

«Ο υποδοχέας οιστρογόνων βήτα ως άμεσος ρυθμιστής της μιτοχονδριακής λειτουργίας»

Ιωάννης Τσιάλτας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα οιστρογόνα αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της λειτουργίας του νευρικού συστήματος, ασκώντας αντιοξειδωτικές, αντιαποπτωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Οι δράσεις αυτές των οιστρογόνων επιτελούνται μέσω πυρηνικών και μεμβρανικών ERs (Estrogen Receptors, ERs), αλλά και ανεξαρτήτως ERs. Τελευταία αναδεικνύεται και η νευροπροστατευτική δράση των μιτοχονδριακών ERs, και κυρίως του μιτοχονδριακού ERβ (mitochondrial ERβ, mtERβ). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του mtERβ στο συγκεκριμένο οργανίδιο δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και αποτελεί αντικείμενο μελέτης αρκετών ερευνητικών ομάδων. Συνυπολογίζοντας το σημαντικό ρόλο των μιτοχονδρίων στη διατήρηση της βιωσιμότητας και της εύρυθμης λειτουργίας των νευρώνων αναδεικνύεται η σημαντικότητα του χαρακτηρισμού του ρόλου και των μηχανισμών άμεσης δράσης του mtERβ σε νευρικά κύτταρα. Με βάση τα προαναφερθέντα στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η άμεση δράση του mtERβ σε μια πληθώρα μιτοχονδριακών διεργασιών, όπως η μιτοχονδριακή μεταγραφή, η παραγωγή ενέργειας, η αντιοξειδωτική άμυνα και η σχετιζόμενη με το μιτοχόνδριο απόπτωση, καθώς και οι επιπτώσεις των επαγόμενων από τον mtERβ δράσεων στην καρκινογένεση, στην κυτταρική διαφοροποίηση, και στην άμυνα έναντι νευροτοξικών παραγόντων. Για την επίτευξη των στόχων της παρούσας διδακτορικής διατριβής κατασκευάστηκε κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού Neuro-2a (N2A) που υπερεκφράζει τον ERβ υπό μορφή χμιαϊκής πρωτεΐνης με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green fluorescent protein, GFP) με μιτοχονδριακή στόχευση (N2AmtGFPERβ), καθώς και κυτταρική σειρά αναφοράς, που υπερεκφράζει σταθερά την πρωτεΐνη mtGFP (N2AmtGFP). Οι κυτταρικές αυτές σειρές, μεταξύ άλλων, χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή in vivo πειραμάτων καρκινογένεσης σε μύες (xenograft mouse model). Επιπρόσθετα, σε μια

πληθώρα πειραματικών διαδικασιών, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ανθρώπου SH-SY5Y καθώς εμφανίζει, σε σύγκριση με αντίστοιχες κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος, αυξημένα ενδογενή πρωτεϊνικά επίπεδα και μιτοχονδριακή εντόπιση του ERβ. Στις προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές (N2AmtGFP, N2AmtGFPERβ και SH-SY5Y) πραγματοποιήθηκαν μελέτες που περιλάμβαναν αρχικά καλλιέργεια κυττάρων παρουσία και απουσία ειδικού αναστολέα πυρηνικής μεταγραφής, παρουσία και απουσία παραγόντων διαφοροποίησης και επαγωγής νευροτοξικότητας, και στη συνέχεια εφαρμογή διαφόρων μεθόδων όπως PCR πραγματικού χρόνου, μικροσκοπία φθορισμού, ανοσοφθορισμό και ανοσοαποτύπωση κατά Western με χρήση ειδικών αντισωμάτων, μέτρηση των επιπέδων ATP και δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας MTT.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής αναδεικνύουν την άμεση εμπλοκή του mtERβ στην ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και της παραγωγής ATP μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας – οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), δεδομένου ότι παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, παρουσία αναστολέα πυρηνικής μεταγραφής και παρουσία ή απουσία οιστραδιόλης (17β-estradiol, E2), και αύξηση των επιπέδων της μιτοχονδριακής ATP τόσο σε κύτταρα SHSY-5Y, όσο και σε κύτταρα N2AmtGFPERβ. Επιπλέον μελετήθηκε ο ρόλος του υποδοχέα στη ρύθμιση μηχανισμών διαφοροποίησης νευρικών κυττάρων, χρησιμοποιώντας μοντέλο ανάπτυξης κυττάρων σε συνθήκες διαφοροποίησης, όπου παρατηρήθηκε η διαφοροποίηση των κυττάρων που υπερεκφράζουν τον mtERβ, όπως υποδεικνύει η παρατηρούμενη αύξηση του μήκους των νευρώνων και των πρωτεϊνικών επιπέδων του δείκτη διαφοροποίησης βIII τουμπουλίνη (βIII-tubulin, Tuj-1) στη συνθήκη αυτή, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς. Επίσης, η αυξημένη αντιαποπτωτική και αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων N2A, που υπερεκφράζουν τον mtERβ, σε συνθήκες επαγωγής απόπτωσης και οξειδωτικού στρες, αποδεικνύουν την άμεση εμπλοκή του mtERβ στη ρύθμιση της απόπτωσης και του οξειδωτικού στρες, επαληθεύοντας έτσι την νευροπροστατευτική δράση του υποδοχέα.

