα σε διάλυμα ATP που περιέχει ασβέστιο σε αλκαλικό pH. Με αυτή την διαδικασία απελευθερώνεται ανόργανος φώσφορος ο οποίος καθιζάνει σαν φωσφορικό ασβέστιο. Στην συνέχεια, το δείγμα τοποθετείται σε διάλυμα χλωριούχου κοβαλτίου, όπου το ασβέστιο του φωσφορικού ασβεστίου, αντικαθίσταται με κοβάλτιο, δίνοντας φωσφορικό κοβάλτιο. Τέλος, το δείγμα επωάζεται με διάλυμα σουλφιδίου του αμμωνίου, και ο φώσφορος αντικαθίσταται με κοβάλτιο, δίνοντας φωσφορικό κοβάλτιο. Τέλος, το δείγμα επωάζεται σε διάλυμα σουλφιδίου του αμμωνίου και ο φώσφορος αντικαθίσταται αφήνοντας ένα καφέ-μαύρο ίζημα σουλφιδικού κοβαλτίου, χρωματίζοντας με αυτόν τον τρόπο τα σημεία δράσης της ΑΤΡάσης της μυοσίνης. Μετά από μελέτες έχει βρεθεί ότι οι μυϊκές ίνες μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις βασικές κατηγορίες ανάλογα με την τελική τους χρώση. Η τελική χρώση μεταβάλλεται ανάλογα με το pH του πρώτου διαλύματος. Ο πίνακας που ακολουθεί δείχνει τον τρόπο ταξινόμησης των μυϊκών ινών με βάση την χρώση τους, σε διαφορετικά αρχικά pH επώασης (Brooke MH. et al, 1970).

	pH 4,37	pH 4,6	pH 10,3
<b>I</b>	●	●	○
<b>IIA</b>	○	○	●
<b>IIIX</b>	○	●	●

Πίνακας 2: Χρωματικές διαφορές μεταξύ των τύπων μυϊκών ινών, ανάλογα με το pH του διαλύματος της πρώτης επώασης, μετά το πέρας της ιστοχημικής ανάλυσης που βασίζεται στην δραστικότητα της ATPάσης της μυοσίνης (Brooke MH. et al, 1970).

### Μεθοδολογία

Τα πρώτα 3 βήματα είναι ίδια με αυτά που πραγματοποιήθηκαν κατά την ανοσοϊστοχημεία για αυτό και θα παραλειφθούν. Επιπλέον, δεν πραγματοποιείται μονιμοποίηση κατά την συγκεκριμένη ιστοχημική ανάλυση, γιατί η επώαση με ισχυρούς οργανικούς διαλύτες θα κατέστειλε την ενζυμική δραστικότητα της ATPάσης.

- 1) Επώαση με διάλυμα οξικού νατρίου και χλωριούχου καλίου 0,1 M pH=4,6

Διάρκεια 10min

- 2) Επώαση με διάλυμα οξικού νατρίου και χλωριούχου καλίου 0,1 M pH =4,4

Διάρκεια 10min

- 3) Επώαση με διάλυμα 20 mM γλυκίνης και 20 mM χλωριούχου ασβεστίου pH=9,4

Διάρκεια 30s

- 4) Επώαση με διάλυμα 40 mM γλυκίνης, 20 mM ασβέστιο και 2,5 mM ATP pH=9,4

Διάρκεια 25min

- 5) 3 διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου 1% w/v.

Διάρκειας 30s ανά πλύση. Ανανεώνουμε το χλωριούχο ασβέστιο κάθε φορά

- 6) Πλύση με χλωριούχο κοβάλτιο 2% w/v

Διάρκεια 3min

- 7) 3 διαδοχικές πλύσεις με dH<sub>2</sub>O

Διάρκειας 30s ανά πλύση. Ανανεώνουμε το dH<sub>2</sub>O κάθε φορά. Μεταφέρουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα στον απαγωγό για το επόμενο βήμα.

- 8) Επώαση με σουλφίδιο του αμμωνίου 1% w/v και 2 διαδοχικές πλύσεις με dH<sub>2</sub>O

Η επώαση με σουλφίδιο του αμμωνίου διαρκεί μόλις 5s. Ακολουθούν οι 2 πλύσεις για 30s. Σε αυτό το βήμα παρατηρείται ο χρωματισμός του ιστού σε διάφορες αποχρώσεις.

## 9) Mounting

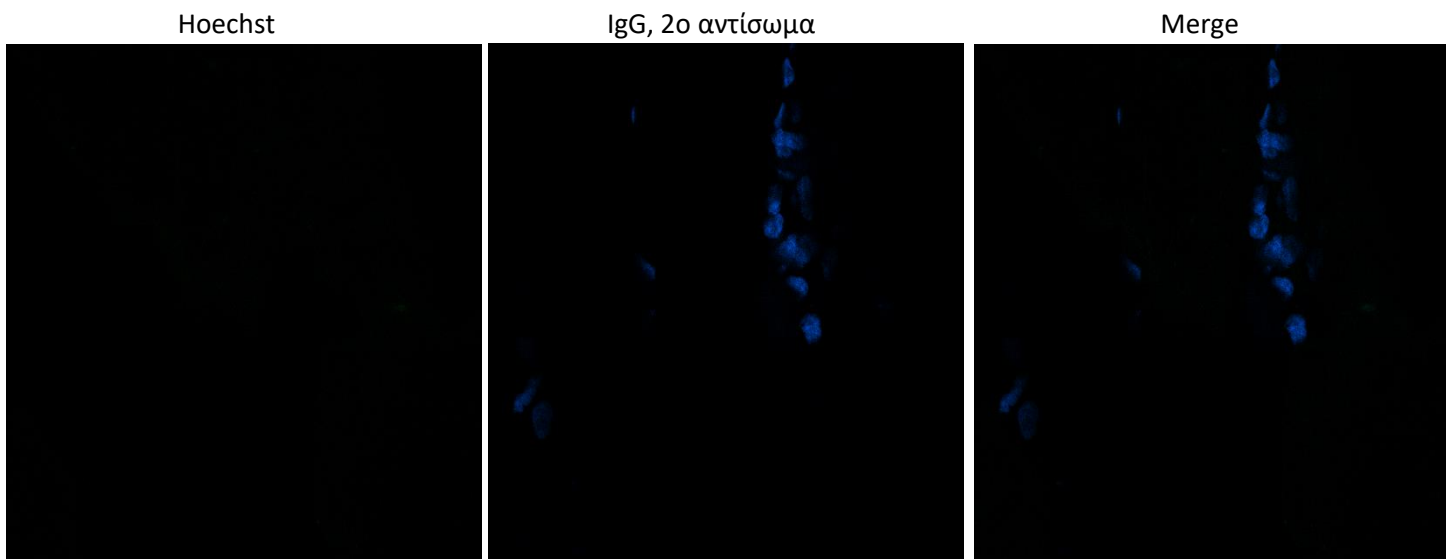
Ομοίως με την ανοσοϊστοχημεία.

