

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Εξειδίκευσης  
Κλινική Βιοχημεία – Μοριακή Διαγνωστική  
Π. Παπαζαφείρη

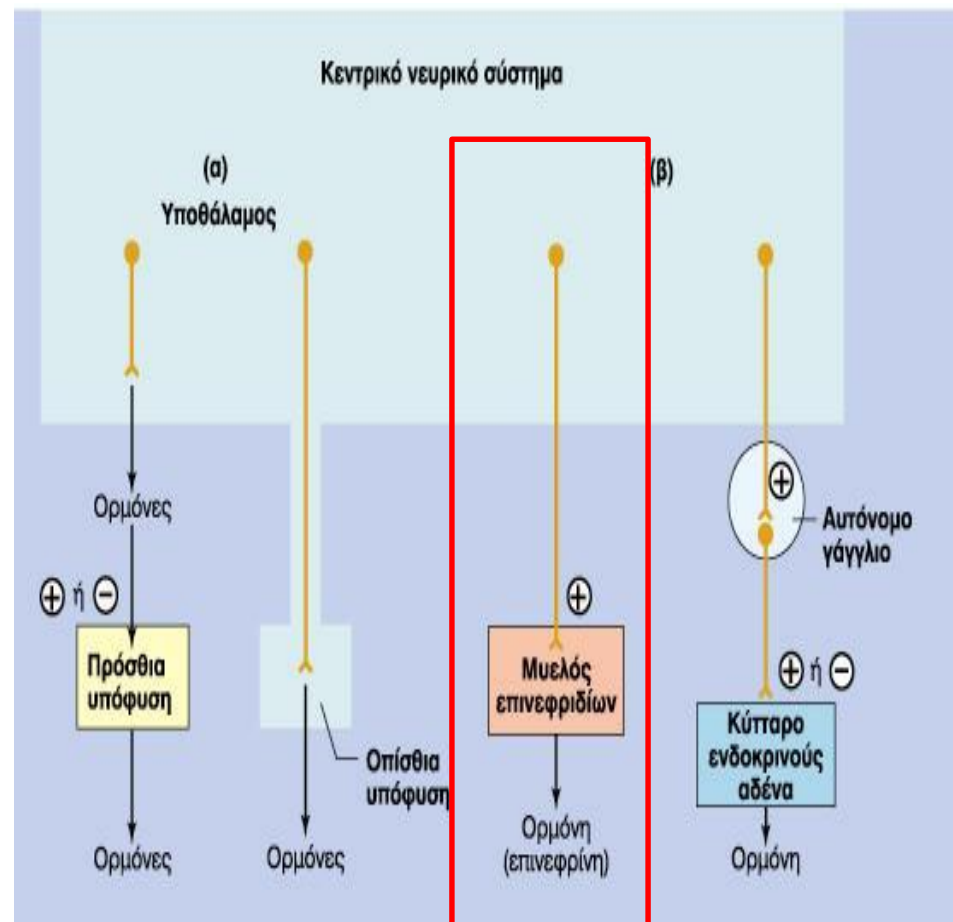
Ο νευροενδοκρινής άξονας  
και ένα παράδειγμα μελέτης νευροεκφυλισμού

**ΜΑΘΗΣΙΑΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ**

- *αιτιολογήστε τη χρήση στεροειδών για νευροπροστασία*
- *περιγράψτε τον ρόλο του ασβεστίου στον νευροεκφυλισμό*
- *περιγράψτε μια πιθανή σηματοδοτική αλληλουχία σημάτων επιβίωσης, που μπορεί να πυροδοτηθεί από νευροστεροειδή*

# Το νευρικό και το ενδοκρινές σύστημα έχουν σημαντικές ομοιότητες

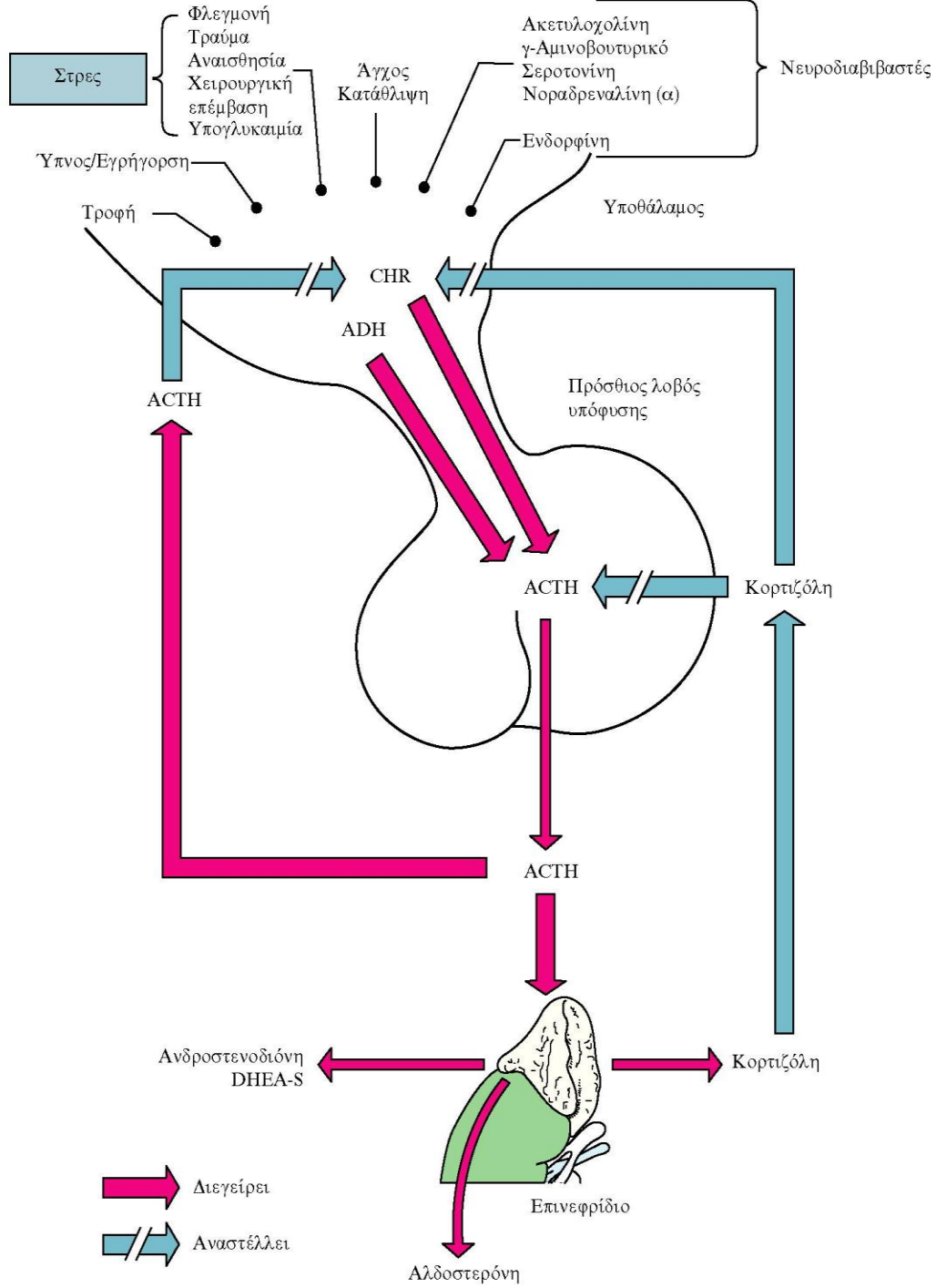
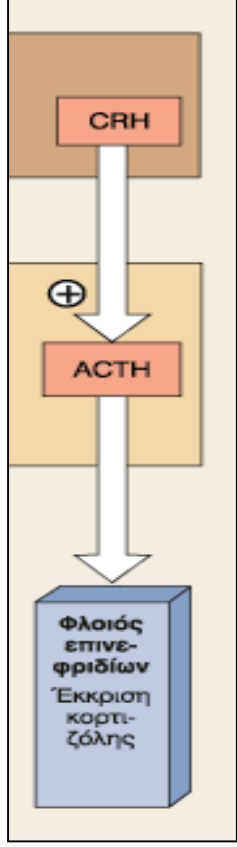
- Είναι –και τα δύο- συστήματα για τη μετάδοση σημάτων
- Λειτουργούν στη βάση διεγερση-απόκριση
- Μεταδίδουν σήματα τα οποία είναι τοπικά και ειδικά ή έχουν γενικευμένη επίδραση
- Παίζουν ουσιαστικό ρόλο στο συντονισμό των φυσιολογικών διαδικασιών



# Ο νευροενδοκρινής άξονας:

## hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA axis)

Ρύθμιση της έκκρισης της κορτιζόλης από το σύστημα υποθαλάμου-υπόφυσης



# Ο νευροενδοκρινής άξονας: γιατί μας ενδιαφέρει?

## A users guide to HPA axis research

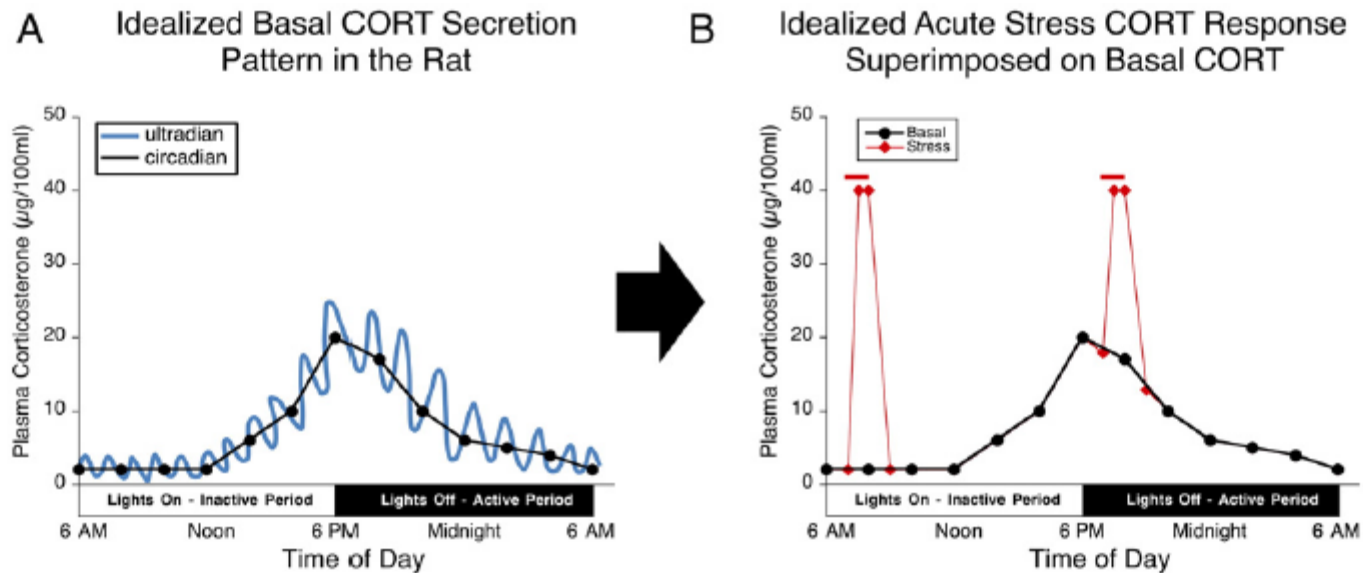


Fig. 3. Idealized basal and stress-induced CORT secretion pattern in the rat. A. Basal corticosterone (CORT) secretion in the rat has an ultradian (hourly pulses) and circadian rhythm. The basal peak CORT secretion of this nocturnal species coincides with the beginning of the rat's active period. Relative ultradian and circadian basal cortisol levels are similar in humans except that peak basal levels occur at the opposite time of day (around dawn). B. Stimulation of the HPA axis, such as occurs with acute stress, produces similar maximal CORT levels regardless of the time of day. Red horizontal lines above both acute stress CORT responses depict the time of stressor onset and duration. Typically CORT levels reach their maximum within 30 min after stressor onset, and return to basal levels 60–90 min after stressor termination. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

# Ο νευροενδοκρινής άξονας: γιατί μας ενδιαφέρει?

## Neuroendocrine Regulation of Anxiety: Beyond the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis

*Journal of Neuroendocrinology*, 2016, 28, 10.1111/jne.12403

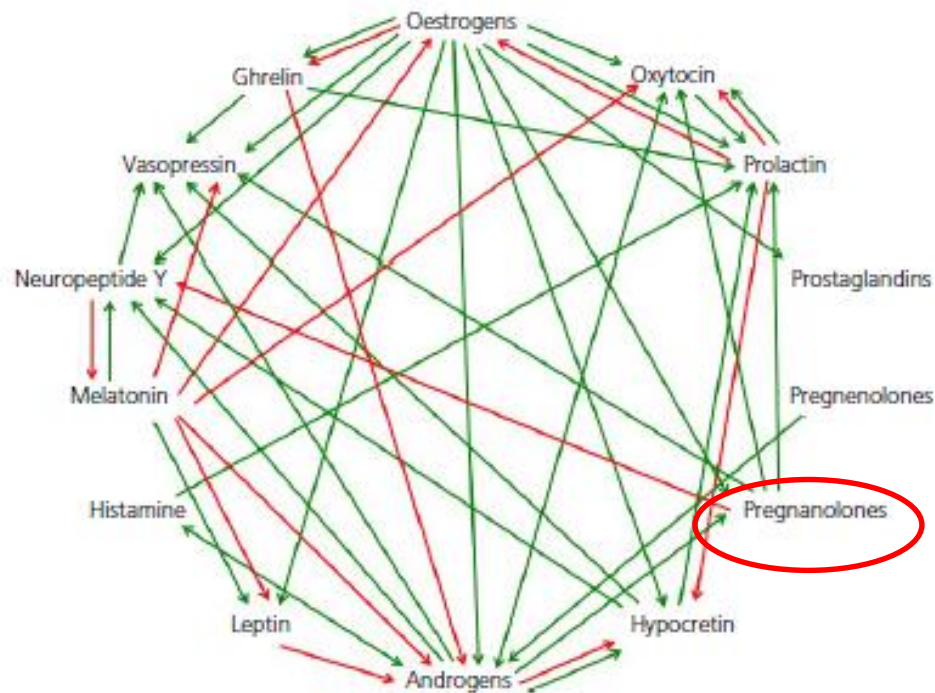
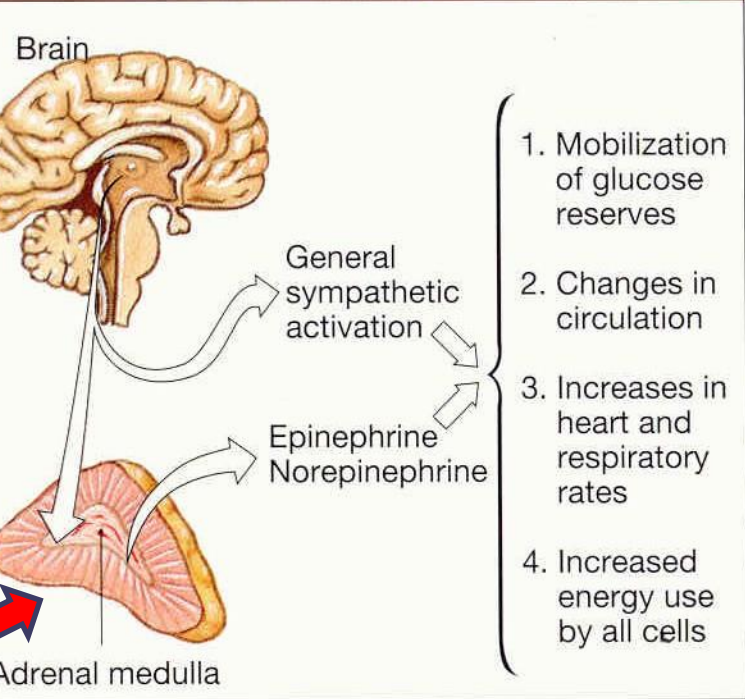


Fig. 1. A simplified diagram of the currently described relations between hormones in the rodent. Green arrows denote an stimulatory influence on hormonal secretion and/or receptor expression. Conversely, red arrows denote an inhibitory influence.