Οι δράσεις και οι επιπτώσεις των δράσεων αυτών του mtERβ επαληθεύτηκαν και διερευνήθηκαν περαιτέρω πραγματοποιώντας in vivo πειράματα καρκινογένεσης σε μύες. Κατά τη διεξαγωγή των μελετών αυτών επαληθεύτηκε η άμεση δράση του υποδοχέα στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, η οποία οδηγεί στην αυξημένη σύνθεση υπομονάδων OXPHOS και κατ' επέκταση στην ενίσχυση της παραγωγής ενέργειας μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας – OXPHOS. Επίσης διαπιστώθηκε ότι οι προαναφερθείσες δράσεις του mtERβ συντελούν στην αναστολή της καρκινογένεσης, μέσω άμεσης ή έμμεσης ρύθμισης και άλλων βιοχημικών μηχανισμών όπως του κυτταρικού ενεργειακού μεταβολισμού, της μιτοφαγίας και του κυτταρικού κύκλου, αναστρέφοντας έτσι τάσεις για μεταβολικό επαναπρογραμματισμό που έχουν παρατηρηθεί στο φαινόμενο Warburg.

Τέλος, η μελέτη τόσο της πιθανής οιστρογονικής δράσης του αργιλίου (Aluminum, Al) όσο και της εμπλοκής αυτής στην εκδήλωση της νευροτοξικότητας του αργιλίου, ανέδειξε την επαγόμενη από το Al μείωση των επιπέδων του ERβ. Η δράση αυτή πιθανώς να οφείλεται στην παρατηρούμενη εμπλοκή των ιόντων Al στην κατάσταση φωσφορυλίωσης του ERα στο αμινοξύ S118, που οδηγεί σε αναστολή της πρωτεολυτικής του αποικοδόμησης και συνεπώς σε αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων, τα οποία επάγουν με τη σειρά τους, όπως γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία, τη μείωση των επιπέδων του ERβ και κατά συνέπεια τη μείωση της νευροπροστατευτικής του δράσης. Επίσης η νευροτοξική δράση του Al θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρατηρούμενη από το Al αύξηση της μιτοχονδριακής εντόπισης του ERβ, η οποία πιθανόν να οδηγεί σε υπερλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας – OXPHOS, αυξημένη παραγωγή ROS και επαγωγή απόπτωσης.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής υποστηρίζουν την άμεση δράση του mtERβ στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας τόσο σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές συνθήκες αναδεικνύοντας τον ως έναν εν δυνάμει φαρμακευτικό στόχο για τη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας σε σχετιζόμενες με μιτοχόνδρια παθήσεις όπως καρκινογένεση και νευροεκφυλιστικές νόσοι.