### **Αποτελέσματα**

### **Ανοσοϊστοχημεία**

#### **Μυϊκός ιστός χοίρου**

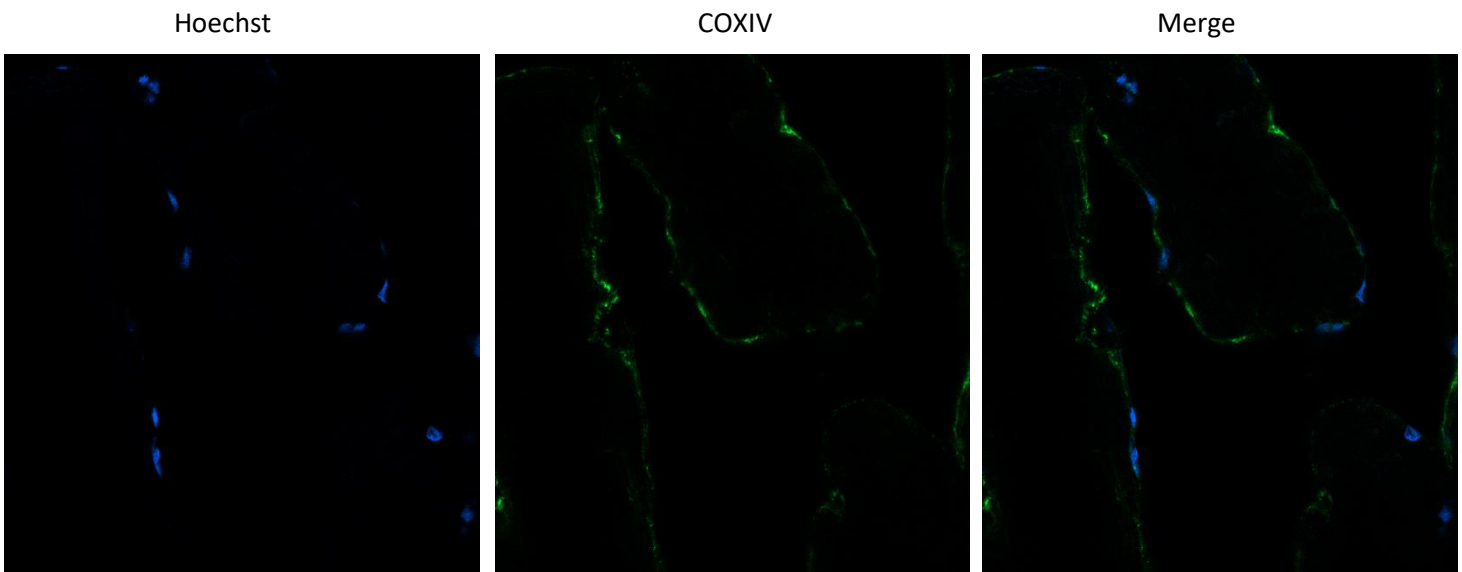
1) Έλεγχος αυτοφθορισμού δευτερογενούς αντισώματος anti-rabbit Alexa Fluor 488.



- Οι τομές, πάχους 6μm, επώαστηκαν για 1 ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα anti-rabbit Alexa Fluor 488 σε συγκέντρωση 1:500 v/v. Οι εικόνες πάρθηκαν σε μεγέθυνση 40x με την χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει καθόλου σήμα από το δευτερογενές αντίσωμα απουσία του πρωτογενούς αντισώματος. Ο μπλε φθορισμός προέρχεται από την χρωστική Hoechst, η οποία προσδένει DNA και συνεπώς δείχνει τους πυρήνες της μυϊκής ίνας. Υπενθυμίζεται πως μία μυϊκή ίνα είναι το αποτέλεσμα της σύντηξης πολλών μυοβλαστών, και για αυτό πρόκειται για πολυπύρρηνα κύτταρα. Η απουσία σήματος σημαίνει ότι δεν λαμβάνεται ψευδώς θετικό σήμα.

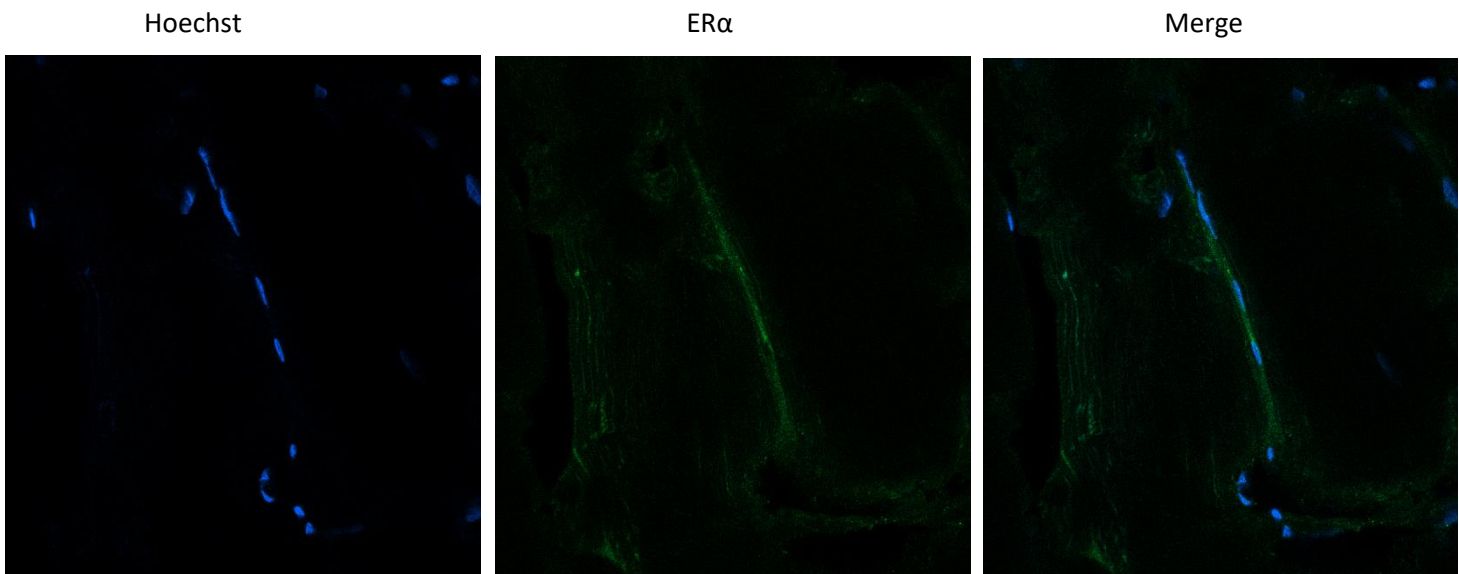


2) Ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός μιτοχονδριακού ενζύμου COXIV.



- Οι τομές, πάχους 6μm, επώαστηκαν για 1h με το πρωτογενές αντίσωμα anti-COXIV σε συγκέντρωση 1:50 v/v. Ακολούθησε επώαση για 1h με το δευτερογενές αντίσωμα anti-rabbit Alexa Fluor 488 σε συγκέντρωση 1:500 v/v. Οι εικόνες λήφθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, σε μεγέθυνση 40x. Με μπλε φθορισμό φαίνονται οι πυρήνες της μυϊκής ίνας, ενώ με πράσινο φαίνεται το μιτοχονδριακό ένζυμο COXIV. Παρατηρούμε ότι τα μιτοχόνδρια βρίσκονται περιμετρικά της μυϊκής ίνας σε υψηλό αριθμό, γεγονός που συμφωνεί με την βιβλιογραφία. Επίσης, φαίνεται η χαρακτηριστική κοκκιώδης μορφή των μιτοχονδρίων, γεγονός που επιβεβαιώνει περαιτέρω την ειδικότητα του φθορισμού.