**ALARM PHASE**

**"Fight or Flight"**  
**Immediate short-term responses to crises**



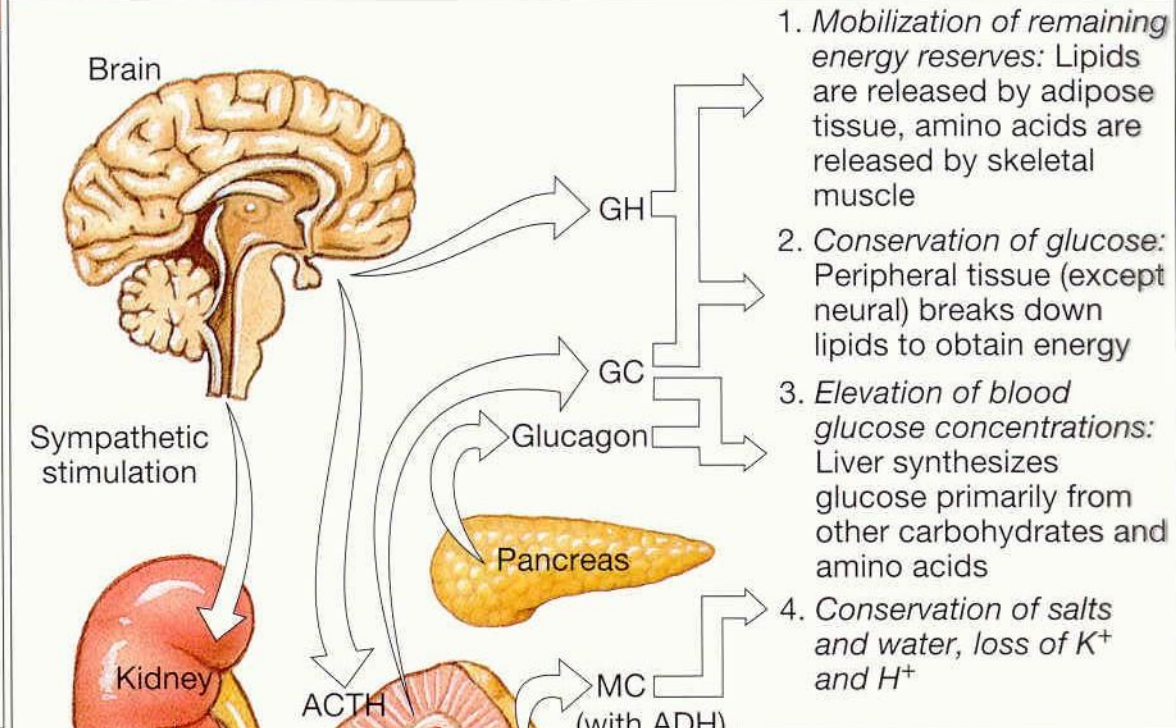
**EXHAUSTION PHASE**

**Collapse of vital systems**

Causes may include:  
 -Exhaustion of lipid reserves  
 -Inability to produce glucocorticoids  
 -Failure of electrolyte balance  
 -Cumulative structural or functional damage to vital organs

**RESISTANCE PHASE**

**Long-term metabolic adjustments occur**



|      |                                  |
|------|----------------------------------|
| GH   | Growth hormone                   |
| GC   | Glucocorticoids                  |
| MC   | Mineralocorticoids (aldosterone) |
| ACTH | Adrenocorticotrophic hormone     |
| ADH  | Antidiuretic hormone             |

# Ο νευροενδοκρινής άξονας: γιατί μας ενδιαφέρει?

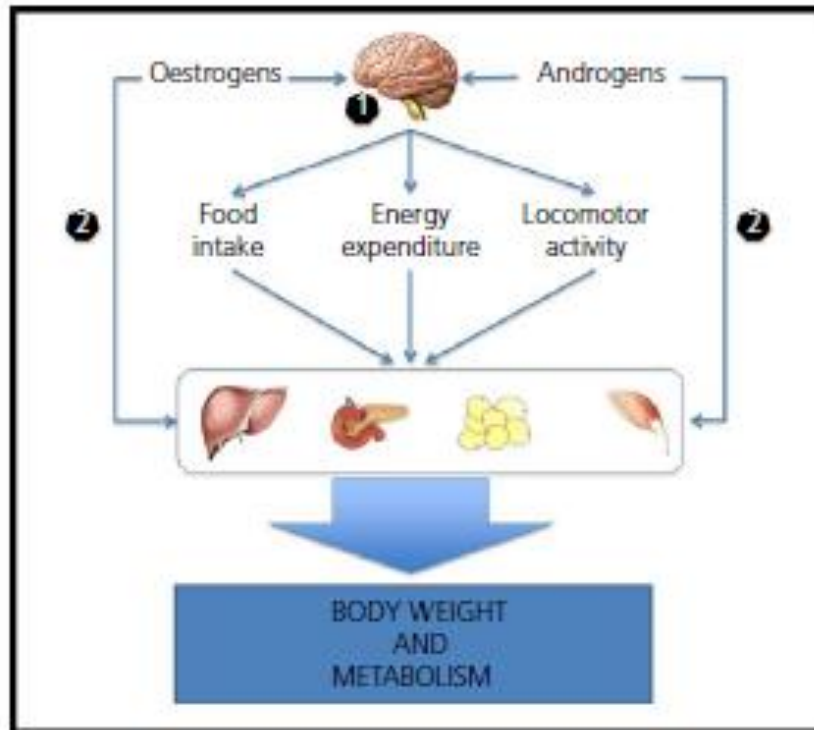


Fig. 4. Oestrogens and androgens regulate metabolic function. (1) Androgens and oestrogens act on the hypothalamus, mainly in the arcuate nucleus (ARC) and ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH), regulating food intake, energy expenditure and locomotor activity. This action impacts on the metabolic function of liver, pancreas, adipose tissue and muscle, leading to the regulation of body weight and whole-body metabolic function. (2) Moreover, androgens and oestrogens can directly modulate the function of these tissues.

Journal of Neuroendocrinology

Journal of Neuroendocrinology, 2016, 28, 10.1111/jne.12395

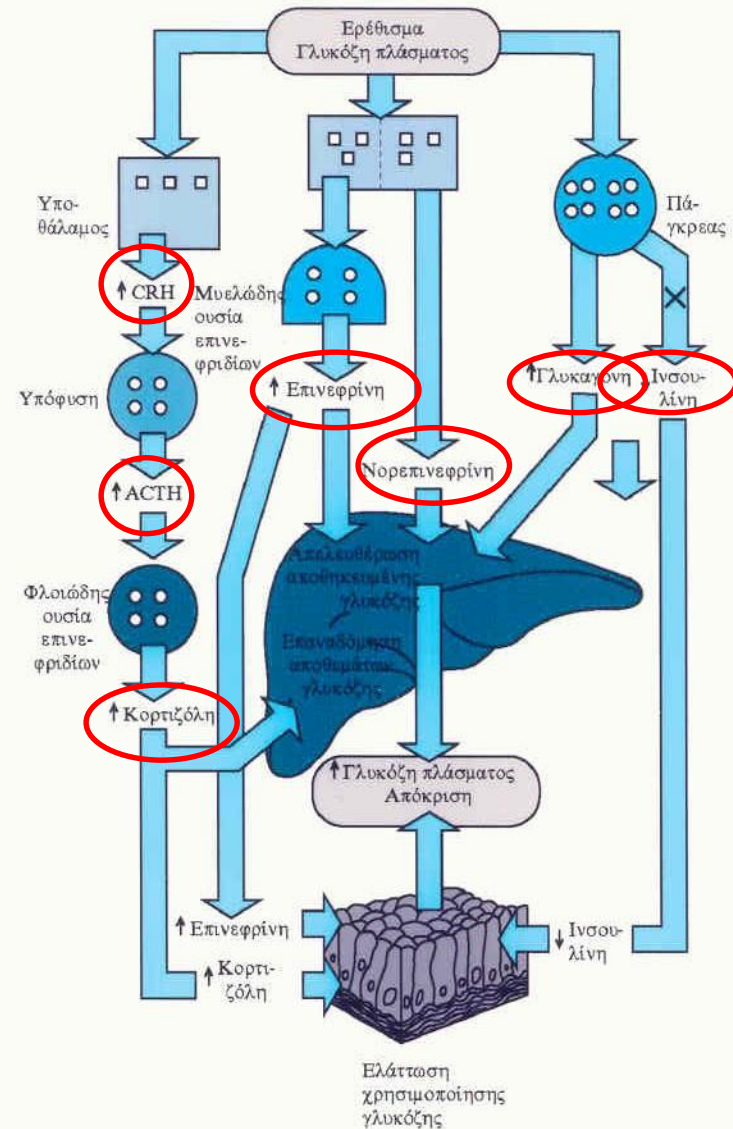
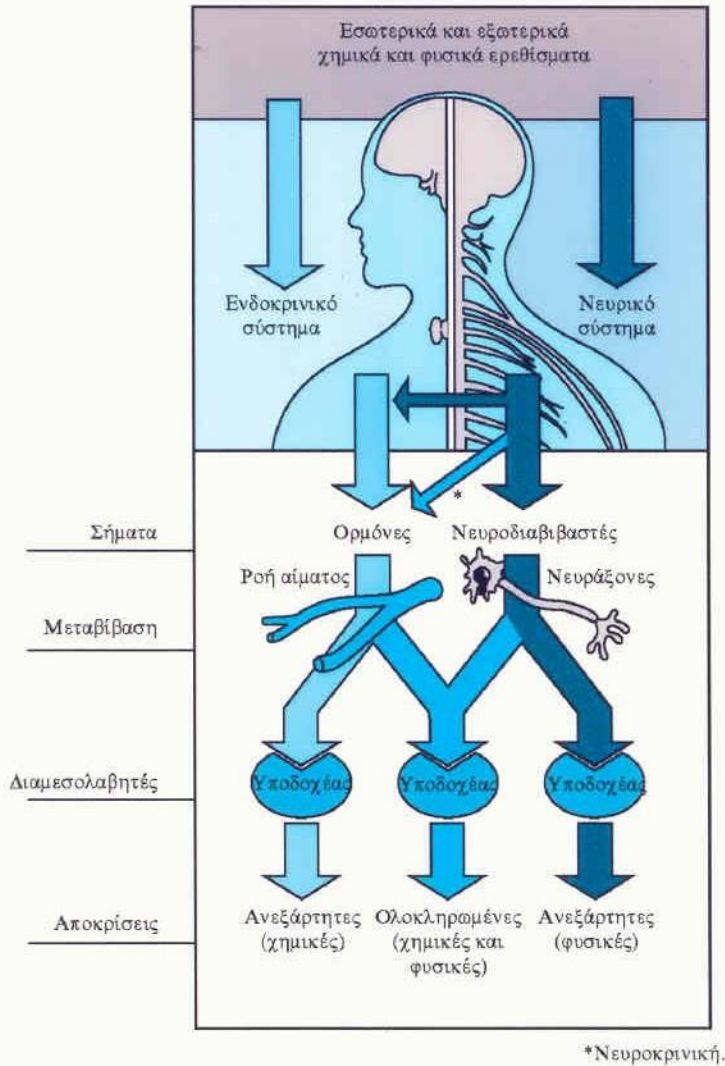
REVIEW ARTICLE

© 2016 British Society for Neuroendocrinology

## Neuroendocrine Regulation of Metabolism

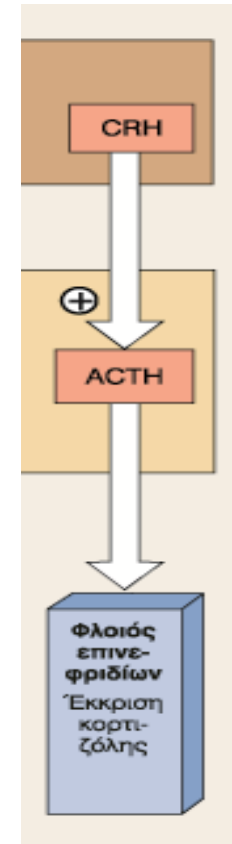
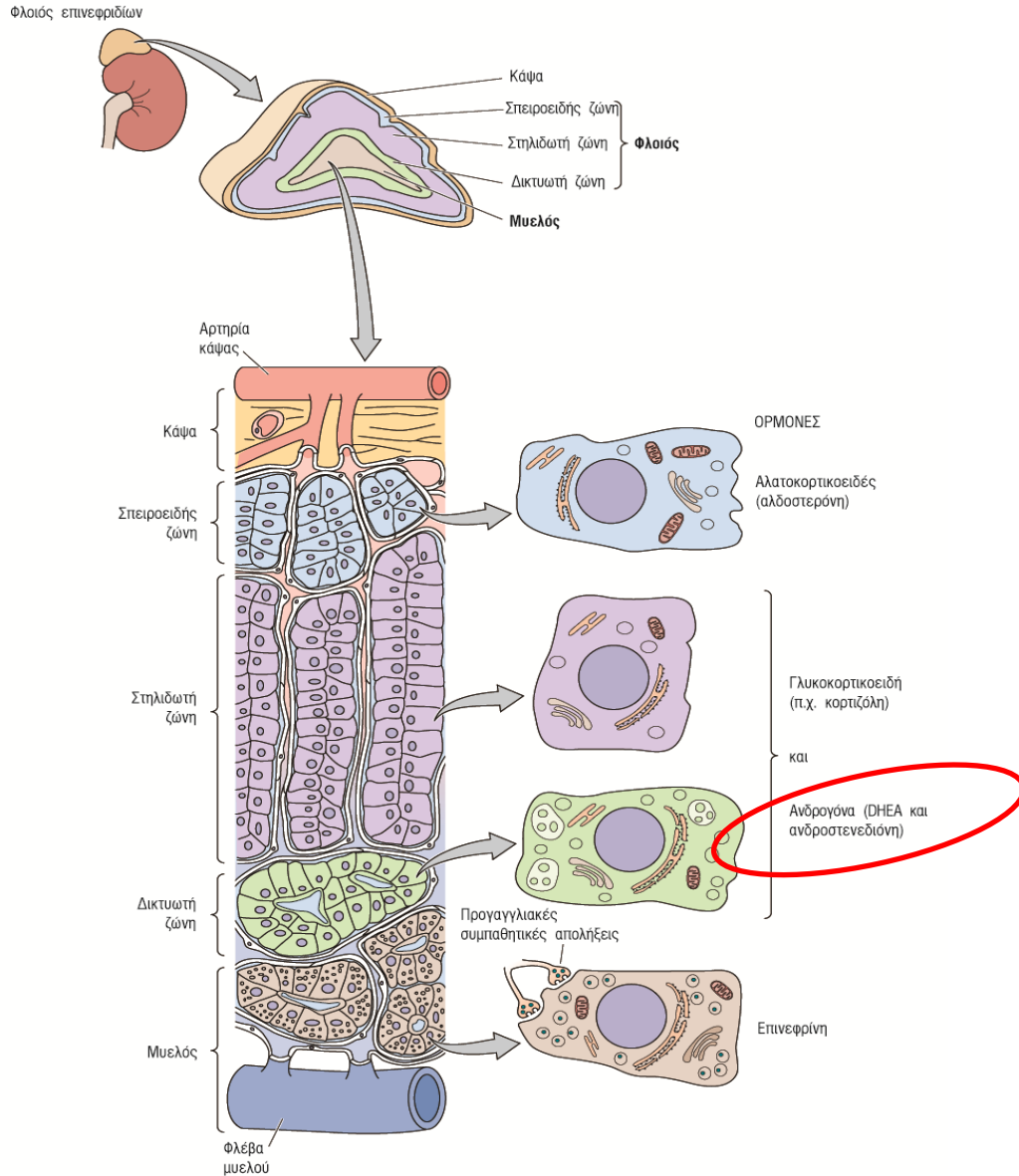
M. P. Cornejo\*, S. T. Hentges†, M. Maliqueo‡, H. Coirini§, D. Becu-Villalobos¶ and C. F. Elias\*\*