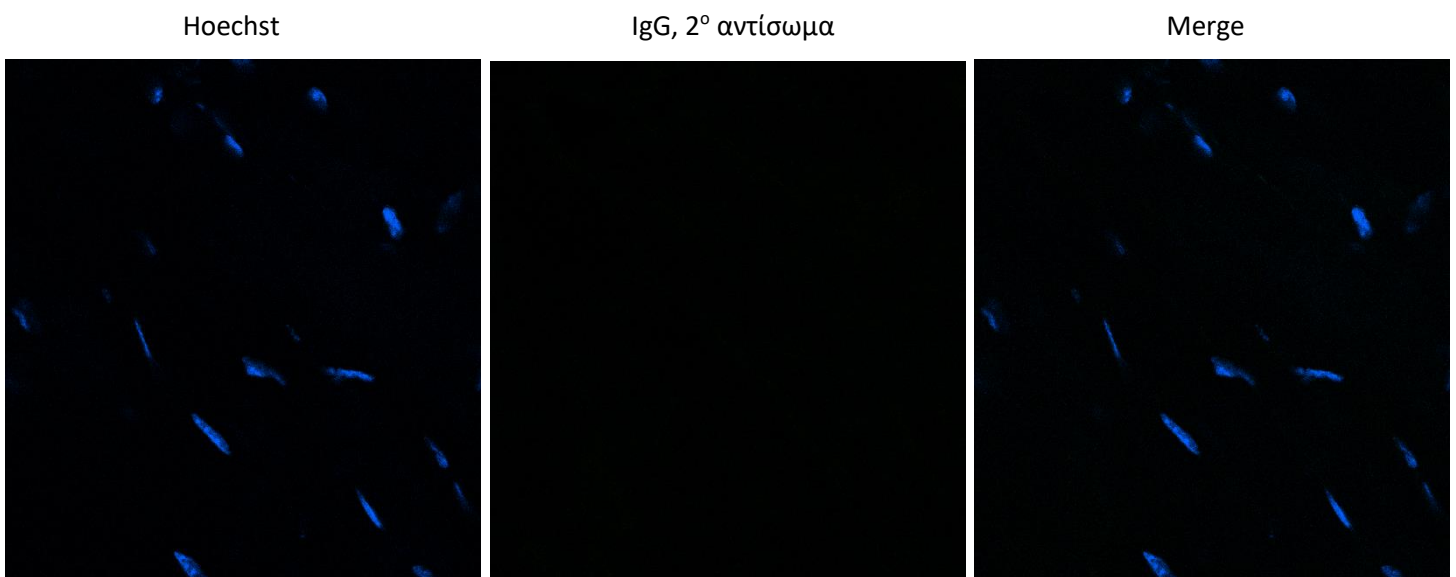
3) Ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός του υποδοχέα ERα.



- Οι τομές, πάχους 6μm, επώαστηκαν για 1h με το πρωτογενές αντίσωμα anti-ERα σε συγκέντρωση 1:50 v/v. Ακολούθησε επώαση για 1h με το δευτερογενές αντίσωμα anti-rabbit Alexa Fluor 488 σε συγκέντρωση 1:500 v/v. Οι εικόνες λήφθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, σε μεγέθυνση 40x. Με μπλε φθορισμό φαίνονται οι πυρήνες της μυϊκής ίνας, ενώ με πράσινο φαίνεται ο υποδοχέας οιστρογόνων ERα. Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του ERα εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα της μυϊκής ίνας, ενώ μικρό ποσοστό του μπορεί να εντοπίζεται εντός του πυρήνα.

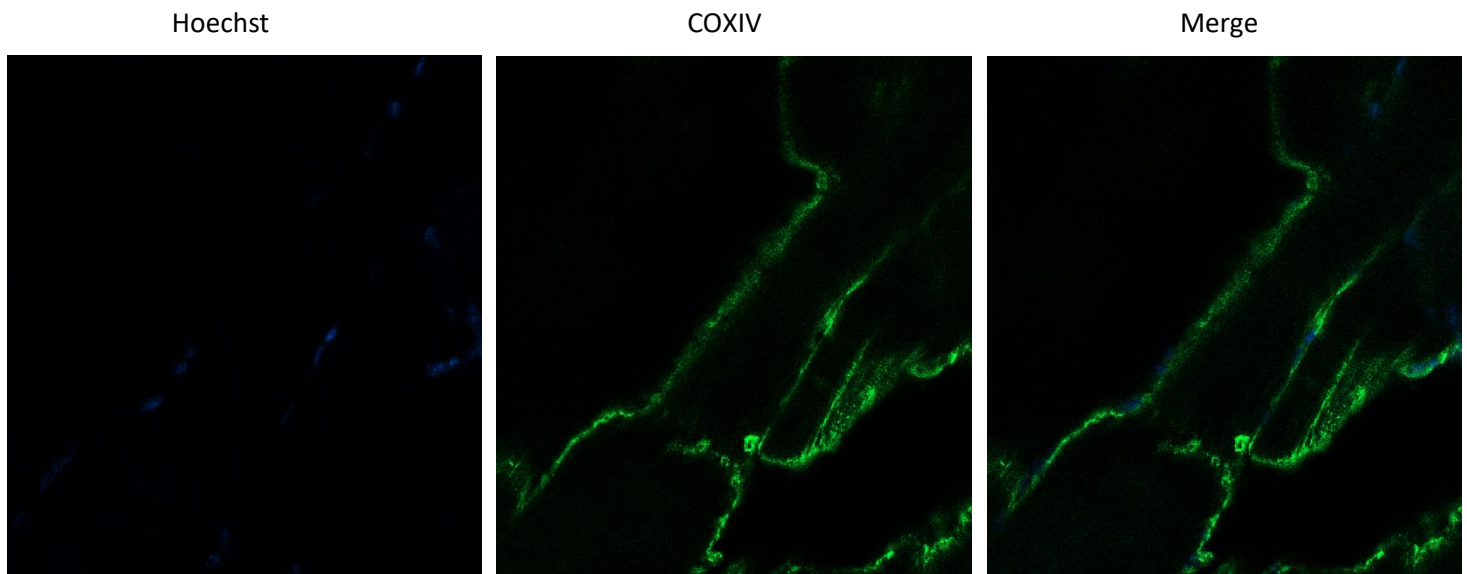
## Μυϊκός ιστός ποντικού

1) Έλεγχος αυτοφθορισμού δευτερογενούς αντισώματος anti-rabbit Alexa Fluor 488.



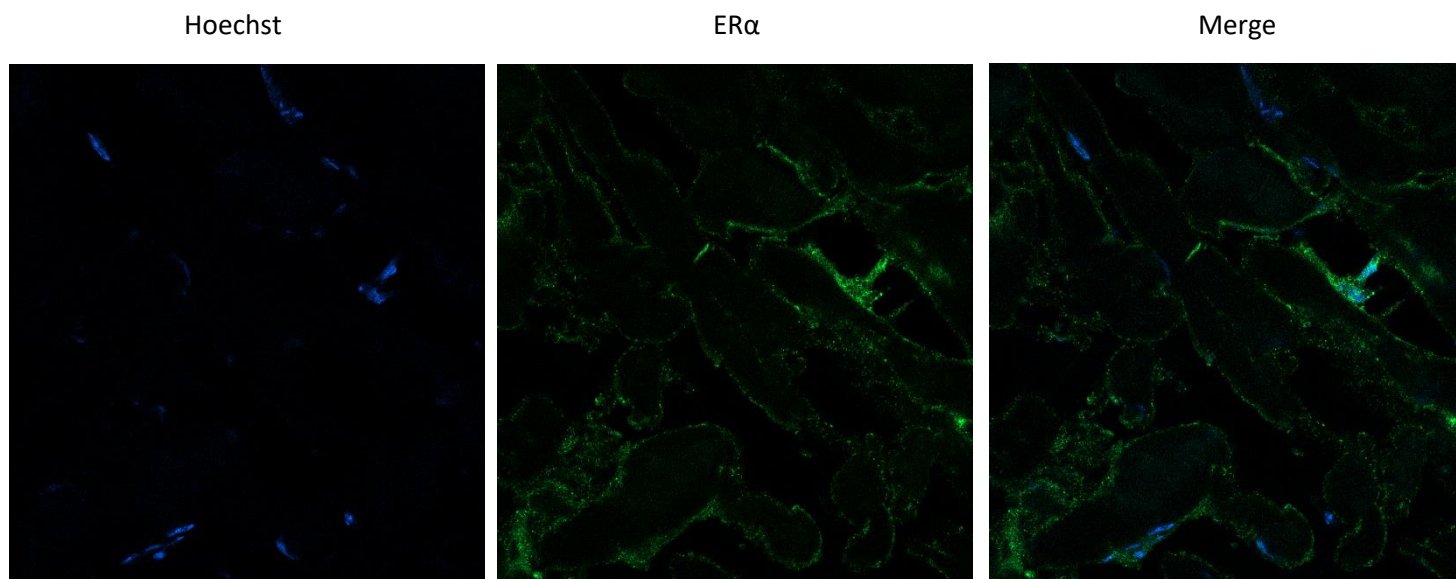
- Οι τομές, πάχους 6μm, επώαστηκαν για 1h μόνο με το δευτερογενές αντίσωμα anti-rabbit Alexa Fluor 488 σε συγκέντρωση 1:500 v/v. Οι εικόνες λήφθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, σε μεγέθυνση 40x Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει καθόλου σήμα από το δευτερογενές αντίσωμα απουσία του πρωτογενούς αντισώματος. Ο μπλε φθορισμός προέρχεται από την χρωστική Hoechst, η οποία προσδένει DNA και συνεπώς δείχνει τους πυρήνες της μυϊκής ίνας. Υπενθυμίζεται πως μία μυϊκή ίνα είναι το αποτέλεσμα της σύντηξης πολλών μυοβλαστών, και για αυτό πρόκειται για πολυπύρρηνα κύτταρα. Αυτό σημαίνει ότι δεν λαμβάνεται ψευδώς θετικό σήμα.

1) Ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός μιτοχονδριακού ενζύμου COXIV.



- Οι τομές, πάχους 6μm, επώστηκαν για 1h με το πρωτογενές αντίσωμα anti-COXIV σε συγκέντρωση 1:50 v/v. Ακολούθησε επώαση για 1h με το δευτερογενές αντίσωμα anti-rabbit Alexa Fluor 488 σε συγκέντρωση 1:500 v/v. Οι εικόνες λήφθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, σε μεγέθυνση 40x. Με μπλε φθορισμό φαίνονται οι πυρήνες της μυϊκής ίνας, ενώ με πράσινο φαίνεται το μιτοχονδριακό ένζυμο COXIV. Παρατηρούμε ότι τα μιτοχόνδρια βρίσκονται περιμετρικά της μυϊκής ίνας σε υψηλό αριθμό, γεγονός που συμφωνεί με την βιβλιογραφία. Επίσης, φαίνεται η χαρακτηριστική κοκκιώδης μορφή των μιτοχονδρίων, γεγονός που επιβεβαιώνει περαιτέρω την ειδικότητα του φθορισμού.

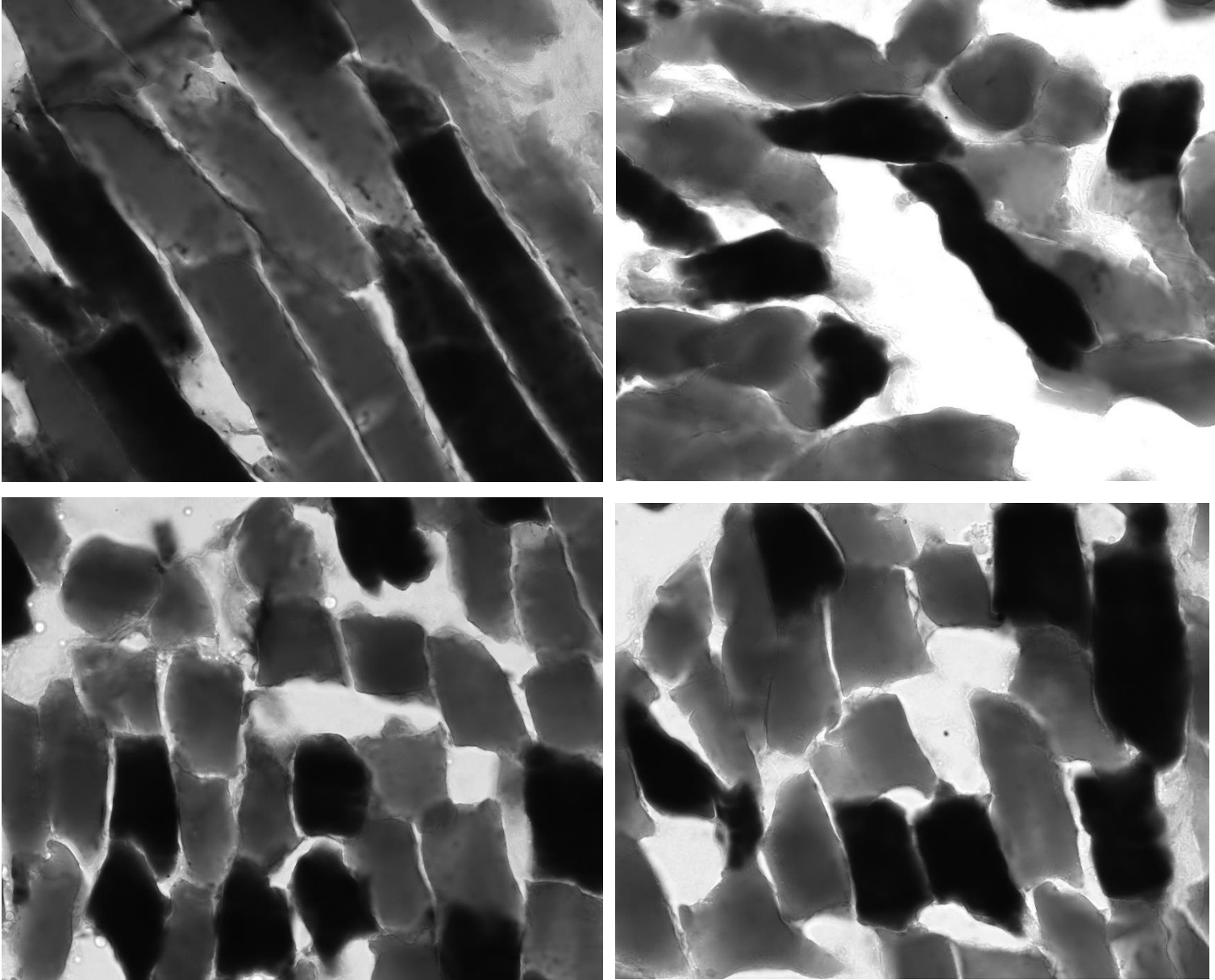
1) Ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός του υποδοχέα ERα.



- Οι τομές, πάχους 6μm, επώαστηκαν για 1h με το πρωτογενές αντίσωμα anti-ERα σε συγκέντρωση 1:50 v/v. Ακολούθησε επώαση για 1h με το δευτερογενές αντίσωμα anti-rabbit Alexa Fluor 488 σε συγκέντρωση 1:500 v/v. Οι εικόνες λήφθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, σε μεγέθυνση 40x. Με μπλε φθορισμό φαίνονται οι πυρήνες της μυϊκής ίνας, ενώ με πράσινο φαίνεται ο υποδοχέας οιστρογόνων ERα. Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του ERα εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα της μυϊκής ίνας, ενώ ένα μικρό ποσοστό μπορεί να εντοπίζεται και στον πυρήνα.

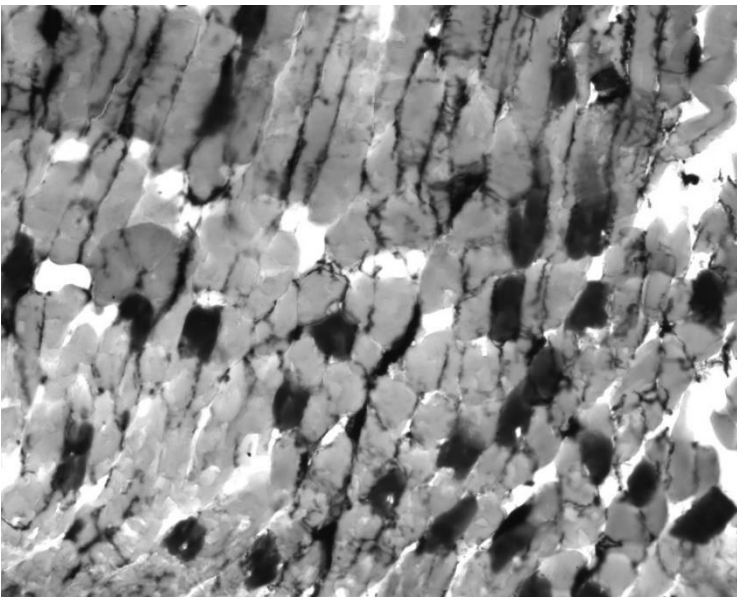
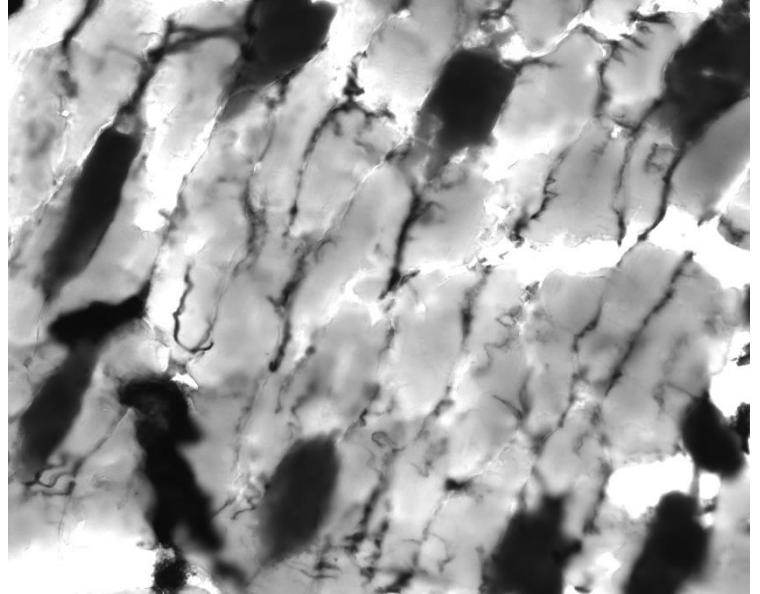
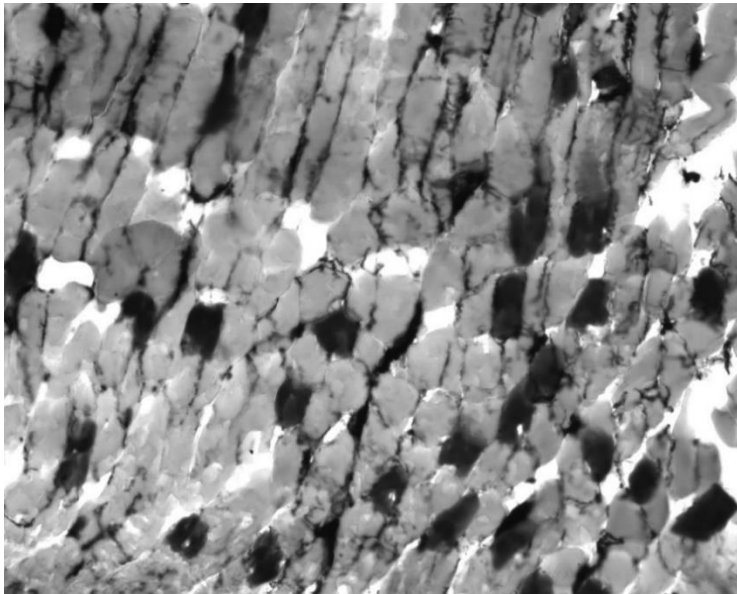
## Ιστοχημική ανάλυση τύπου μυϊκών ινών ( Δοκιμασία ΑΤΡάσης).

### Μυϊκός ιστός χοίρου



- Οι τομές της εικόνας έχουν πάχος 6μm. Οι εικόνες λήφθηκαν με μεγέθυνση 40x στο ορατό πεδίο. Η πρώτη επώαση πραγματοποιήθηκε με pH=4,6. Το τελευταίο βήμα του πρωτοκόλλου (πλύση με σουλφίδιο του αμμωνίου) δίνει το χαρακτηριστικό αυτό χρώμα στις τομές, ανάλογα με την δραστικότητα της ΑΤΡάσης της μωσίνης, μετά από χορήγηση ΑΤΡ, σε κάθε μία. Ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους μυϊκών ινών, η δραστικότητα της ΑΤΡάσης ποικίλει, και το γεγονός αυτό μας επιτρέπει να τις ξεχωρίσουμε. Ερμηνεύοντας τις εικόνες με βάση τον Πίνακα 1 (σελ. 37), συμπεραίνουμε ότι ο μυϊκός ιστός χοίρου αποτελείται κυρίως από μυϊκές ίνες τύπου I και ΙΙΧ, με παραπλήσια ποσοστά.

## Μυϊκός ιστός ποντικού



- Οι τομές της εικόνας έχουν πάχος 6μm. Οι εικόνες λήφθηκαν με μεγέθυνση 40x στο ορατό πεδίο. Η πρώτη επώαση πραγματοποιήθηκε με pH=4,6. Το τελευταίο βήμα του πρωτοκόλλου (πλύση με σουλφίδιο του αμμωνίου) δίνει το χαρακτηριστικό αυτό χρώμα στις τομές, ανάλογα με την δραστικότητα της ΑΤΡάσης της μυοσίνης, μετά από χορήγηση ΑΤΡ, σε κάθε μία. Ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους μυϊκών ινών, η δραστικότητα της ΑΤΡάσης ποικίλει, και το γεγονός αυτό μας επιτρέπει να τις ξεχωρίσουμε. Συνεπώς, ερμηνεύοντας τις εικόνες με βάση τον Πίνακα 1, συμπεραίνουμε ότι ο μυϊκός ιστός κνήμης ποντικού αποτελείται κυρίως από μυϊκές ίνες τύπου I και ΙΙΧ, με τις μυϊκές ίνες τύπου I να είναι εμφανώς περισσότερες, το οποίο μπορεί να εξηγηθεί από την λειτουργία της κνήμης. Επίσης παρατηρείται ένα μικρό ποσοστό μυϊκών ινών τύπου ΙΙΑ. Η κνήμη είναι ένας σταθεροποιητικός μύς ο

οποίος βρίσκεται σε κάποια βαθμό σύσπασης καθόλη την διάρκεια της ημέρας, συνεπώς είναι λογικό να αξιοποιείται η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης για την βραδύτερη, αλλά συνεχή και σε μεγαλύτερη ποσότητα παραγωγή του ATP.

## Συζήτηση

Τα οιστρογόνα αποτελούν μία κατηγορία των στεροειδών ορμονών του ανθρώπινου οργανισμού, ενώ είναι οι κύριες φυλετικές γυναικείες ορμόνες. Επιτελούν ποικίλες δράσεις, όπως είναι η προστασία του νευρικού και καρδιαγγειακού συστήματος, η ανάπτυξη των θηλυκών δευτερευόντων χαρακτηριστικών κατά την εφηβεία, ρυθμίζουν τον εμμηνορροϊκό κύκλο, ενώ συμβάλλουν και στην διατήρηση της οστικής μάζας (Lee HR. et al, 2012). Οι δράσεις των οιστρογόνων διαμεσολαβούνται από τους υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) που ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (NR). Πιο συγκεκριμένα, διακρίνουμε δύο υπότυπους τον υποδοχέα οιστρογόνων  $\alpha$  (Estrogen Receptor alpha, ER $\alpha$ , NR3A1) και τον υποδοχέα οιστρογόνων  $\beta$  (Estrogen Receptor beta, ER $\beta$ , NR3A2), ενώ πρόσφατα ταυτοποιήθηκε και ο διαμεμβρανικός υποδοχέας οιστρογόνων GPER30, ο οποίος φαίνεται να ευθύνεται για τις ταχείες αποκρίσεις στην παρουσία των οιστρογόνων (Prossnitz ER. et al, 2008). Οι υποδοχείς οιστρογόνων ER $\alpha$  και ER $\beta$  δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, συνδεδεμένοι είτε άμεσα στο DNA μέσω των ERE αλληλουχιών, είτε έμμεσα μέσω αλληλεπιδράσεων με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ή μεταγραφικά σύμπλοκα, ρυθμίζοντας την μεταγραφή στόχων, ανάλογα με τον ιστό. Σε αδρανή μορφή οι υποδοχείς ER $\alpha$  και ER $\beta$  βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα σε φυσική σύνδεση με πρωτεΐνες-συνοδούς, όπως η HSP70, ενώ μετά την σύνδεση του προσδέτη, μετατοπίζονται στον πυρήνα για να ασκήσουν την βιολογική τους δράση. Πρόσφατα, έχει ταυτοποιηθεί και η ύπαρξη των υποδοχέων ER $\alpha$  και ER $\beta$  στο μιτοχόνδριο, γεγονός το οποίο έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον για το πως συμβάλλουν στην ομοιόσταση του συγκεκριμένου οργανιδίου (Sever R. et al, 2013).