# Ολοκληρωμένη ενδοκρινική και νευρική ρύθμιση της γλυκόζης του πλάσματος

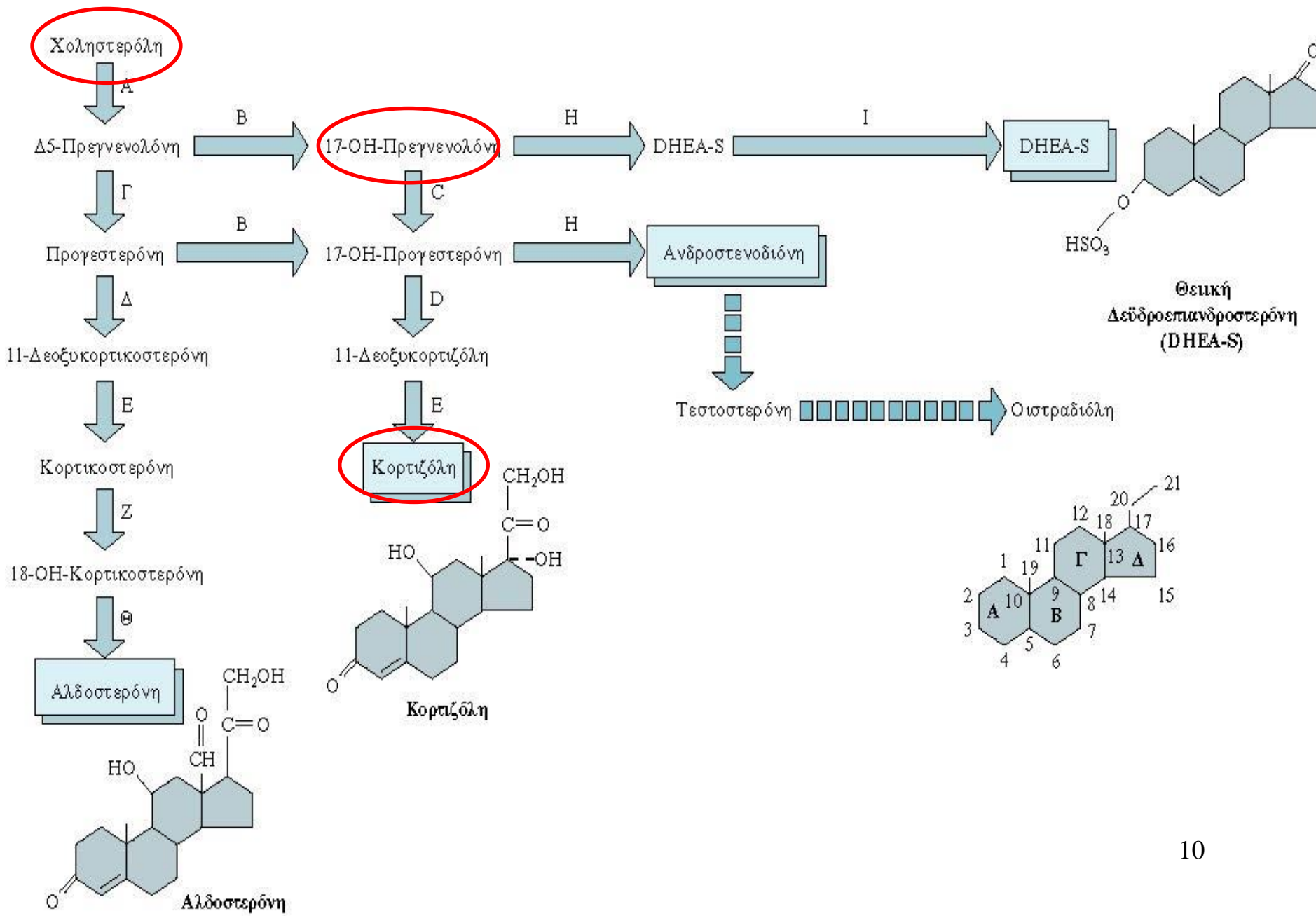




# Τα επινεφρίδια : διακριτές στιβάδες και οι ορμόνες τους

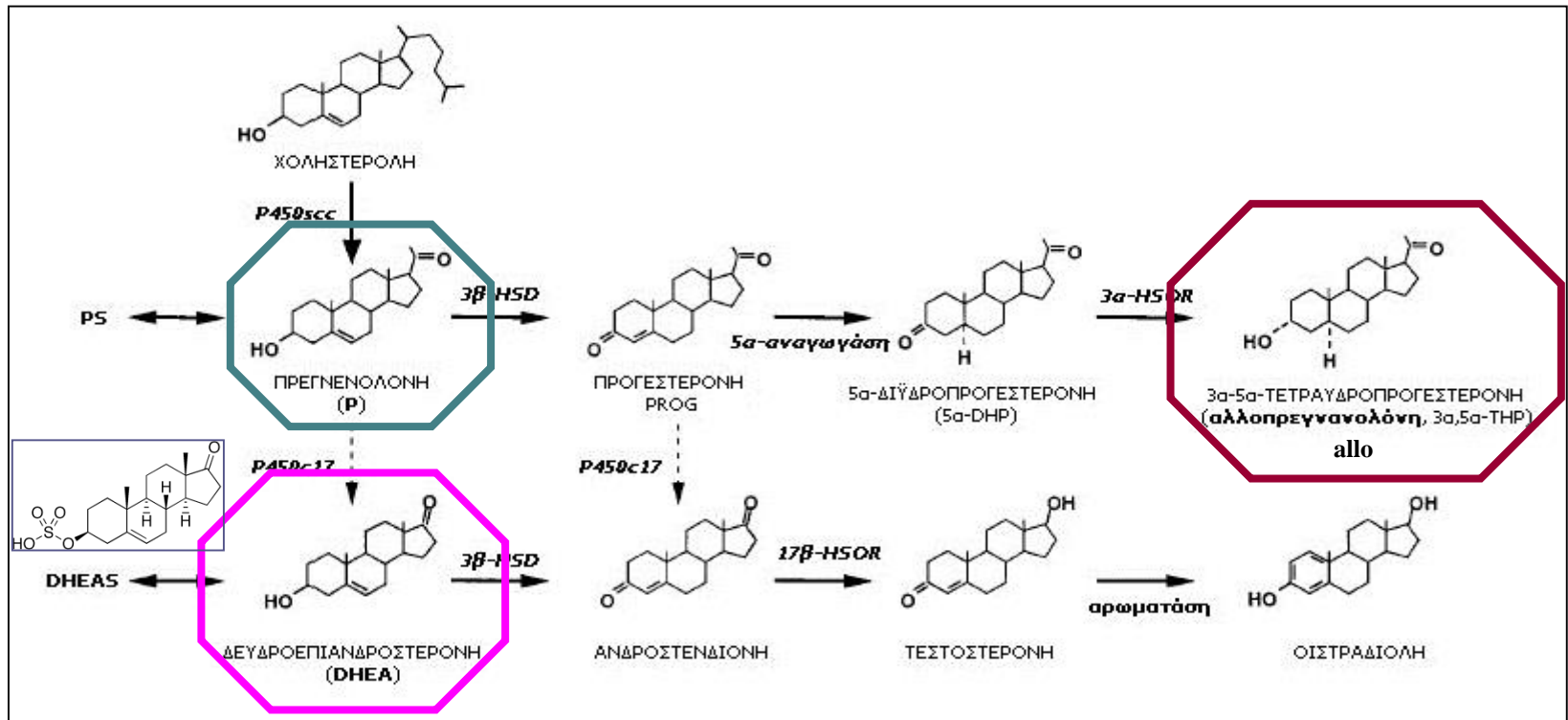


# Σύνθεση των ορμονών του φλοιού

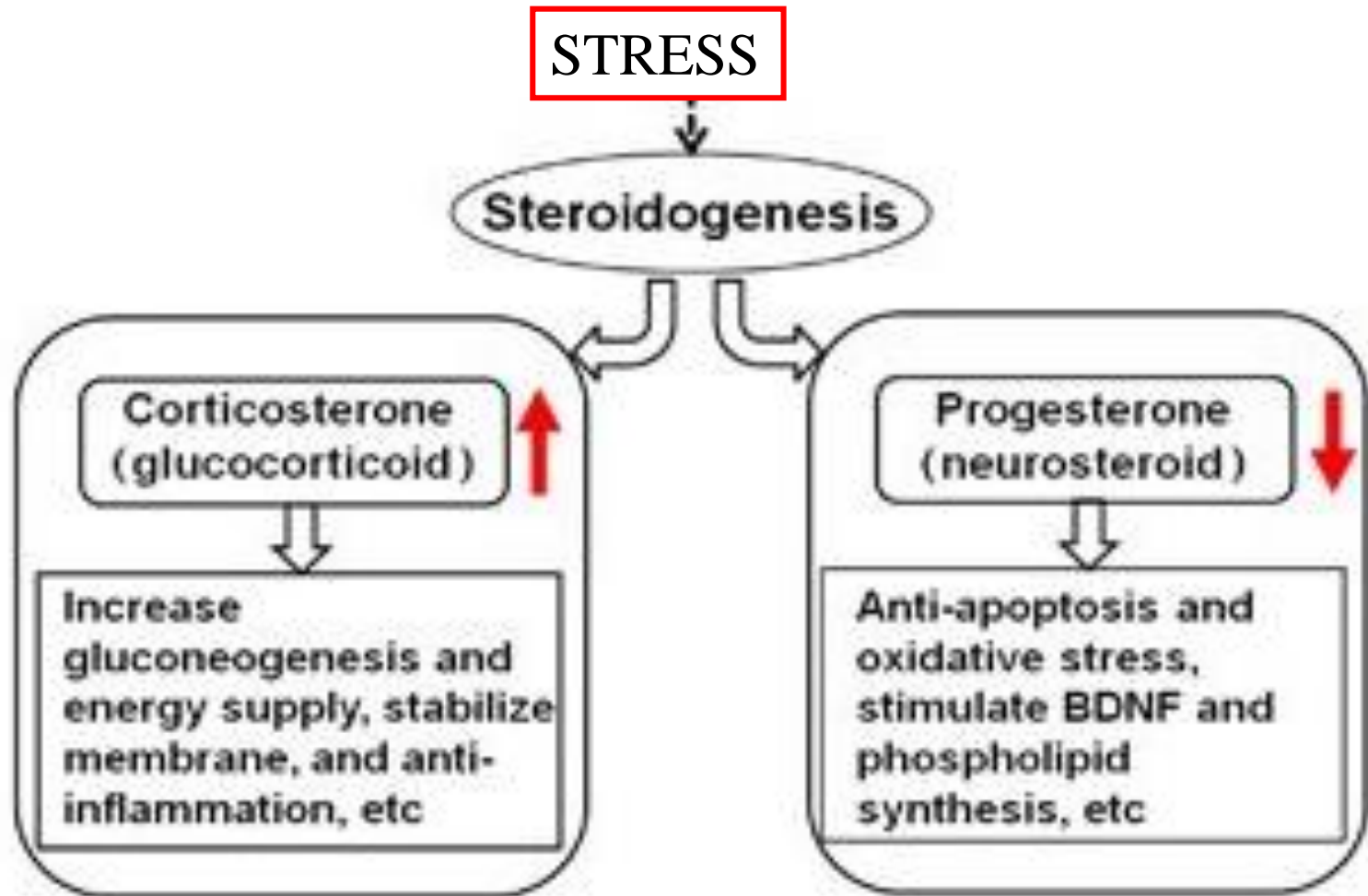


# ΝΕΥΡΟΣΤΕΡΟΙΔΗ

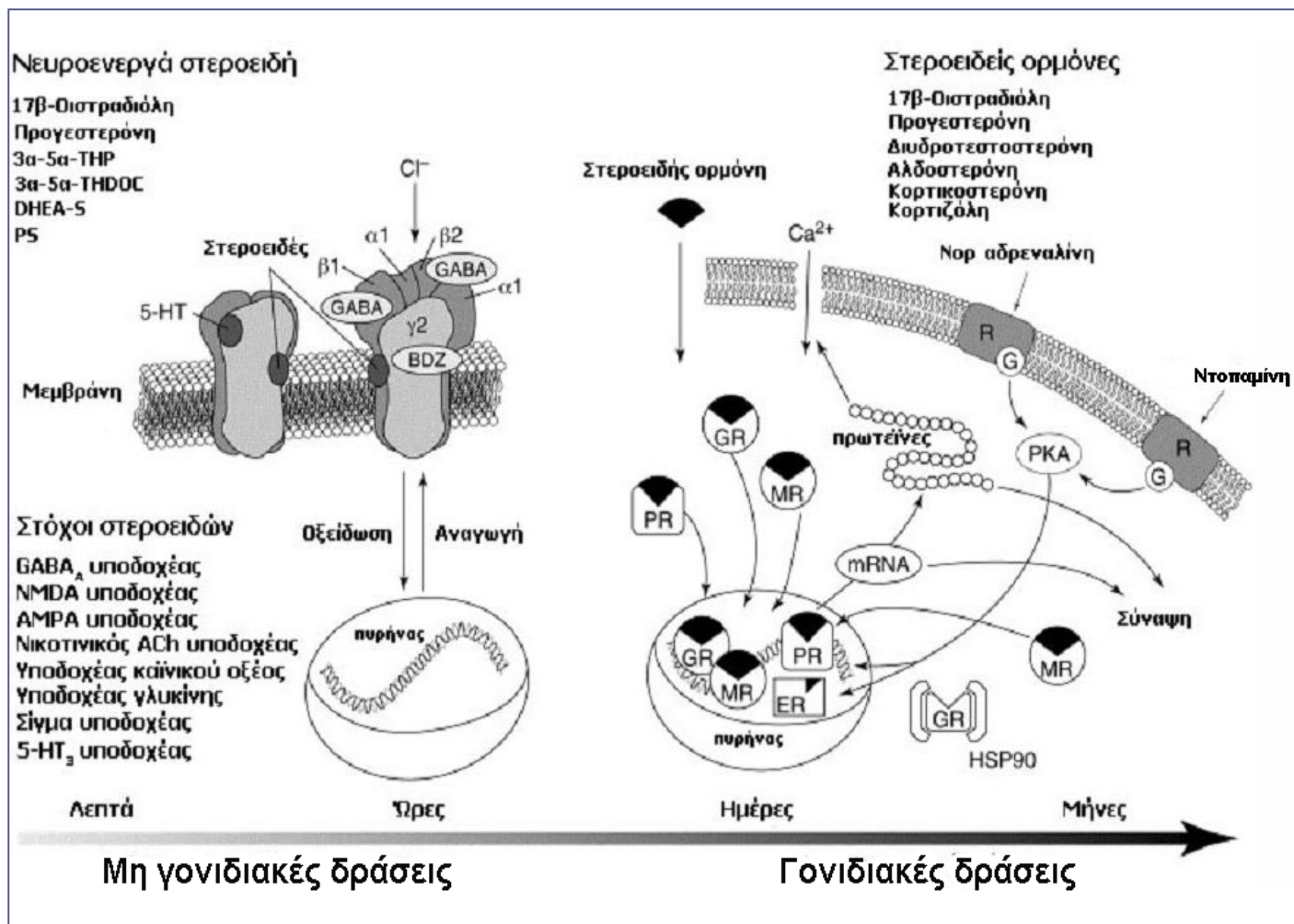
- **Hans Selye, 1941:** υπνωτική / αναισθητική δράση προγεστερόνης, δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA)
- **Majewska et al., 1986:** τα στεροειδή αλλοπρεγνανολόνη (allo) και τετραϋδροδεοξυκορτικοστερόνη (THDOC) είναι τροποποιητές της νευρωνικής διεγερσιμότητας, μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα  $GABA_A$
- **Baulieu et al., 1987:** βιοσύνθεση νευροστεροειδών στον εγκέφαλο



# Σύνθεση των ορμονών του φλοιού



# Μη γονιδιακές και γονιδιακές δράσεις των νευροστεροειδών (προσαρμογή από Rupperecht and Holsboer, 1999)



## *Φυσιολογικός ρόλος των νευροστεροειδών*

Το 1927 αναφέρθηκε από τους Cashin και Moravek ότι η ενδοφλέβια χορήγηση χοληστερόλης προκαλεί υπνωτική και αναισθητική δράση (Cashin and Moravek, 1927)

ενώ λίγα χρόνια αργότερα ο Selye περιέγραψε τις υπνωτικές ιδιότητες της προγεστερόνης και της δεοξυκορτικοστερόνης (Selye, 1941; 1942).

Αργότερα διαπιστώθηκε ότι τα αγωνιστικά νευροστεροειδή εμφανίζουν αγχολυτική και σπασμολυτική δράση, ενώ τα ανταγωνιστικά έχουν αντίθετες δράσεις (Majewska et al., 1986; Majewska and Schwartz, 1987).

# *ΠΡΟΤΥΠΗ ΜΕΛΕΤΗ*

*(πειραματικό)*

*Διερεύνηση των μοριακών συστατικών που καθορίζουν την εξειδίκευση της GABA<sub>A</sub>-εργικής αναστολής σε νευρικά κύτταρα, καθώς και των μηχανισμών ενίσχυσής της από ενδογενή νευροστεροειδή*

## *ΜΑΘΗΣΙΑΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ*

- αιτιολογήστε τη χρήση στεροειδών για νευροπροστασία*
- περιγράψτε τον ρόλο του ασβεστίου στον νευροεκφυλισμό*
- περιγράψτε μια πιθανή σηματοδοτική αλληλουχία σημάτων επιβίωσης, που μπορεί να πυροδοτηθεί από νευροστεροειδή*

## αιτιολόγηση

η επαγόμενη από γλουταμινικό είσοδος ασβεστίου, θεωρείται μια από τις κυριότερες αιτίες νευρωνικού θανάτου που συνοδεύει την εγκεφαλική βλάβη από ισχαιμία/επαναιμάτωση, ή την καταστροφή των νευρώνων σε περιπτώσεις επιληψίας ή σε νευροεκφυλιστικές νόσους.

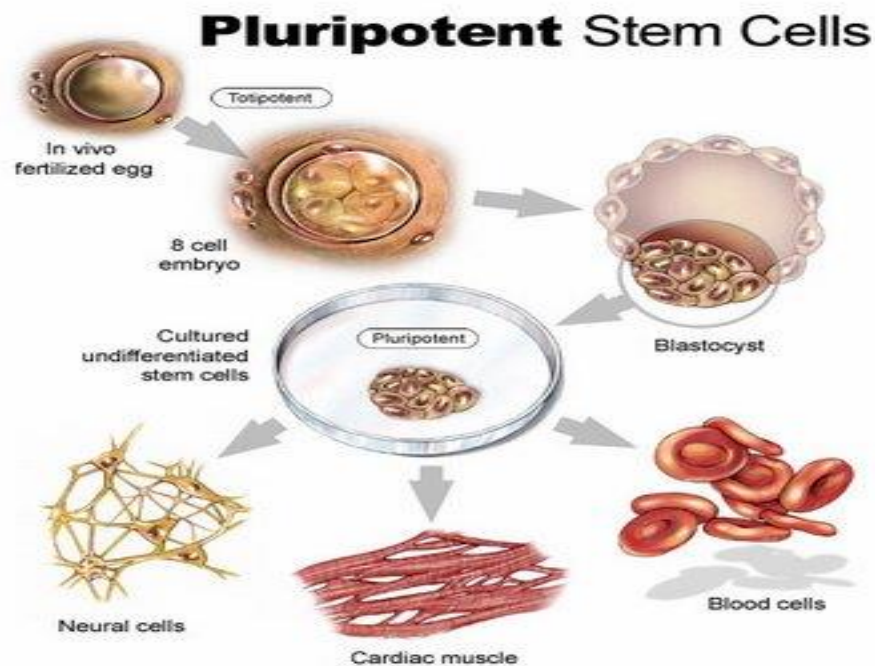
Στην προσπάθεια να βρεθούν παράγοντες, οι οποίοι θα μπορέσουν στο μέλλον να χρησιμεύσουν ως κύρια συστατικά κατά την παρασκευή φαρμάκων για την αντιμετώπιση των παραπάνω ασθενειών, απαιτείται μελέτη ενδογενών μορίων με προστατευτική δράση. Μια σημαντική κατηγορία ουσιών με αυτήν την ιδιότητα αποτελούν γενικότερα τα **στεροειδή**.

Η ανίχνευση στον εγκέφαλο σημαντικών ποσοτήτων στεροειδών, παραγώγων της **προγεστερόνης**, έδωσε το έναυσμα για τη χρήση αυτών των ουσιών σε πειράματα **νευροπροστασίας**, με ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Έτσι, οι ενεργοί μεταβολίτες της προγεστερόνης που ανιχνεύονται στο ΚΝΣ και ονομάστηκαν **νευροστεροειδή**, θεωρούνται σήμερα οι σπουδαιότεροι πιθανοί τελεστές της προστασίας των νευρώνων έναντι παραγόντων που οδηγούν στο νευροεκφυλισμό.



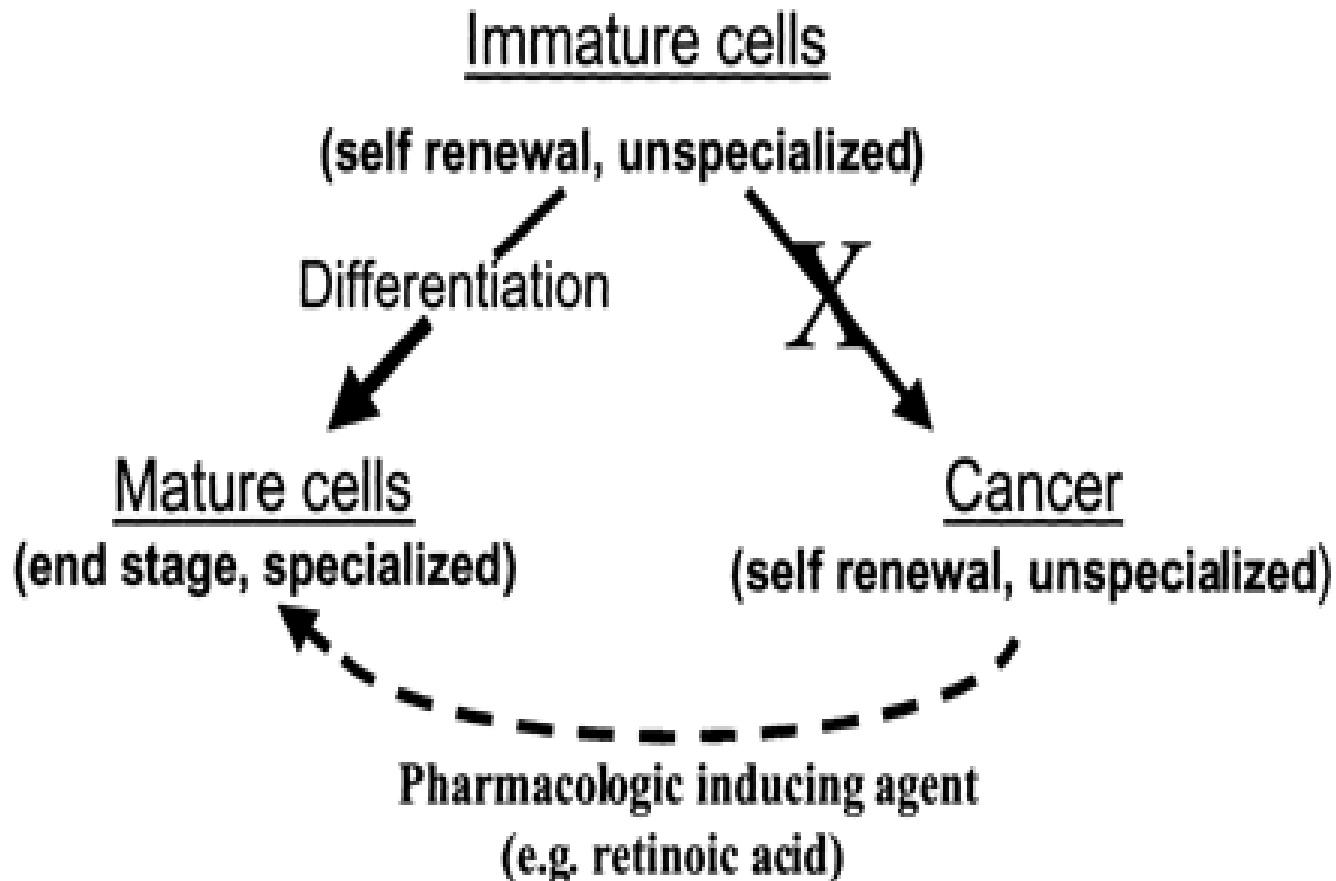
Πρότυπο σύστημα μελέτης μηχανισμών  
νευροπροστασίας

# ***Πολυδύναμες Κυτταρικές Σειρές***



# Πολυδύναμες Κυτταρικές Σειρές - Διαφοροποίηση

## Differentiation Therapy



# P19

Παρόλο που η προέλευσή τους δεν είναι καλά καθορισμένη, τα P19 κύτταρα έχουν φαινότυπο παρόμοιο με αυτό κυττάρων πρωτογενούς εξωδέρματος.

Πολλαπλασιάζονται με ιδιαίτερα ταχείς ρυθμούς και πρακτικά απεριόριστα σε καλλιέργεια. Η ικανότητά τους να διαφοροποιούνται πολλαπλά (pluripotency) ανάλογα με τις συνθήκες, σε συνδυασμό με το ευρύ αναπτυξιακό δυναμικό τους, τα καθιστά ένα ιδιαίτερα εύχρηστο μοντέλο *in vitro* μελέτης (Jones-Villeneuve et al., 1982; Jones-Villeneuve et al., 1983).

Συγκεκριμένα, τα P19 κύτταρα μπορούν μετά από επίδραση ρετινοϊκού οξέος να διαφοροποιηθούν σε νευρικά κύτταρα (P19-N), ενώ μετά από επίδραση διμεθυλο-σουλφοξειδίου (DMSO) διαφοροποιούνται σε καρδιακά και σκελετικά μυϊκά κύτταρα (McBurney, 1993).

Οι νευρώνες που προκύπτουν από τη διαφοροποίηση των P19 κυττάρων είναι μη αντιστρεπτά μεταμιτωτικοί, εμφανίζουν τυπική μορφολογία νευρικών κυττάρων και εκφράζουν έναν αριθμό χαρακτηριστικών δεικτών του ΚΝΣ, όπως την ειδική για νευρώνες ενολάση, νευροϊνώδεις πρωτεΐνες και το νευρο-ειδικό πυρηνικό αντιγόνο NeuN (McBurney et al., 1988).

Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων κατά τη διαφοροποίηση των P19 κυττάρων σε νευρικά κύτταρα, ακολουθεί την ίδια χρονική σειρά με το αντίστοιχο των φυσιολογικών πρόδρομων νευρικών κυττάρων (An et al., 2005). Επιπλέον, εκφράζουν γλουταμινεργικούς υποδοχείς (υποδοχείς NMDA, AMPA και καϊνικού οξέος), καθώς και GABA<sub>A</sub>-εργικούς υποδοχείς, ενώ συνθέτουν και αποθηκεύουν GABA και γλουταμινικό (Lin et al., 1996; MacPherson et al., 1997). Σχηματίζουν συνάψεις *in vitro* και είναι ανοσοενεργά για συναπτοφυσίνη (Finley et al., 1996). Ωστόσο, φαίνεται πως οι τασεοελεγχόμενοι δίαυλοι ασβεστίου απουσιάζουν από αυτούς τους νευρώνες (Morley et al., 1995).

Η κυτταρική σειρά των P19 κυττάρων πλεονεκτεί ως πειραματικό μοντέλο, εξαιτίας α) του μικρού χρόνου που απαιτείται για τη διαφοροποίησή τους, β) της άρτιας λειτουργικότητάς τους ως νευρώνες και γ) της παρουσίας ενός μεγάλου αριθμού ώριμων νευρικών κυττάρων και της σχεδόν πλήρους απουσίας μη νευρικών κυττάρων, μετά το πέρας της διαφοροποίησης.

# Διαφοροποίηση P19 κυττάρων (aggregates)

4 × 10<sup>5</sup> P19 κύτταρα  
(πολυδύναμα, εμβρυϊκά)

4 ημέρες σε α-MEM 10% FBS +  
0,5μM RA σε bacter. grade dishes  
(aggregates)

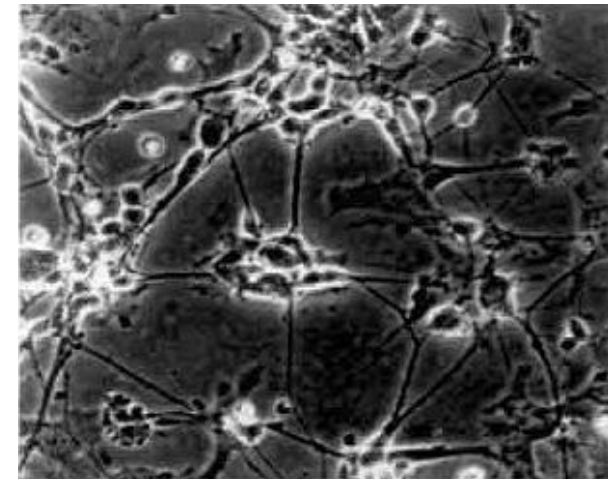
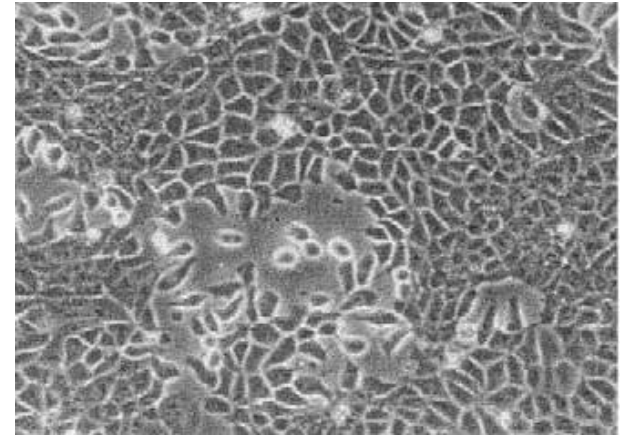
*Έναρξη  
διαφοροποίησης*

Aggregates νευρικών / μη νευρικών κυττάρων  
σε culture grade dishes

7 ημέρες σε α-MEM + 5 μg/ml Ara-C

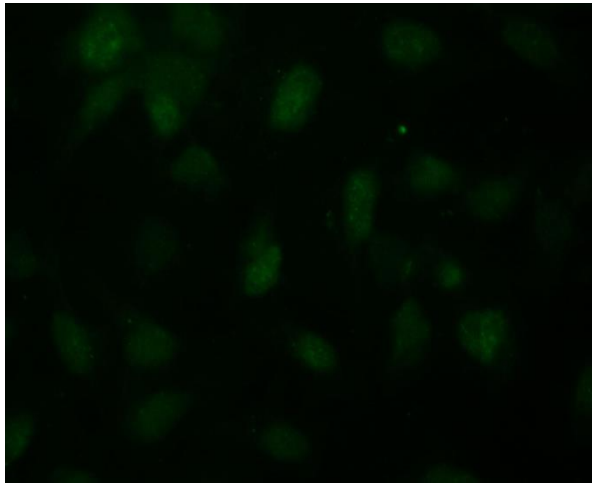
*Καταστολή ανάπτυξης  
μη νευρικών κυττάρων*

Τελικώς διαφοροποιημένοι νευρώνες με άξονες  
και δενδρίτες



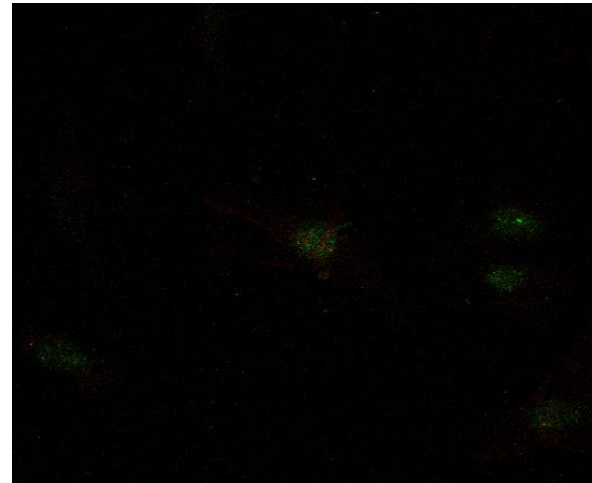
# Ανοσοκυτταροχημεία σε NT2 και P19 κύτταρα

NT2



Syn / Tuj1  
(1:10) (1:200)

P19



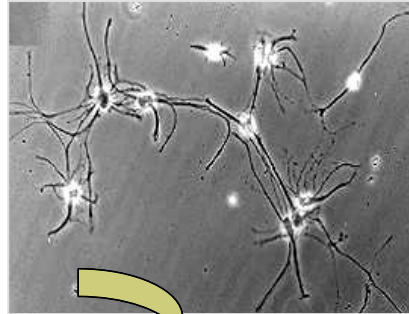
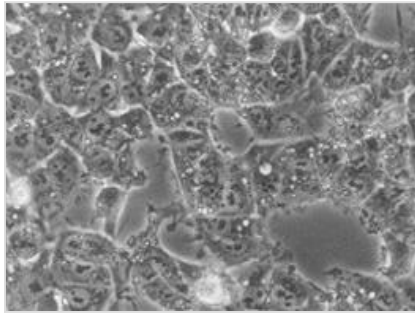
Syn / Tuj1  
(1:10) (1:200)

# Πρότυπο Σύστημα Πολυδύναμων Εμβρυονικών Κυττάρων

**NT2**



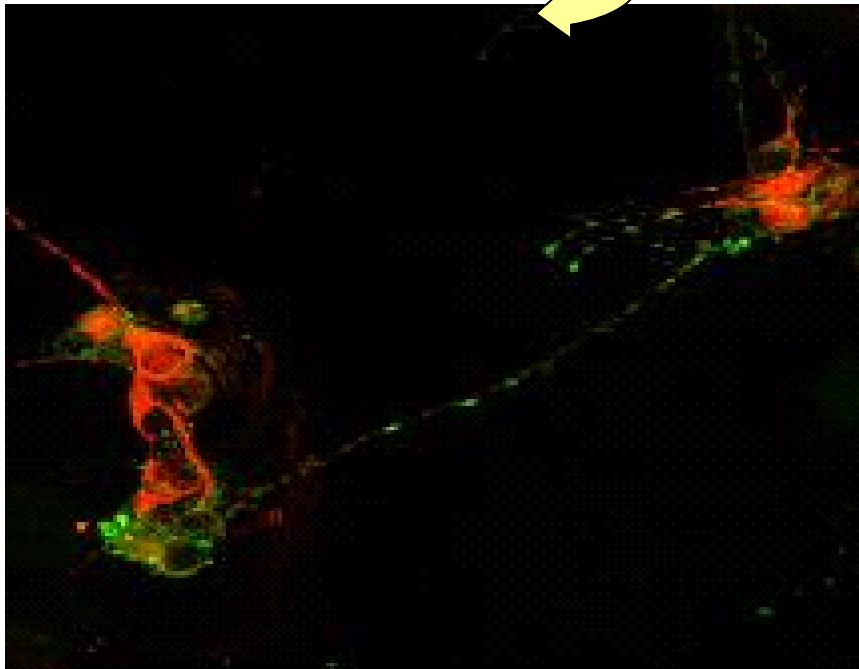
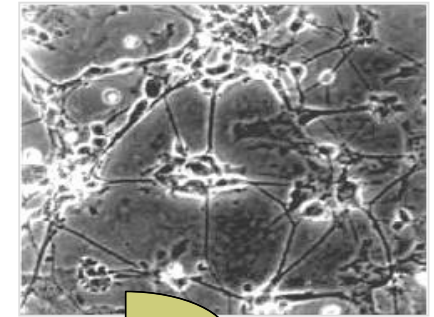
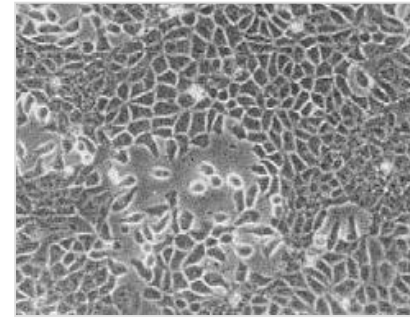
**NT2-N**



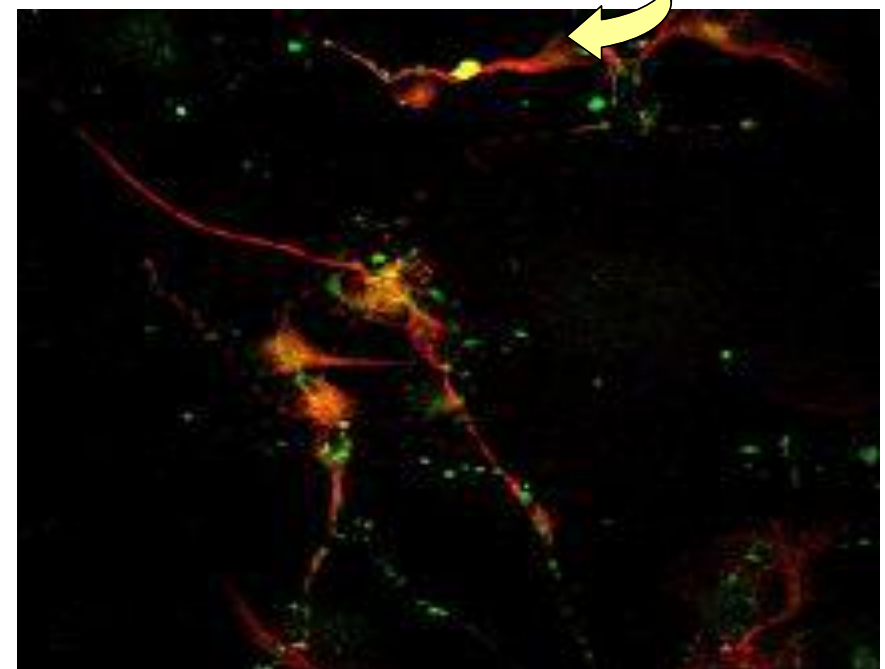
**P19**



**P19-N**



**NT2-N**

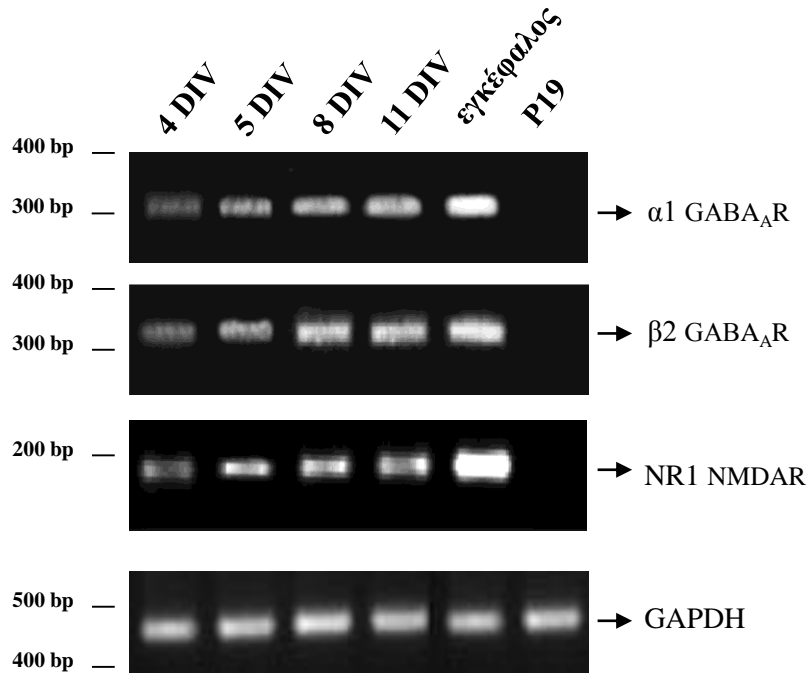


**P19-N**

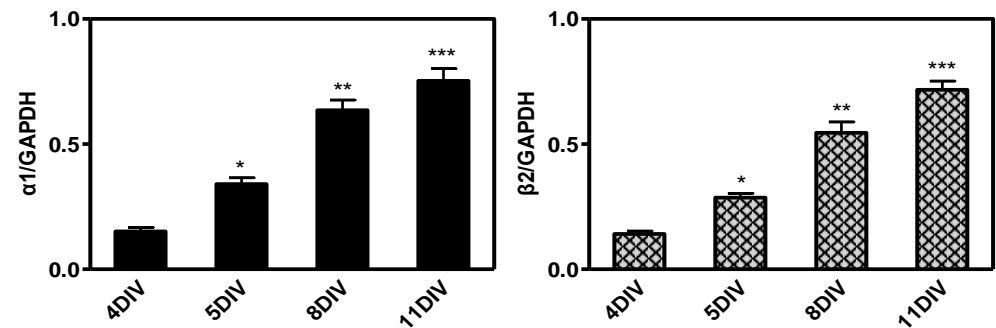
# Διαφοροποίηση σε Νευρικά Κύτταρα

Διαφοροποίηση παρουσία Ρετινοϊκού Οξέος (RA) και Μιτωτικών Αναστολέων (*10 μM 5-fluoro-2-deoxyuridine*, *10 μM Uridine*, *1 μM Cytosine-b-D-arabinoside*) σε, πλήρως διαφοροποιημένους, μετα-μιτωτικούς νευρώνες, οι οποίοι εκφράζουν λειτουργικούς  $GABA_A$  και  $NMDA$  υποδοχείς.