Οι υποδοχείς ER $\alpha$  και ER $\beta$  παρουσιάζουν ορισμένες βασικές διαφορές. Παρότι γενικά εμφανίζουν υψηλή ομοιολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία, υπάρχει σημαντική διαφορά στην AF-2 περιοχή, που είναι υπεύθυνη για την σύνδεση της οιστραδιόλης. Επίσης, ο ER $\beta$  ασκεί ανασταλτική δράση στον ER $\alpha$ , μέσω της δημιουργίας ετεροδιμερών ER $\beta$ /ER $\alpha$ , είτε μέσω του ανταγωνισμού για τις θέσεις πρόσδεσης. Αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι η αναλογία ER $\alpha$ /ER $\beta$  είναι αυξημένη σε πολλούς τύπους καρκίνου (Jia M et al, 2015). Περαιτέρω, οι δύο υποδοχείς εμφανίζουν και διαφορετική κατανομή στους ανθρώπινους ιστούς. Ο ER $\alpha$  επικρατεί στον μαστικό αδένα, στην μήτρα, στα ωάρια, τα οστά και το στρώμα του προστάτη μεταξύ άλλων, ενώ ο ER $\beta$  είναι ο κύριος υποδοχέας σε ιστούς όπως η ουροδόχος κύστη, ο λιπώδης ιστός, το παχύ έντερο, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, και το επιθήλιο του προστάτη (Paterni I et al, 2014).

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία στόχος ήταν ο υποκυτταρικός εντοπισμός του υποδοχέα οιστρογόνων ER $\alpha$ , σε συνεχείς τομές μυϊκού ιστού χοίρου και ποντικού. Μελετώντας τις εικόνες που λήφθηκαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο, παρατηρούμε ότι ο υποδοχέας οιστρογόνων ER $\alpha$  εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, περιπυρηνικά, ενώ ένα μικρό ποσοστό εντοπίζεται και εντός αυτού. Γνωρίζουμε ότι οι υποδοχέας ER $\alpha$  βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου στην όμο- ή έτερο-διμερισμένη μορφή του μετά την σύνδεση του προσδέτη, όπου ρυθμίζει την μεταγραφή γονιδίων στόχων, ενώ σε ανενεργή μορφή, ο



υποδοχέας οιστρογόνων ERα εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Αυτό επαληθεύεται και από τα αποτελέσματα μας, καθώς όπως φαίνεται και στις εικόνες, το μεγαλύτερο κλάσμα του ERα εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, τα αποτελέσματά μας δείχνουν να μην υπάρχει σημαντικό ποσοστό ERα στα μιτοχόνδρια.

Το εγχείρημα αποτελεί μια ενδιαφέρουσα ανοσοϊστοχημική προσέγγιση για τον υποδοχέα ERα, το οποίο ανοίγει το δρόμο για την μελλοντική εφαρμογή της ανίχνευσης του υποδοχέα ERα για διαγνωστικούς σκοπούς σε δείγματα ιστών, ενώ μπορεί να αποτελέσει και ένα ισχυρό ερευνητικό εργαλείο για την περαιτέρω διερεύνηση παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται με τα οιστρογόνα. Συνεπώς, μελλοντικά θα είχε ενδιαφέρον να γίνει σύγκριση του ενδοκυτταρικού εντοπισμού του υποδοχέα ERα σε παθολογικές καταστάσεις, όπως για παράδειγμα σε πρώιμα ή προχωρημένα στάδια νευροεκφυλιστικών διαδικασιών, μιας και τα οιστρογόνα ασκούν νευροπροστατευτική δράση (Parkinson's, Alzheimer's). Τέλος, η ικανότητα στοχευμένου εντοπισμού του ERα σε ιστούς μπορεί να επιτρέψει την σάρωση υποψήφια αναλόγων των οιστρογόνων σε πιο συστηματικό επίπεδο, για την ανάπτυξη αποτελεσματικών φαρμάκων.

Κάθε σκελετικός μυς αποτελείται από πολυάριθμες μυϊκές ίνες, οι οποίες αποτελούν την βασική δομική μονάδα. Όπως είδαμε, όλες οι μυϊκές ίνες δεν είναι όμοιες μεταξύ τους και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο μεγάλες ομάδες, με βάση χαρακτηριστικά όπως η μιτοχονδριακή πυκνότητα, η αντοχή στην παρατεταμένη σύσπαση, ο αριθμός μιτοχονδρίων και ο τρόπος με τον οποίο προτιμούν να παράγουν ATP. Συγκεκριμένα, υπάρχουν οι μυϊκές ίνες τύπου I και τύπου II. Οι μυϊκές ίνες τύπου I χαρακτηρίζονται ως βραδείας σύσπασης, αξιοποιούν τον αερόβιο μεταβολισμό για την παραγωγή του ATP, και επιστρατεύονται σε κινήσεις χαμηλής έντασης αυξημένης διάρκειας. Αντιθέτως, οι μυϊκές ίνες τύπου II αποκαλούνται ταχείας σύσπασης, αξιοποιούν τον αναερόβιο μεταβολισμό με κύριο καύσιμο το αποθηκευμένο γλυκογόνο, και είναι υπεύθυνες για κινήσεις που απαιτούν μέγιστη δύναμη και εκρηκτικότητα. Με βάση την ισομορφία της βαριάς αλυσίδας που εκφράζεται στην εκάστοτε μυϊκή ίνα, οι τύπου II ίνες κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε 2 μεγάλους υπότυπους, IIA, IIB, IIX. Η ιστοχημική ανάλυση με βάση την δραστικότητα της ATPάσης της μυοσίνης που πραγματοποιήσαμε, μέσω μιας σειράς βημάτων μας επιτρέπει να ξεχωρίσουμε οπτικά τις μυϊκές ίνες μεταξύ τους. Μεταξύ των δύο ιστών που εξετάστηκαν, παρατηρούνται κάποιες σημαντικές διαφορές. Ενώ με επιτυχία ξεχωρίζουν και στους δύο ιστούς οι μυϊκές ίνες τύπου I με μία ισομορφία τυπου II (IIA στον ποντικό και IIX στον χοίρο), φαίνεται πως η αναλογία I/II στον ποντικό είναι αυξημένη σε σχέση με τον χοίρο. Σημειώνεται ότι οι μυϊκές ίνες IIA ονομάζονται και διάμεσες, καθώς διαθέτουν χαρακτηριστικά και από τις δύο κύριες ομάδες ινών. Αυτό αφενός μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι τομές ποντικού προήλθαν από κνήμη, ένας μυς ο οποίος δεν απαιτείται να συσπάται ταχύτατα και με εκρηκτικότητα, αλλά χρειάζεται να λειτουργεί σε ένα ποσοστό της μέγιστης δυνατότητάς του για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Στον μυϊκό ιστό χοίρου, η αναλογία I/II φαίνεται να είναι πιο ισορροπημένη. Αξιοσημείωτη είναι επίσης η διαφορά του μεγέθους της μυϊκής ίνας όπως φαίνεται από τις εικόνες, εξαιτίας της διαφοράς του μεγέθους των δύο ζώων, με την διατομή της χοιρινής μυϊκής ίνας να είναι αισθητά μεγαλύτερη. Τέλος, δεν παρατηρήσαμε κάποιο διαφορετικό μοτίβο κατανομής του υποδοχέα οιστρογόνων α (ERα) στους διαφορετικούς τύπους μυϊκών ινών που ελέγχθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη και συνθήκη.