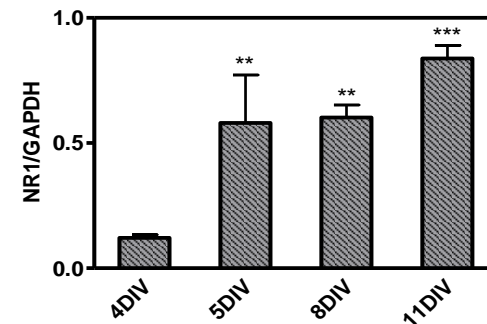
□ Έκφραση των υποδοχέων  $GABA_A$  (υπομονάδες  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ) και NMDA (υπομονάδα NR1) στα P19 κύτταρα (mRNA)



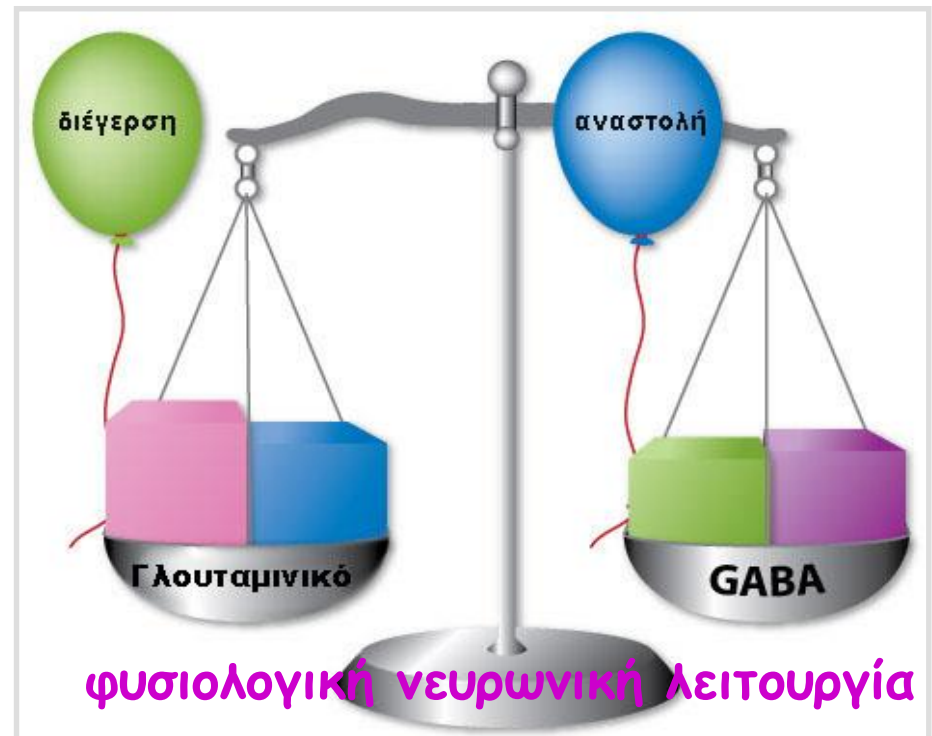
### Υποδοχείς $GABA_A$



### Υποδοχέας NMDA



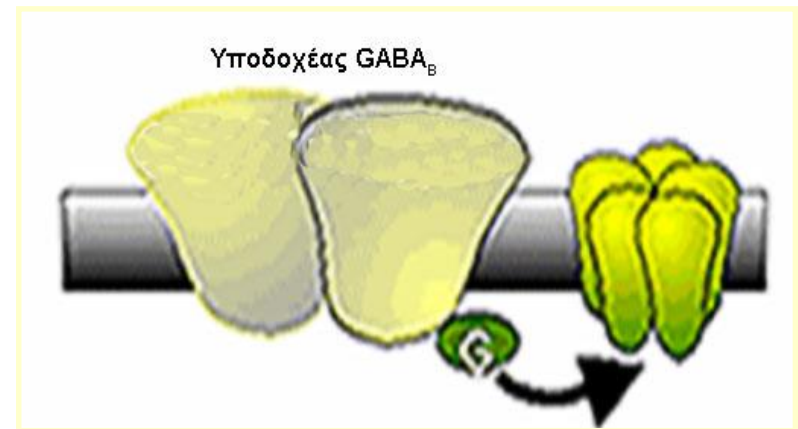
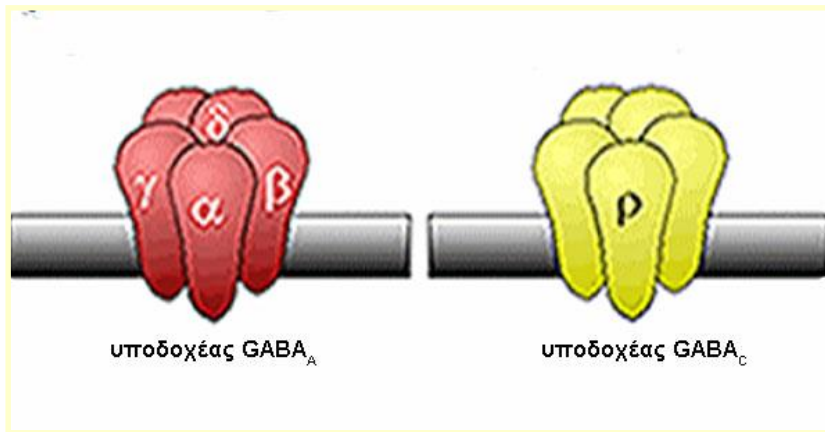




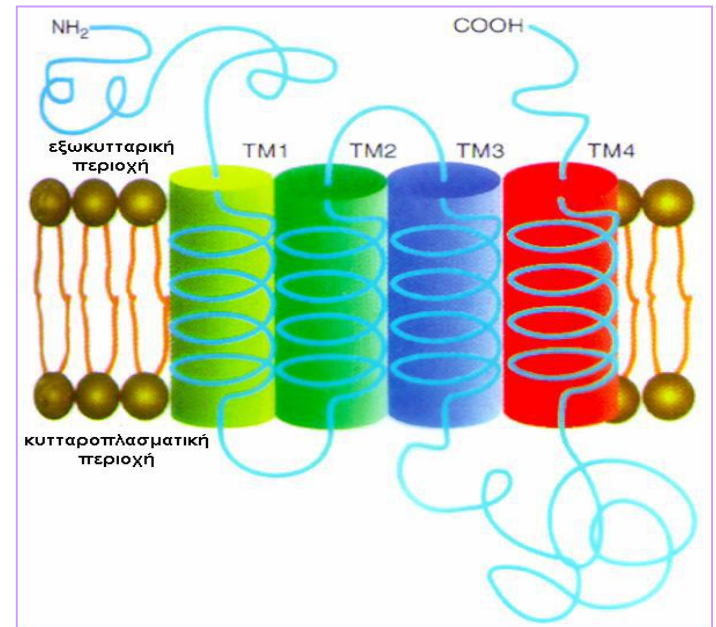
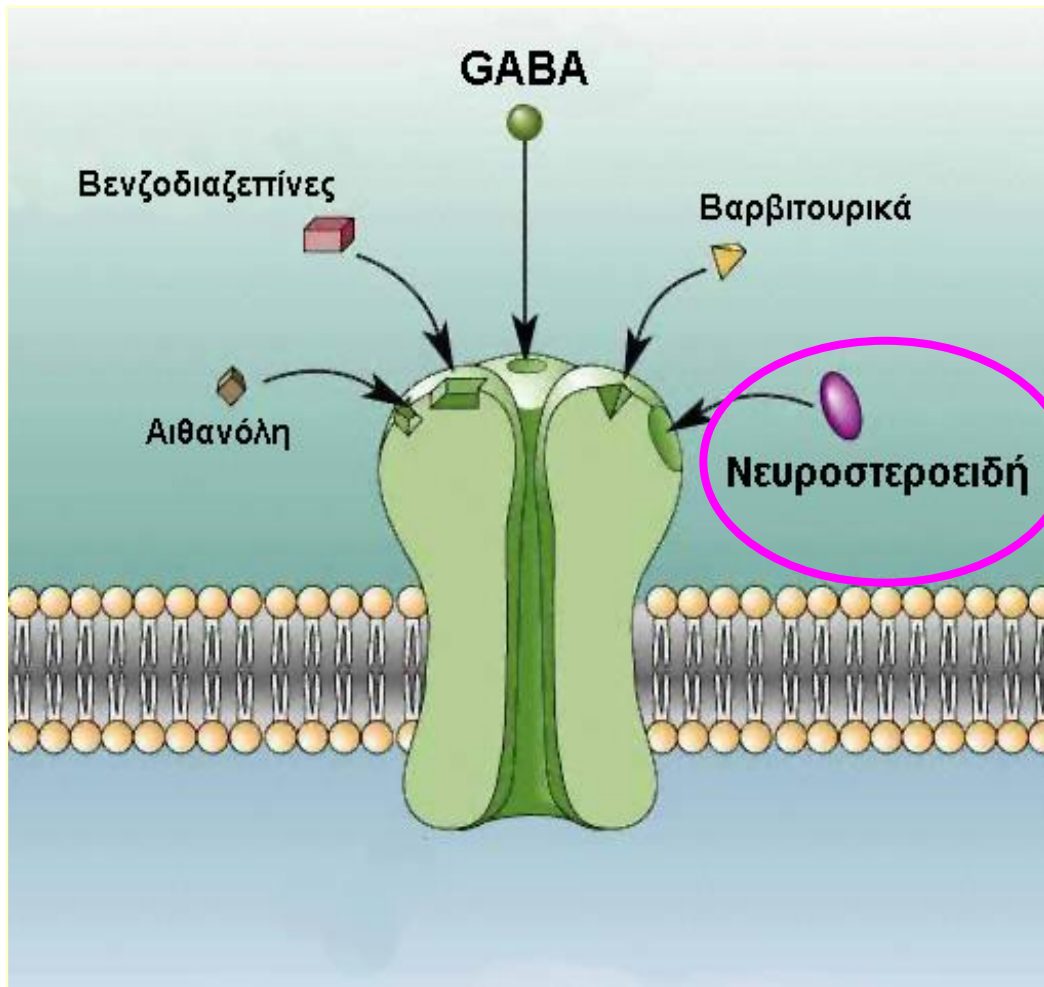
□ Στον ώριμο εγκέφαλο η διατήρηση της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ συναπτικής αναστολής (GABAεργικό σύστημα) και διέγερσης (γλουταμινεργικό σύστημα) της νευρωνικής δραστηριότητας, καθορίζει τη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου.

# γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA): προσδένεται σε δυο τύπους υποδοχέων

- ❖ Ιονοτροπικοί :  $GABA_A$ ,  $GABA_C$
- ❖ Μεταβολοτροπικοί (υποδοχείς συζευγμένοι με G πρωτεΐνες):  $GABA_B$



# Ο υποδοχέας GABA<sub>A</sub>



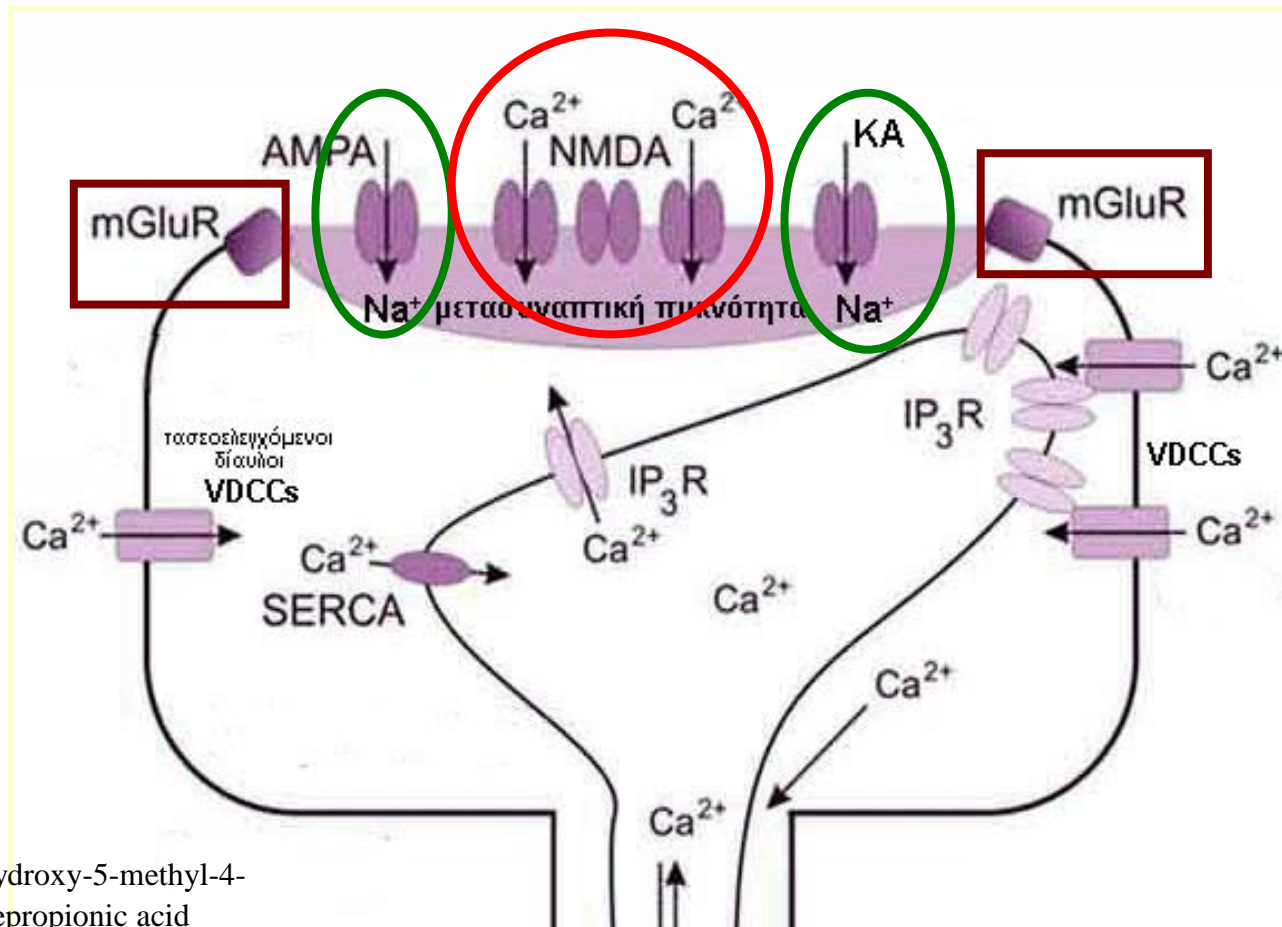
- α-υπομονάδα (6 ισομορφές)
- β-υπομονάδα (3 ισομορφές)
- γ-υπομονάδα (3 ισομορφές)
- δ-υπομονάδα
- ε-υπομονάδα
- θ-υπομονάδα
- π-υπομονάδα

Πιο συχνός συνδυασμός: α1β2γ2

# Γλουταμινικό οξύ : προσδένεται σε δυο τύπους υποδοχέων

## ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

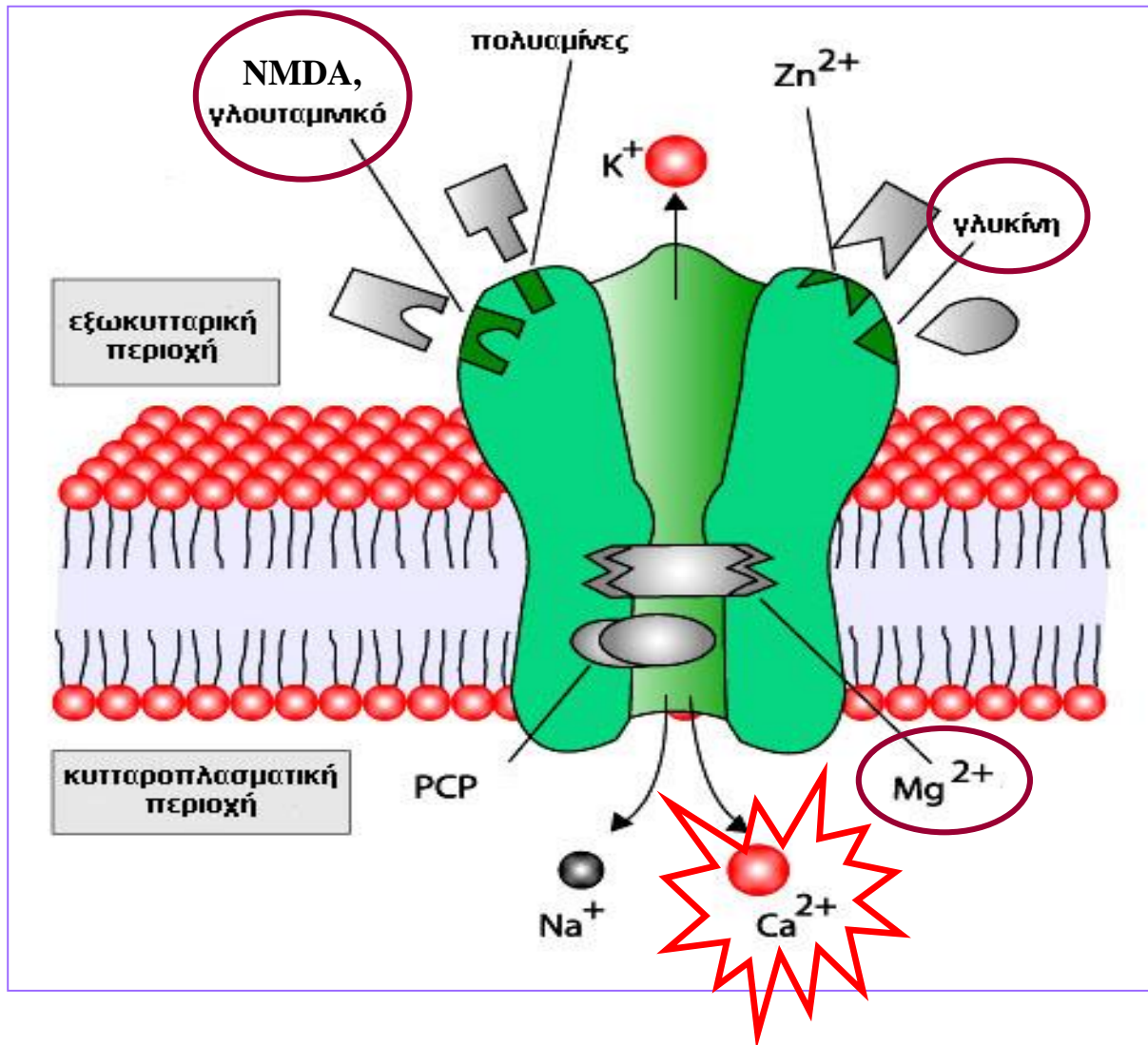
- ❖ Ιονοτροπικοί : **AMPA**, Καϊνικού οξέος (ΚΑ) και **NMDA**
- ❖ Μεταβολοτροπικοί: **mGluRs**



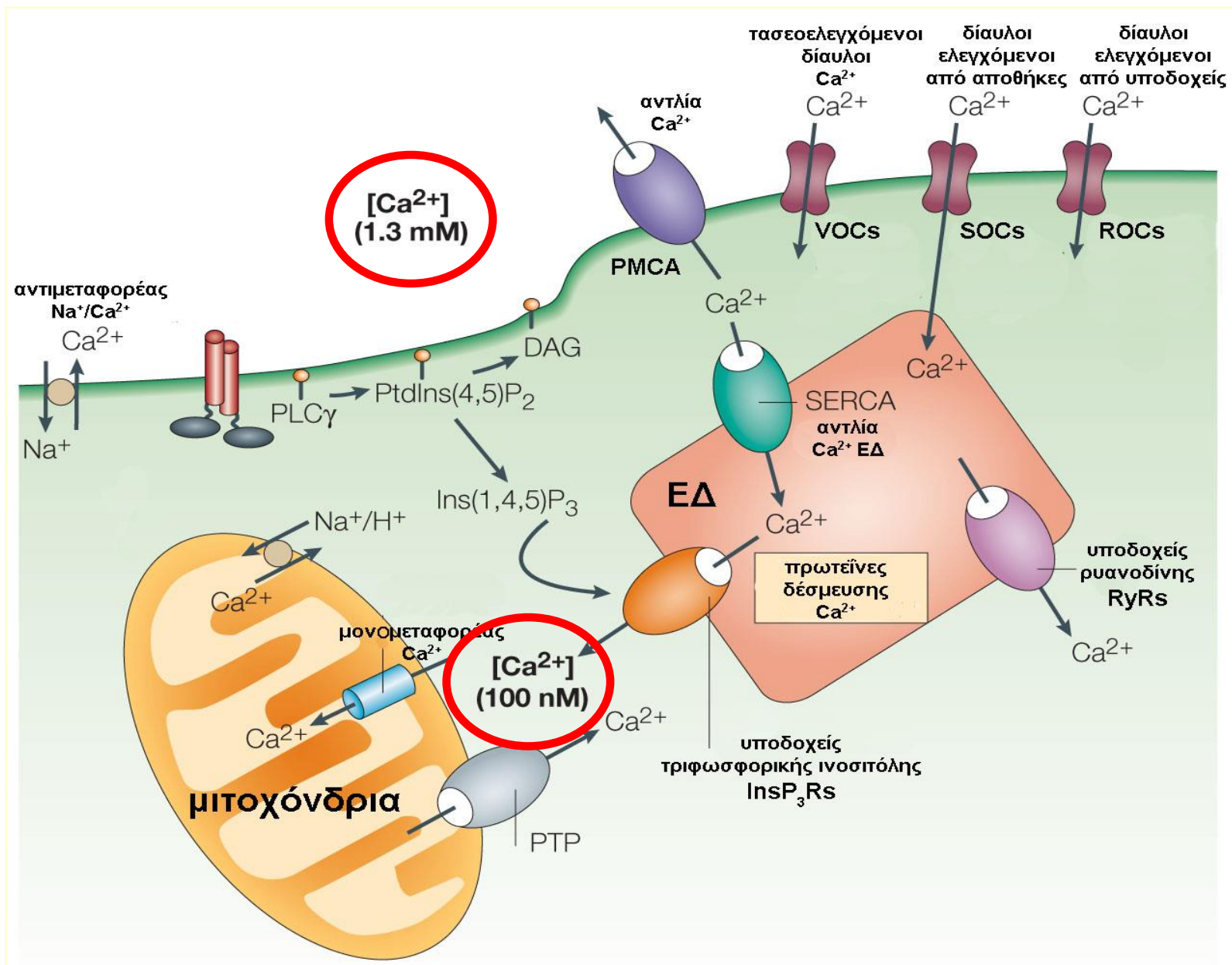
AMPA:  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

# Ο υποδοχέας NMDA

Υπομονάδες NR1, NR2



# Ομοιόσταση ασβεστίου



# Ομοιόσταση ασβεστίου

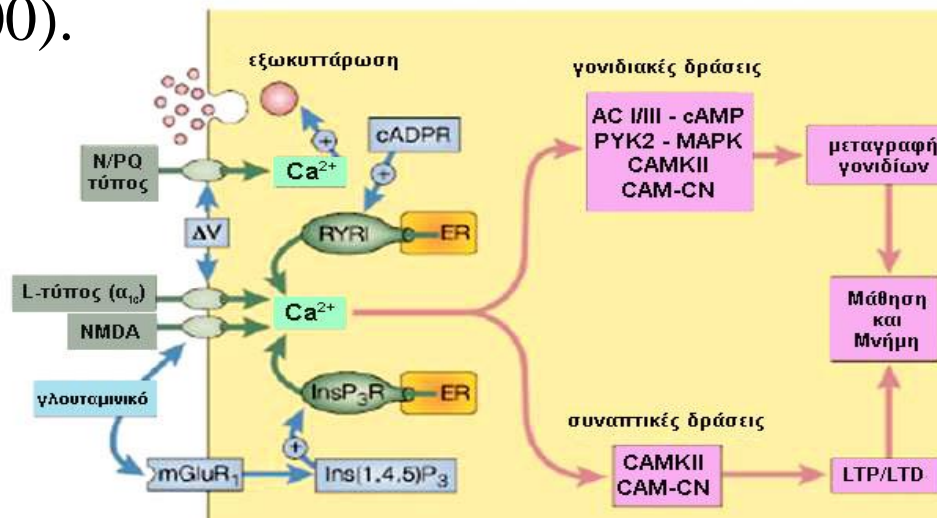
Τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  αποτελούν έναν καθολικό ενδοκυττάριο μηνύτορα που ελέγχει ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών διαδικασιών, όπως η μεταγραφή γονιδίων, η μυϊκή συστολή, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη, η μάθηση και η μνήμη, αλλά και ο κυτταρικός θάνατος (Berridge et al., 2000; Bootman et al., 2001).

Ειδικά στα νευρικά κύτταρα τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  κατέχουν εξέχουσα θέση ως ενδοκυττάριοι μηνύτορες αλλαγών του νευρωνικού περιβάλλοντος, καθώς ελέγχουν και τους δυο τύπους διακυτταρικής επικοινωνίας, δηλαδή τη χημική νευροδιαβίβαση και την ηλεκτρική σύναψη, στους οποίους βασίζεται η εγκεφαλική λειτουργία (Verkhatsky, 2002). Έτσι, η ολοκλήρωση των κυκλωμάτων μεταξύ νευρώνων και γλοίας, που αποτελεί τη βάση για τη διαδικασία της μεταγωγής της πληροφορίας, βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στις συντονισμένες κινήσεις ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  κατά μήκος των κυτταρικών μεμβρανών και διαμέσου των ενδοκυττάρων διαμερισμάτων. Το δίκτυο σηματοδότησης του  $\text{Ca}^{2+}$  αποτελείται από τέσσερις λειτουργικές μονάδες:

1. Ένα διεγερτικό ερέθισμα προκαλεί ποικίλα σήματα κινητοποίησης ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$ .
2. Ενεργοποίηση μηχανισμών που προμηθεύουν το κυτταρόπλασμα με  $\text{Ca}^{2+}$ .
3. Τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  λειτουργούν ως δευτεροί μηνύτορες και διεγείρουν διάφορες διαδικασίες, εξαρτώμενες από ασβέστιο.
4. Τελικά, παρατηρείται ενεργοποίηση μηχανισμών, που περιλαμβάνουν λειτουργία αντλιών και ανταλλακτών για να απομακρυνθεί η περίσσεια του  $\text{Ca}^{2+}$  από τα κύτταρα και να αποκατασταθεί η κατάσταση ισορροπίας του κυττάρου.

Όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, το ισοζύγιο μεταξύ των μηχανισμών ρύθμισης της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης  $\text{Ca}^{2+}$  έχει ως αποτέλεσμα αυτή η συγκέντρωση να είναι περίπου 100 nM. Ωστόσο, διέγερση των κυττάρων μέσω εκπόλωσης, μηχανικής βλάβης ή ορμονικής ενεργοποίησης, αυξάνει τη συγκέντρωση  $\text{Ca}^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα μέχρι και 1  $\mu\text{M}$ .

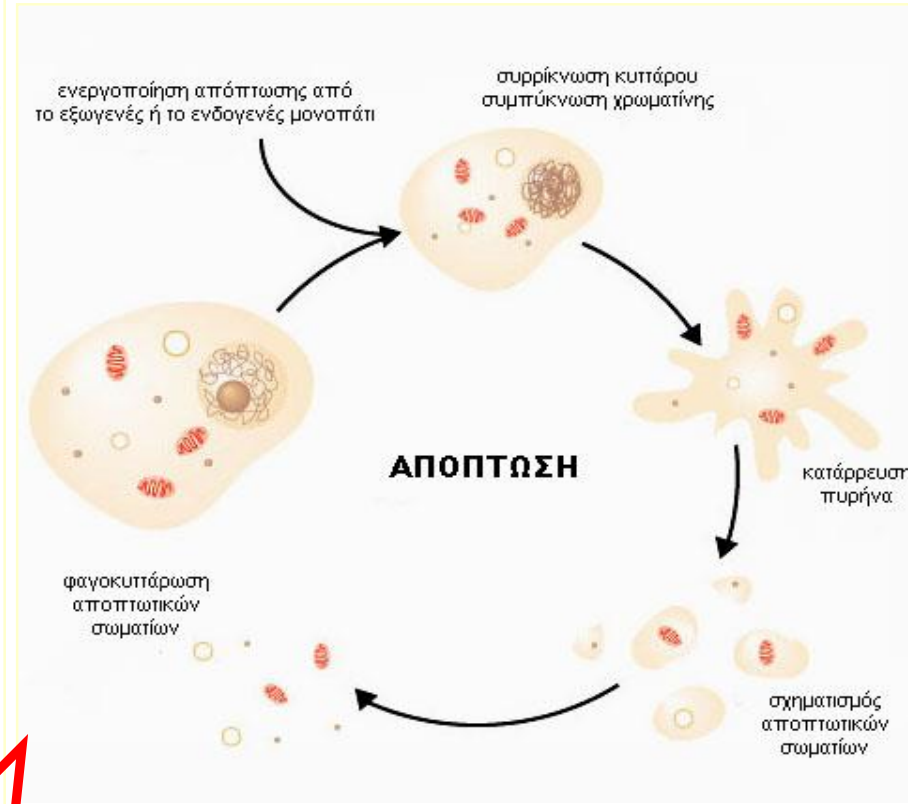
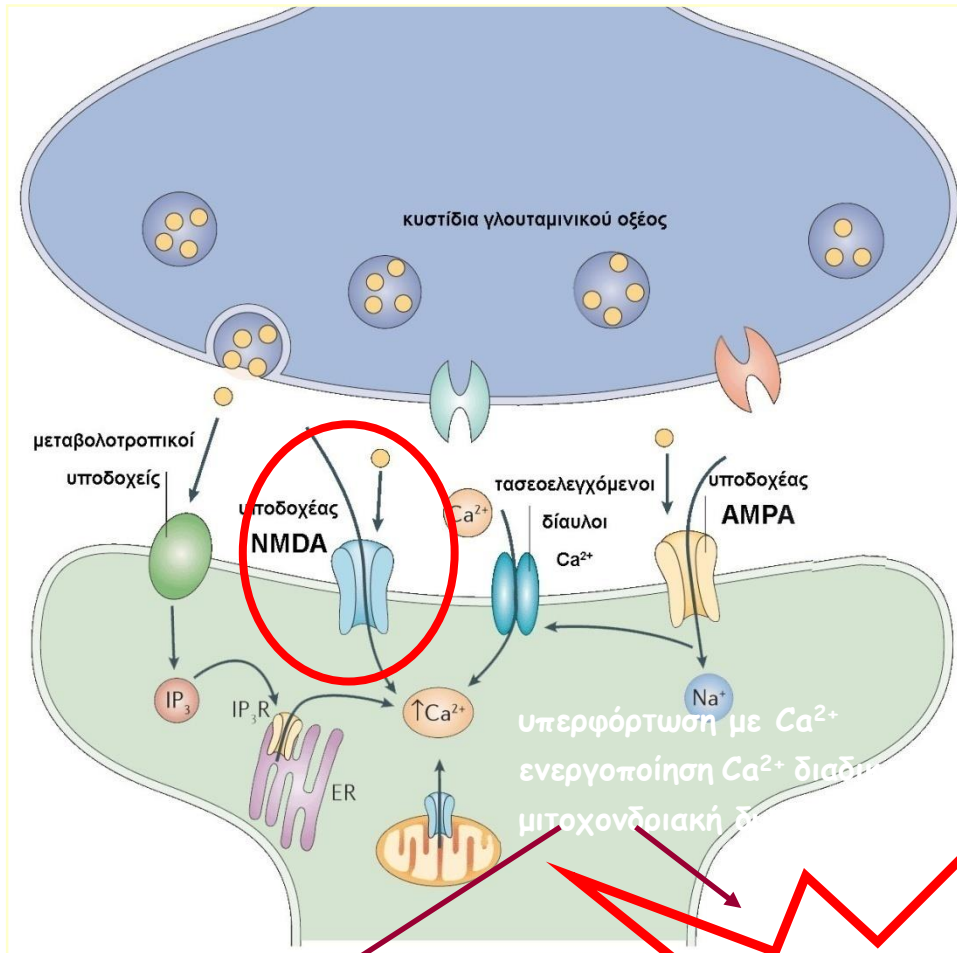
Ρύθμιση διαφορετικών διαδικασιών από ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$  στα νευρικά κύτταρα (προσαρμογή από Berridge et al., 2000).



Η διαταραχή της ρύθμισης της γλουταμινεργικής διαβίβασης, μπορεί να αποτελέσει ένα σήμα κυτταρικού θανάτου παρά ένα σήμα κυτταρικής επιβίωσης και αύξησης (Lynch and Guttman, 2002). Οι τραυματισμένοι νευρώνες απελευθερώνουν γλουταμινικό οξύ σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από αυτές που χρειάζονται για τη φυσιολογική νευρωνική λειτουργία. Το κύριο χαρακτηριστικό αυτής της διαδικασίας είναι η εισροή ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  και  $\text{Na}^+$ , εκ των οποίων η αυξημένη συγκέντρωση των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο αφού επάγει την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη αντιδράσεων που τελικά οδηγούν σε θάνατο του νευρώνα (Sattler and Tymianski, 2000).