## Βιβλιογραφία

1. **Almey A**, Milner TA, Brake WG. Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females. *Horm Behav.* 2015 Aug;74:125-38. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.06.010. Epub 2015 Jun 27. PMID: 26122294; PMCID: PMC4820286.
2. **Arnold SF**, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC. Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by src family tyrosine kinases in vitro. *Mol Endocrinol.* 1995 Jan;9(1):24-33. doi: 10.1210/mend.9.1.7539106. PMID: 7539106.
3. **Bentov Y**, Jurisicova A, Kenigsberg S, Casper RF. What maintains the high intra-follicular estradiol concentration in pre-ovulatory follicles? *J Assist Reprod Genet.* 2016 Jan;33(1):85-94. doi: 10.1007/s10815-015-0612-1. Epub 2015 Nov 9. PMID: 26552664; PMCID: PMC4717133.
4. **Bourdeau V**, Deschênes J, Métivier R, Nagai Y, Nguyen D, Bretschneider N, Gannon F, White JH, Mader S. Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol Endocrinol.* 2004 Jun;18(6):1411-27. doi: 10.1210/me.2003-0441. Epub 2004 Mar 4. PMID: 15001666.
5. **Brooke MH**, Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch Neurol.* 1970 Oct;23(4):369-79. doi: 10.1001/archneur.1970.00480280083010. PMID: 4248905.
6. **Burns KA**, Rodriguez KF, Hewitt SC, Janardhan KS, Young SL, Korach KS. Role of estrogen receptor signaling required for endometriosis-like lesion establishment in a mouse model. *Endocrinology.* 2012 Aug;153(8):3960-71. doi: 10.1210/en.2012-1294. Epub 2012 Jun 14. PMID: 22700766; PMCID: PMC3404357.
7. **Carmeci C**, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics.* 1997 Nov 1;45(3):607-17. doi: 10.1006/geno.1997.4972. PMID: 9367686.
8. **Chantalat E**, Boudou F, Laurell H, Paliarne G, Houtman R, Melchers D, Rochaix P, Filleron T, Stella A, Burllet-Schiltz O, Brouchet A, Flouriot G, Métivier R, Arnal JF, Fontaine C, Lenfant F. The AF-1-deficient estrogen receptor ER $\alpha$ 46 isoform is frequently expressed in human breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2016 Dec 7;18(1):123. doi: 10.1186/s13058-016-0780-7. PMID: 27927249; PMCID: PMC5142410.
9. **Charles A** Janeway et al, *Immunobiology* 5th edition
10. **Chen JQ**, Delannoy M, Cooke C, Yager JD. Mitochondrial localization of ER $\alpha$  and ER $\beta$  in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004 Jun;286(6):E1011-22. doi: 10.1152/ajpendo.00508.2003. Epub 2004 Jan 21. PMID: 14736707.
11. **Couse JF**, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev.* 1999 Jun;20(3):358-417. doi: 10.1210/edrv.20.3.0370. Erratum in: *Endocr Rev* 1999 Aug;20(4):459. PMID: 10368776.
12. **Cowley SM**, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem.* 1997 Aug 8;272(32):19858-62. doi: 10.1074/jbc.272.32.19858. PMID: 9242648.
13. **Denner LA**, Weigel NL, Maxwell BL et al. Regulation of Progesterone Receptor-Mediated Transcription by Phosphorylation. *Science* 1990; 250 (4988): 1740-1743.

14. **Duplessis TT**, Williams CC, Hill SM, Rowan BG. Phosphorylation of Estrogen Receptor  $\alpha$  at serine 118 directs recruitment of promoter complexes and gene-specific transcription. *Endocrinology*. 2011 Jun;152(6):2517-26. doi: 10.1210/en.2010-1281. Epub 2011 Apr 19. PMID: 21505052; PMCID: PMC3100622.
15. **Fuentes N**, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2019;116:135-170. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.001. Epub 2019 Feb 4. PMID: 31036290; PMCID: PMC6533072.
16. **Gala FA**, Morrison SL. V region carbohydrate and antibody expression. *J Immunol*. 2004 May 1;172(9):5489-94. doi: 10.4049/jimmunol.172.9.5489. PMID: 15100290.
17. **Hall JM**, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem*. 2001 Oct 5;276(40):36869-72. doi: 10.1074/jbc.R100029200. Epub 2001 Jul 17. PMID: 11459850.
18. **Hall JM**, McDonnell DP, Korach KS. Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol*. 2002 Mar;16(3):469-86. doi: 10.1210/mend.16.3.0814. PMID: 11875105.
19. **Henttu PM**, Kalkhoven E, Parker MG. AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol Cell Biol*. 1997 Apr;17(4):1832-9. doi: 10.1128/MCB.17.4.1832. PMID: 9121431; PMCID: PMC232030.
20. **Hevener AL**, Ribas V, Moore TM, Zhou Z. The Impact of Skeletal Muscle ER $\alpha$  on Mitochondrial Function and Metabolic Health. *Endocrinology*. 2020 Feb 1;161(2):bqz017. doi: 10.1210/endocr/bqz017. PMID: 32053721; PMCID: PMC7017798.
21. **Ignar-Trowbridge DM**, Pimentel M, Parker MG, McLachlan JA, Korach KS. Peptide growth factor cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology*. 1996 May;137(5):1735-44. doi: 10.1210/endo.137.5.8612509. PMID: 8612509.
22. **Ikeda, K.**, Horie-Inoue, K. & Inoue, S. Identification of estrogen-responsive genes based on the DNA binding properties of estrogen receptors using high-throughput sequencing technology. *Acta Pharmacol Sin* 36, 24–31 (2015). <https://doi.org/10.1038/aps.2014.123>
23. **Jensen EV**, DeSombre ER. Estrogen-receptor interaction. *Science*. 1973 Oct 12;182(4108):126-34. doi: 10.1126/science.182.4108.126. PMID: 4354173.
24. **Jia M**, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015 Aug;29(4):557-68. doi: 10.1016/j.beem.2015.04.008. Epub 2015 Apr 26. PMID: 26303083.
25. **Kalaitzidis D**, Gilmore TD. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB. *Trends Endocrinol Metab*. 2005 Mar;16(2):46-52. doi: 10.1016/j.tem.2005.01.004. PMID: 15734144.
26. **Kato S**, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*. 1995 Dec 1;270(5241):1491-4. doi: 10.1126/science.270.5241.1491. PMID: 7491495.
27. **Köhler, G.**, Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497 (1975). <https://doi.org/10.1038/256495a0>
28. **Konduri S**, Schwarz RE. Estrogen receptor beta/alpha ratio predicts response of pancreatic cancer cells to estrogens and phytoestrogens. *J Surg Res*. 2007 Jun 1;140(1):55-66. doi: 10.1016/j.jss.2006.10.015. Epub 2007 Feb 1. PMID: 17275032.