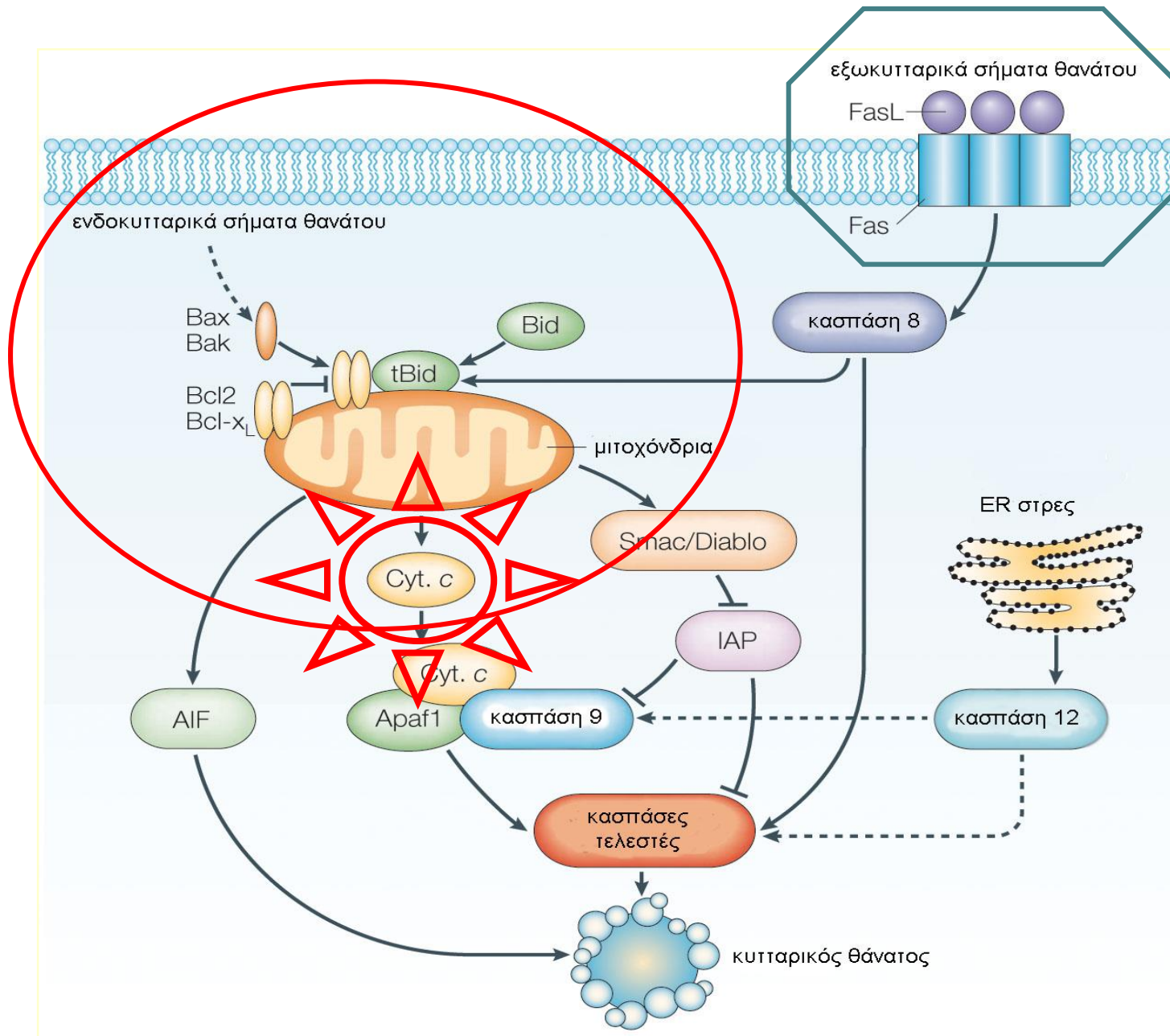


# Ασβέστιο και διεγερσιμοτοξικότητα



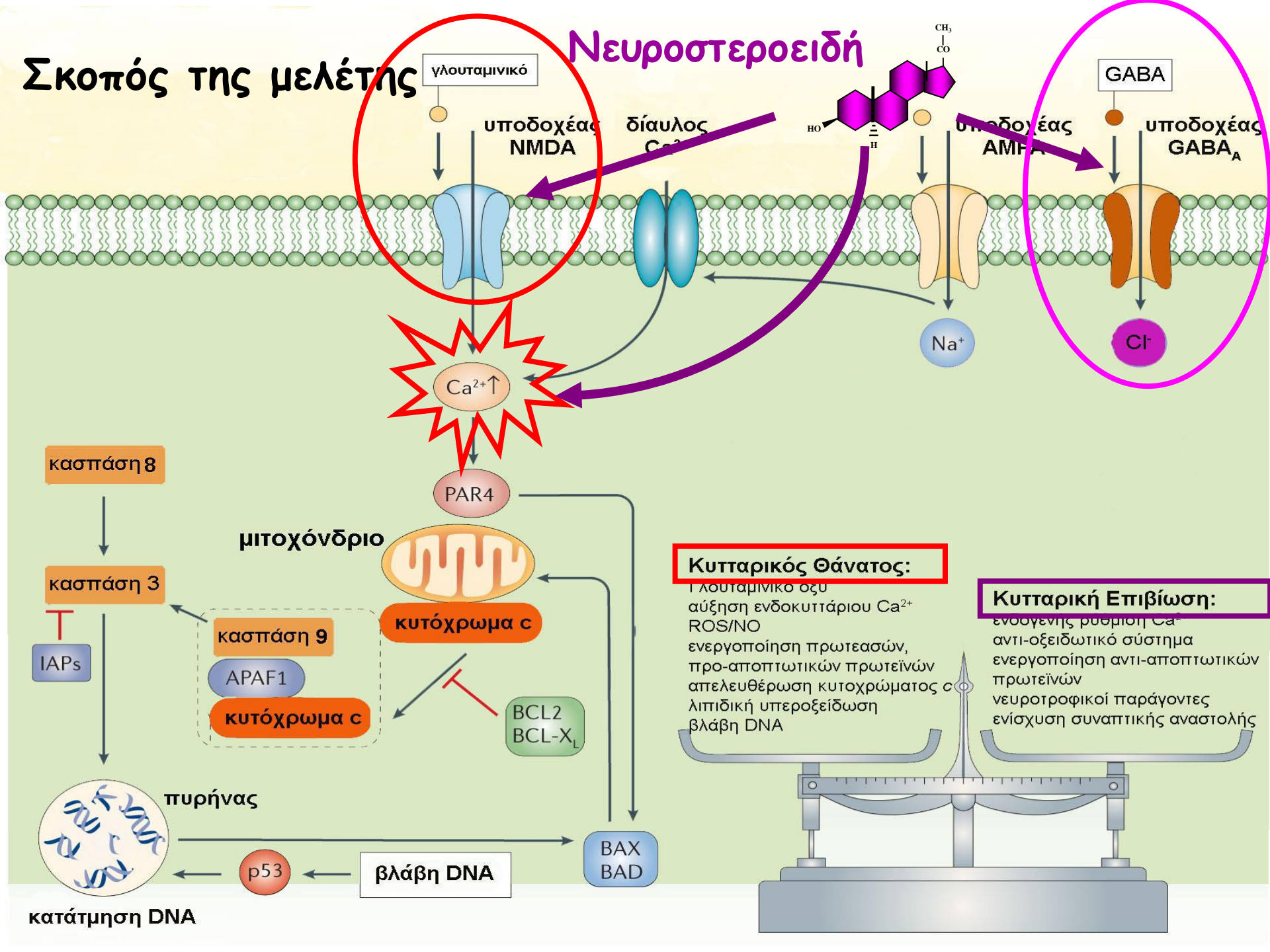
ΝΕΚΡΩΣΗ

ΑΠΟΠΤΩΣΗ



# Σκοπός της μελέτης

## Νευροστεροειδή

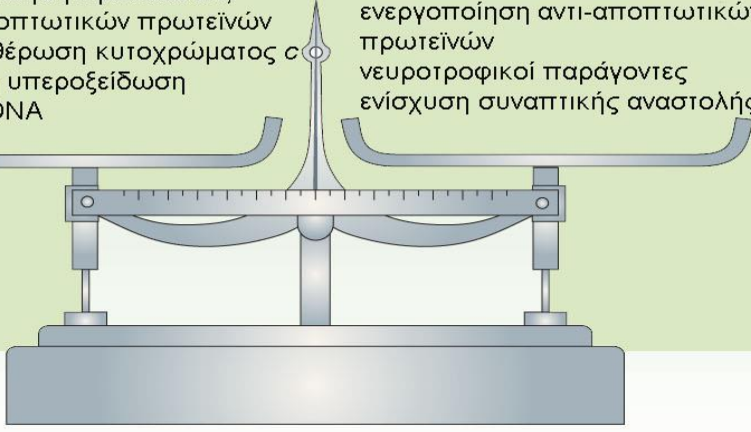


### Κυτταρικός Θάνατος:

Γλουταμινικό οξύ  
αύξηση ενδοκυττάριου Ca<sup>2+</sup>  
ROS/NO  
ενεργοποίηση πρωτεασών,  
προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών  
απελευθέρωση κυτοχρώματος c  
λιπιδική υπεροξειδωση  
βλάβη DNA

### Κυτταρική Επιβίωση:

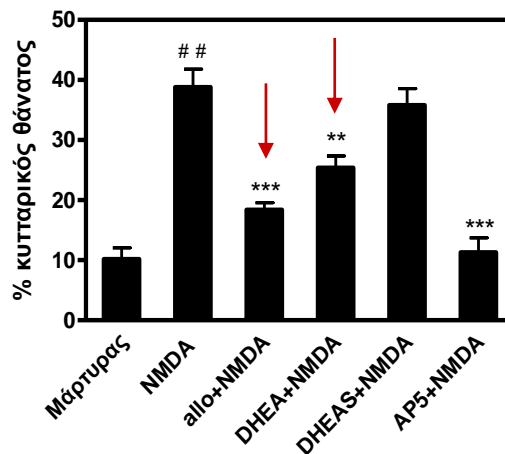
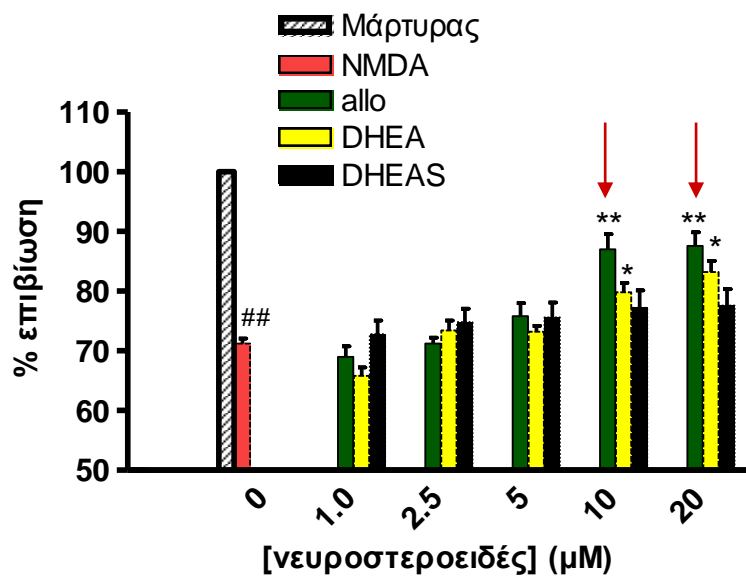
ενδογενής ρύθμιση Ca<sup>2+</sup>  
αντι-οξειδωτικό σύστημα  
ενεργοποίηση αντι-αποπτωτικών  
πρωτεϊνών  
νευροτροφικοί παράγοντες  
ενίσχυση συναπτικής αναστολής

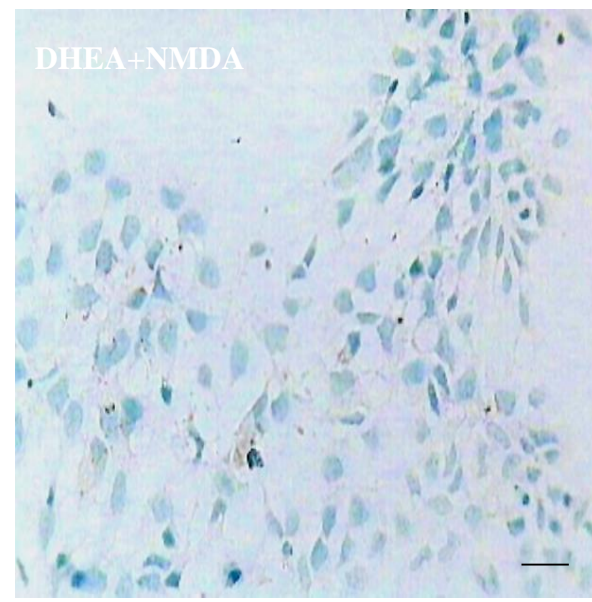
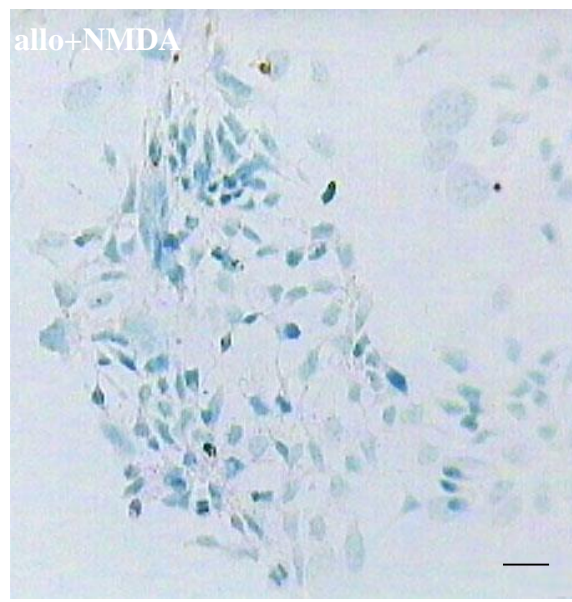
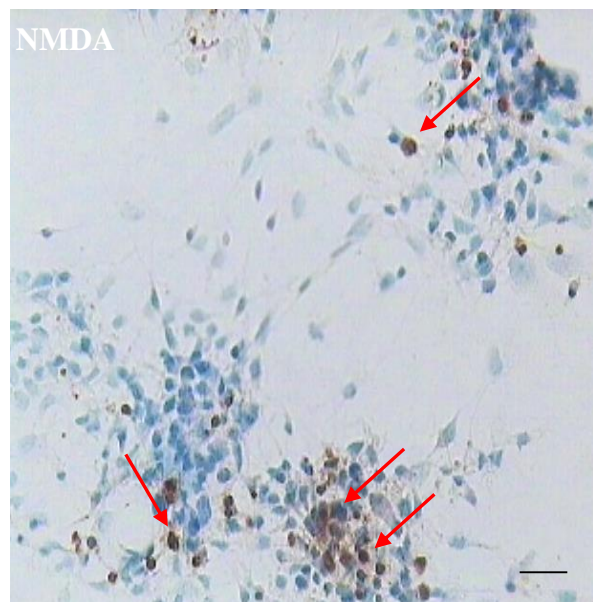
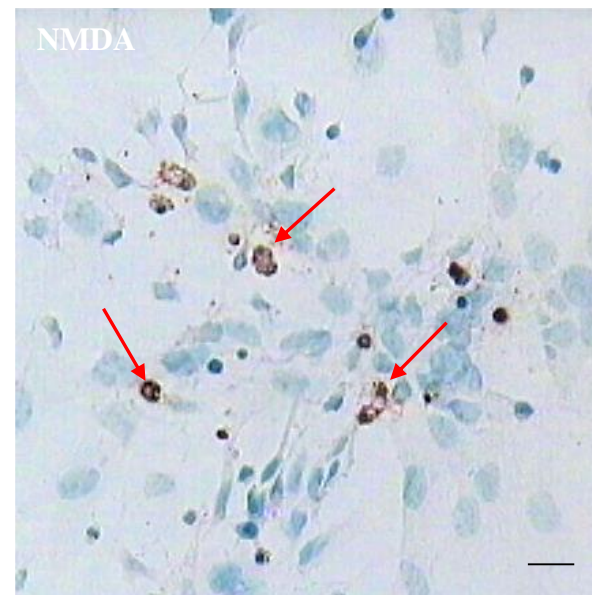
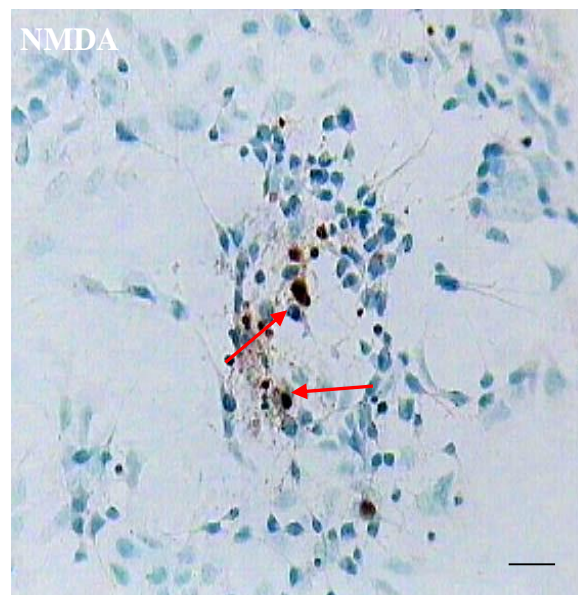
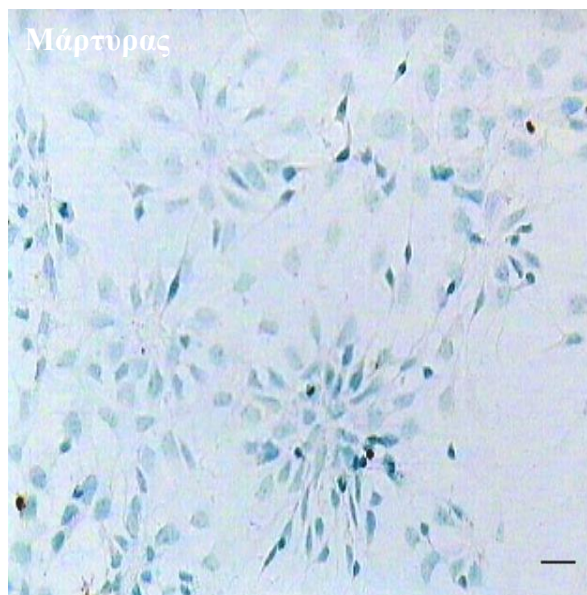