29. **Lancaster TS**, Jefferson SJ, Hunter JC, Lopez V, Van Eyk JE, Lakatta EG, Korzick DH. Quantitative proteomic analysis reveals novel mitochondrial targets of estrogen deficiency in the aged female rat heart. *Physiol Genomics*. 2012 Oct 17;44(20):957-69. doi: 10.1152/physiolgenomics.00184.2011. Epub 2012 Aug 28. PMID: 22930739; PMCID: PMC3472466.
30. **Le Dily F**, Beato M. Signaling by Steroid Hormones in the 3D Nuclear Space. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 23;19(2):306. doi: 10.3390/ijms19020306. PMID: 29360755; PMCID: PMC5855546.
31. **Lee HR**, Kim TH, Choi KC. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab Anim Res*. 2012 Jun;28(2):71-6. doi: 10.5625/lar.2012.28.2.71. Epub 2012 Jun 26. PMID: 22787479; PMCID: PMC3389841.
32. **Leung YK**, Mak P, Hassan S, Ho SM. Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: a key to understanding ER-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 29;103(35):13162-7. doi: 10.1073/pnas.0605676103. Epub 2006 Aug 22. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 3;103(40):14977. PMID: 16938840; PMCID: PMC1552044.
33. **Li L**, He S, Sun JM, Davie JR. Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol*. 2004 Aug;82(4):460-71. doi: 10.1139/o04-045. PMID: 15284899.
34. **Lipman NS**, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J*. 2005;46(3):258-68. doi: 10.1093/ilar.46.3.258. PMID: 15953833.
35. **Luo J**, Liu D. Does GPER Really Function as a G Protein-Coupled Estrogen Receptor in vivo? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Mar 31;11:148. doi: 10.3389/fendo.2020.00148. PMID: 32296387; PMCID: PMC7137379.
36. **Maggiolini M**, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Andò S. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2004 Jun 25;279(26):27008-16. doi: 10.1074/jbc.M403588200. Epub 2004 Apr 16. PMID: 15090535.
37. **Marino M**, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics*. 2006;7(8):497-508. doi: 10.2174/138920206779315737. PMID: 18369406; PMCID: PMC2269003.
38. **McDonnell DP**, Clemm DL, Hermann T, Goldman ME, Pike JW. Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol*. 1995 Jun;9(6):659-69. doi: 10.1210/mend.9.6.8592512. PMID: 8592512.
39. **Omoto Y**, Iwase H. Clinical significance of estrogen receptor  $\beta$  in breast and prostate cancer from biological aspects. *Cancer Sci*. 2015 Apr;106(4):337-43. doi: 10.1111/cas.12613. Epub 2015 Mar 9. PMID: 25611678; PMCID: PMC4409875.
40. **Paech K**, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. *Science*. 1997 Sep 5;277(5331):1508-10. doi: 10.1126/science.277.5331.1508. PMID: 9278514.
41. **Pagano MT**, Ortona E, Dupuis ML. A Role for Estrogen Receptor  $\alpha$ 36 in Cancer Progression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Jul 31;11:506. doi: 10.3389/fendo.2020.00506. PMID: 32849292; PMCID: PMC7411082.
42. **Paterni I**, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*. 2014 Nov;90:13-29. doi: 10.1016/j.steroids.2014.06.012. Epub 2014 Jun 24. PMID: 24971815; PMCID: PMC4192010.

43. **Patrone C**, Gianazza E, Santagati S, Agrati P, Maggi A. Divergent pathways regulate ligand-independent activation of ER alpha in SK-N-BE neuroblastoma and COS-1 renal carcinoma cells. *Mol Endocrinol*. 1998 Jun;12(6):835-41. doi: 10.1210/mend.12.6.0114. PMID: 9626659.
44. **Paul Webb**, Phuong Nguyen, Jeanette Shinsako, Carol Anderson, Weijun Feng, Mimi P. Nguyen, Dagang Chen, Shih-Ming Huang, Sujatha Subramanian, Eileen McKinerney, Benita S. Katzenellenbogen, Michael R. Stallcup, Peter J. Kushner, Estrogen Receptor Activation Function 1 Works by Binding p160 Coactivator Proteins, *Molecular Endocrinology*, Volume 12, Issue 10, 1 October 1998, Pages 1605–1618, <https://doi.org/10.1210/mend.12.10.0185>
45. **Pietras RJ**, Szego CM. Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature*. 1975 Jan 31;253(5490):357-9. doi: 10.1038/253357a0. PMID: 1167402.
46. **Prossnitz ER**, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:165-90. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100518. PMID: 18271749.
47. **Pupo**, Marco & Pisano, Assunta & Lappano, Rosamaria & Santolla, Maria & De Francesco, Ernestina & Abonante, Sergio & Rosano, Camillo & Maggiolini, Marcello. (2012). Bisphenol A Induces Gene Expression Changes and Proliferative Effects through GPER in Breast Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Environmental health perspectives*. 120. 1177-82. 10.1289/ehp.1104526.
48. **Raegan O’Lone**, Martin C. Frith, Elinor K. Karlsson, Ulla Hansen, *Genomic Targets of Nuclear Estrogen Receptors*, *Molecular Endocrinology*, Volume 18, Issue 8, 1 August 2004, Pages 1859–1875, <https://doi.org/10.1210/me.2003-0044>
49. **Revankar CM**, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005 Mar 11;307(5715):1625-30. doi: 10.1126/science.1106943. Epub 2005 Feb 10. PMID: 15705806.
50. **Ricke WA**, McPherson SJ, Bianco JJ, Cunha GR, Wang Y, Risbridger GP. Prostatic hormonal carcinogenesis is mediated by in situ estrogen production and estrogen receptor alpha signaling. *FASEB J*. 2008 May;22(5):1512-20. doi: 10.1096/fj.07-9526com. Epub 2007 Nov 30. PMID: 18055862.
51. **Ronda AC**, Boland RL. Intracellular Distribution and Involvement of GPR30 in the Actions of E2 on C2C12 Cells. *J Cell Biochem*. 2016 Mar;117(3):793-805. doi: 10.1002/jcb.25369. Epub 2015 Sep 17. PMID: 26359786.
52. **Sever R**, Glass CK. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Mar 1;5(3):a016709. doi: 10.1101/cshperspect.a016709. PMID: 23457262; PMCID: PMC3578364.
53. **Sherwood**, *Human Physiology: From cell to systems*
54. **Talbot J**, Maves L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2016 Jul;5(4):518-34. doi: 10.1002/wdev.230. Epub 2016 May 19. PMID: 27199166; PMCID: PMC5180455.
55. **Thomas P**, Alyea R, Pang Y, Peyton C, Dong J, Berg AH. Conserved estrogen binding and signaling functions of the G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in mammals and fish. *Steroids*. 2010 Aug-Sep;75(8-9):595-602. doi: 10.1016/j.steroids.2009.11.005. Epub 2010 Jan 6. PMID: 19931550; PMCID: PMC2885585.
56. **Treck O**, Schüler-Toprak S, Ortman O. Estrogen Actions in Triple-Negative Breast Cancer. *Cells*. 2020 Oct 26;9(11):2358. doi: 10.3390/cells9112358. PMID: 33114740; PMCID: PMC7692567.

57. **Tremblay A**, Tremblay GB, Labrie F, Giguère V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell*. 1999 Apr;3(4):513-9. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80479-7. PMID: 10230404.
58. **Trukhacheva E**, Lin Z, Reierstad S, Cheng YH, Milad M, Bulun SE. Estrogen receptor (ER) beta regulates ERalpha expression in stromal cells derived from ovarian endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Feb;94(2):615-22. doi: 10.1210/jc.2008-1466. Epub 2008 Nov 11. PMID: 19001520; PMCID: PMC2646522.
59. **Tsialtas I**, Georgantopoulos A, Karipidou ME, Kalousi FD, Karra AG, Leonidas DD, Psarra AG. Anti-Apoptotic and Antioxidant Activities of the Mitochondrial Estrogen Receptor Beta in N2A Neuroblastoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 16;22(14):7620. doi: 10.3390/ijms22147620. PMID: 34299239; PMCID: PMC8306648.
60. **Walton TJ**, Li G, Seth R, McArdle SE, Bishop MC, Rees RC. DNA demethylation and histone deacetylation inhibition co-operate to re-express estrogen receptor beta and induce apoptosis in prostate cancer cell-lines. *Prostate*. 2008 Feb 1;68(2):210-22. doi: 10.1002/pros.20673. PMID: 18092350.
61. **Weikum ER**, Liu X, Ortlund EA. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci*. 2018 Nov;27(11):1876-1892. doi: 10.1002/pro.3496. PMID: 30109749; PMCID: PMC6201731.
62. **Zhao C**, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-Å. Estrogen Receptor  $\beta$ : An Overview and Update. *Nuclear Receptor Signaling*. 2008;6(1). doi:10.1621/nrs.06003