# Ενεργοποίηση γλουταμινεργικών υποδοχέων

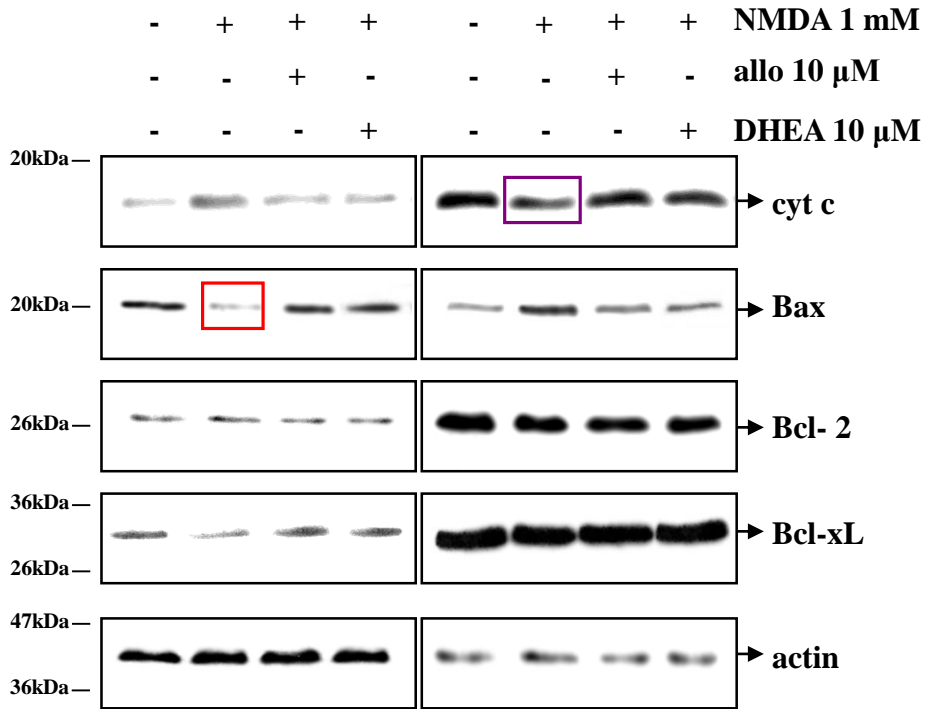
## ❖ P19-N

| <b>L-Glu</b> | <b>% επιβίωση</b> | <b>NMDA</b> | <b>% επιβίωση</b> |
|--------------|-------------------|-------------|-------------------|
| 0 $\mu$ M    | 100               | 0 $\mu$ M   | 100               |
| 100 $\mu$ M  | 96 $\pm$ 1        | 100 $\mu$ M | 94.3 $\pm$ 3      |
| 500 $\mu$ M  | 84 $\pm$ 10       | 500 $\mu$ M | 90 $\pm$ 3.6      |
| 1 mM         | 73.2 $\pm$ 2.5 ** | 1 mM        | 70.6 $\pm$ 2.3 ** |
| 2 mM         | 62.6 $\pm$ 6.8 ** | 2 mM        | 62 $\pm$ 5.2 **   |
| 5 mM         | 46.3 $\pm$ 5 **   | 5 mM        | 59 $\pm$ 5.6 **   |





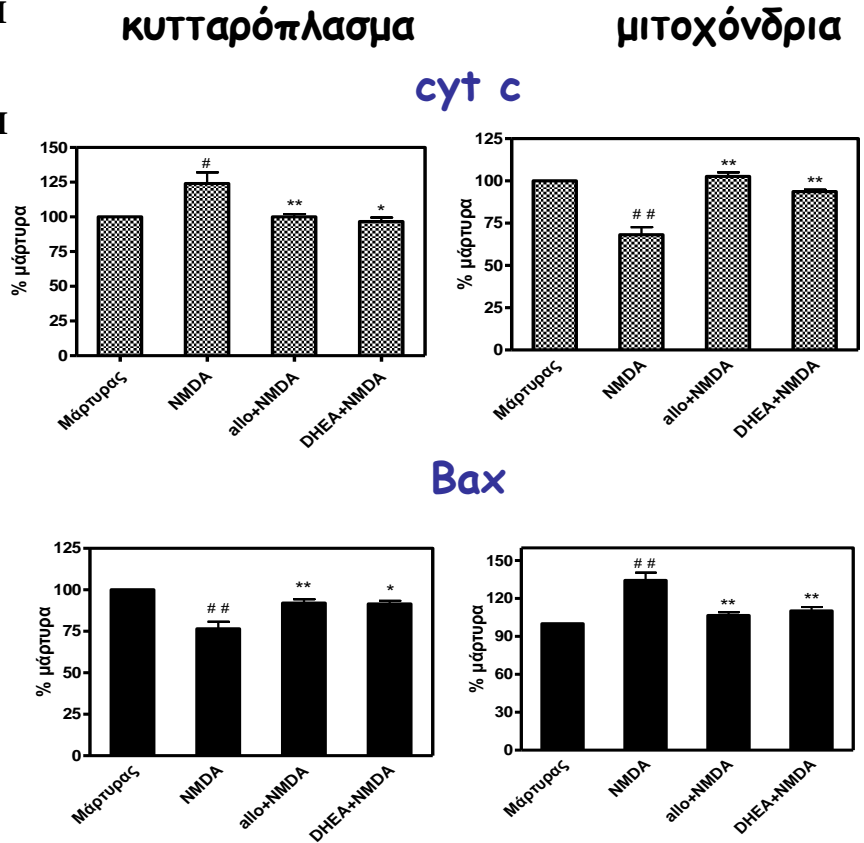
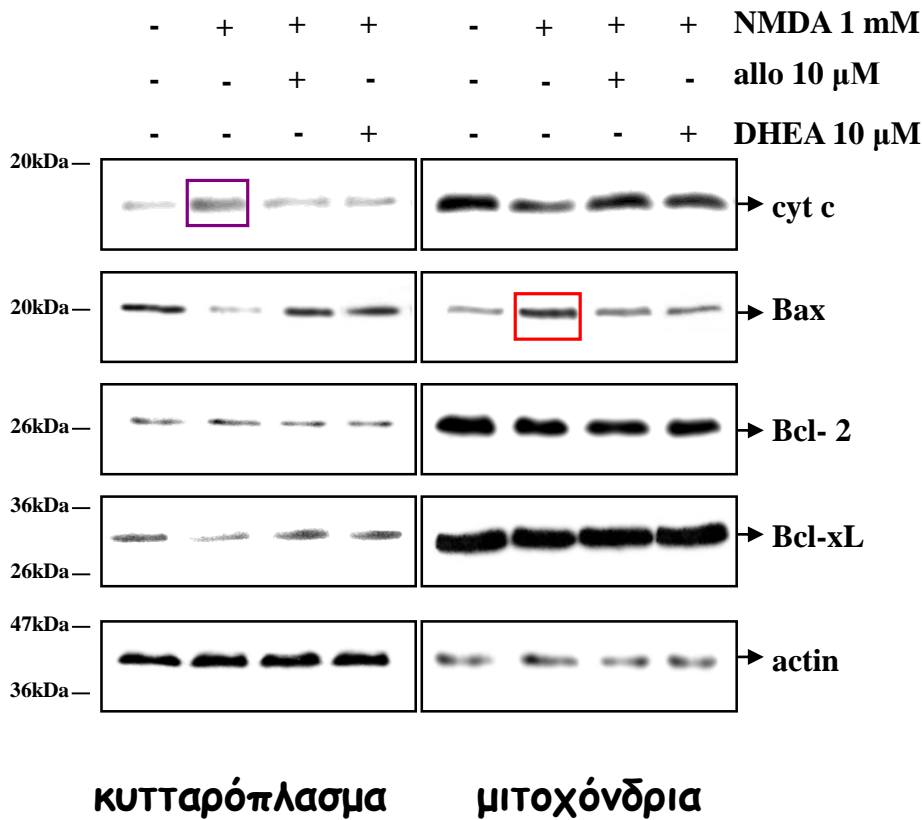
□ Εμπλέκεται το ενδογενές μιτοχονδριακό μονοπάτι στην NMDA-επαγόμενη απόπτωση ;



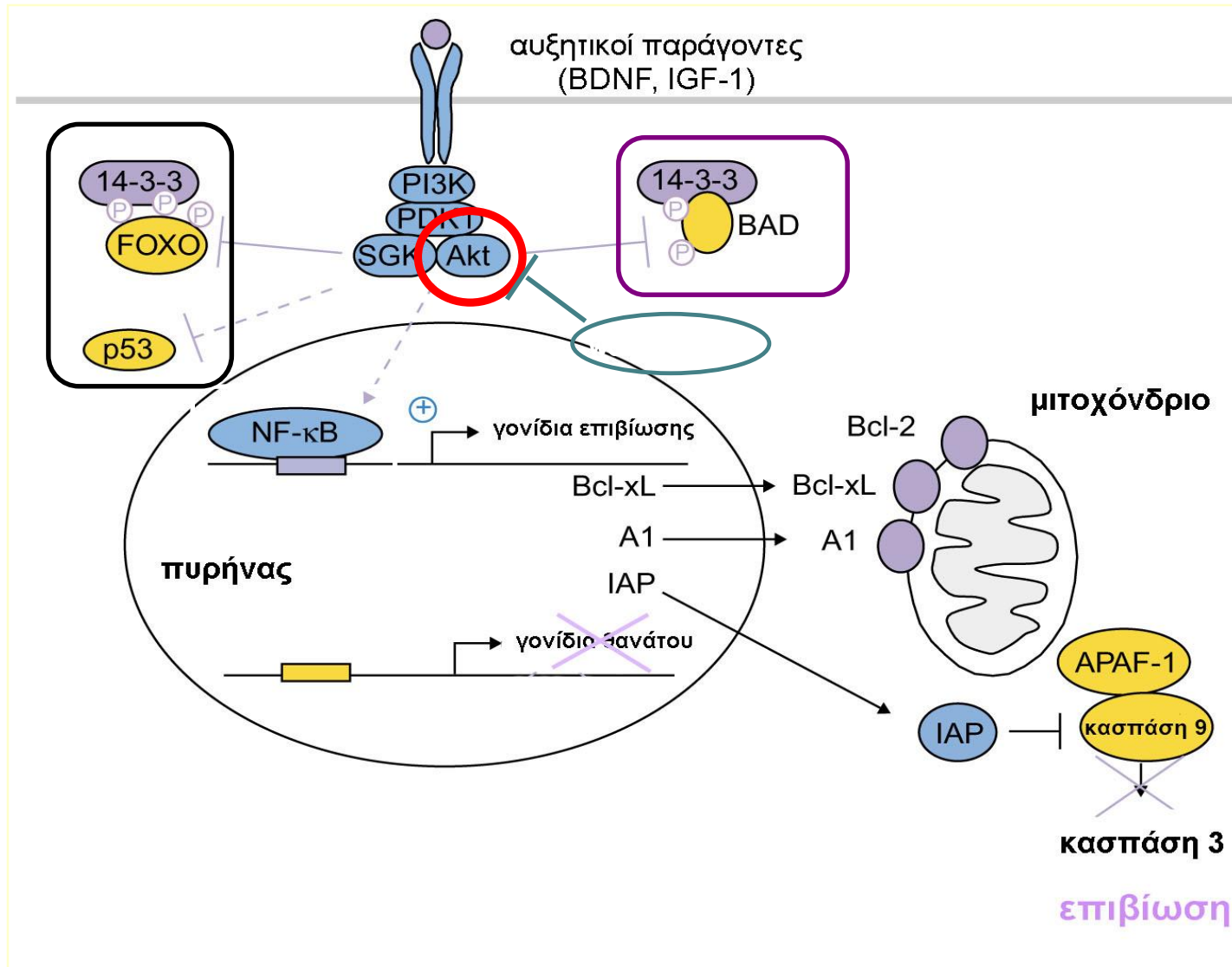
ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ

ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

# □ Εμπλέκεται το ενδογενές μιτοχονδριακό μονοπάτι στην NMDA-επαγόμενη απόπτωση ;



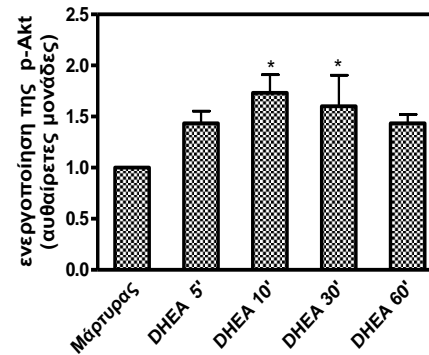
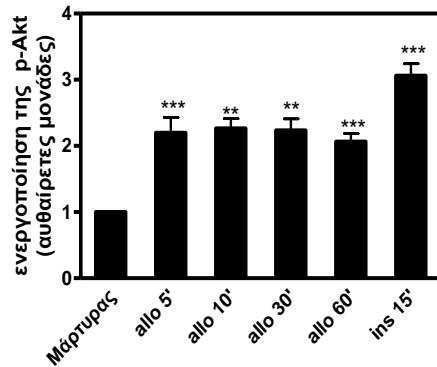
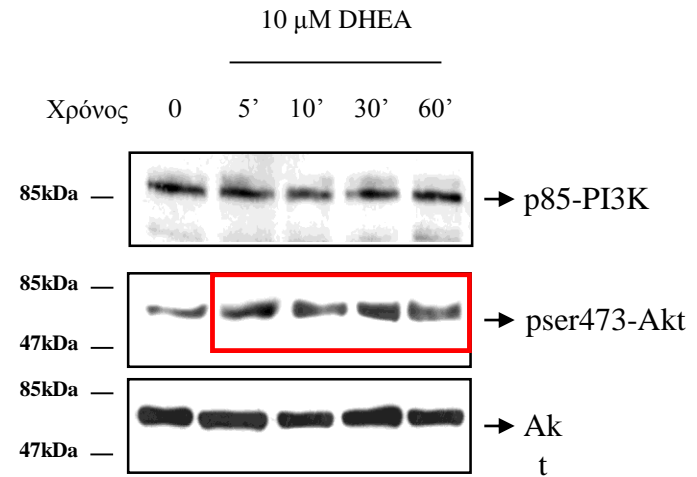
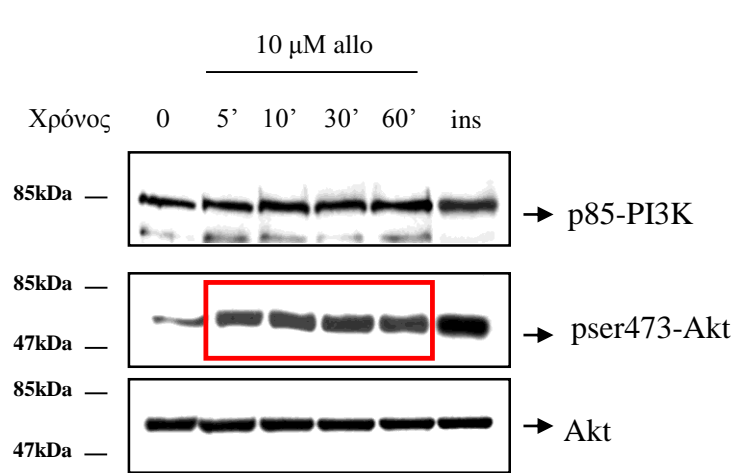
# Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3-K/Akt



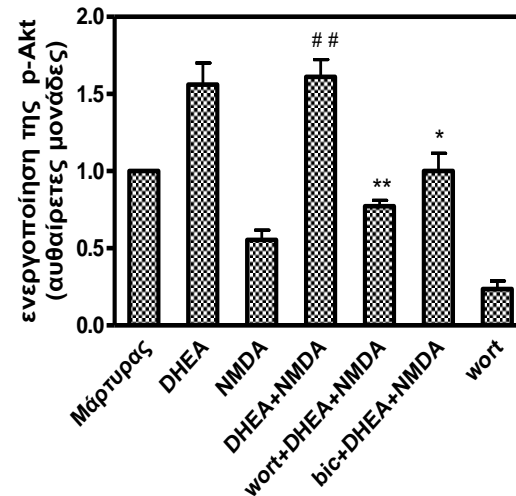
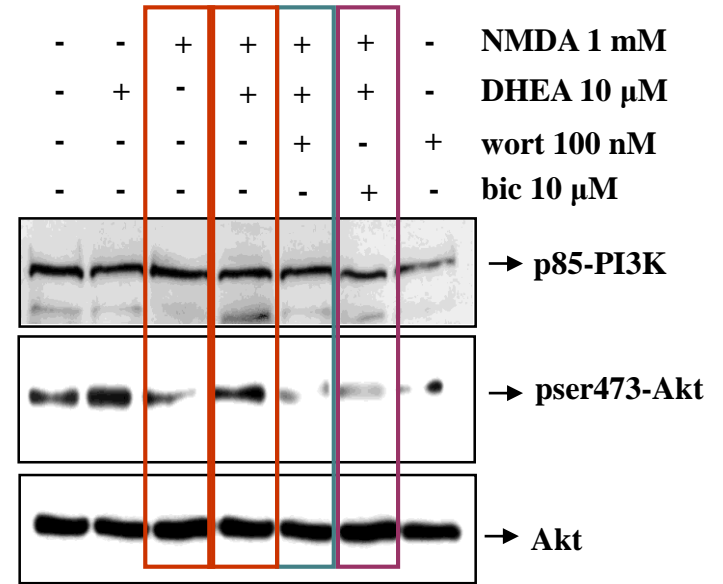
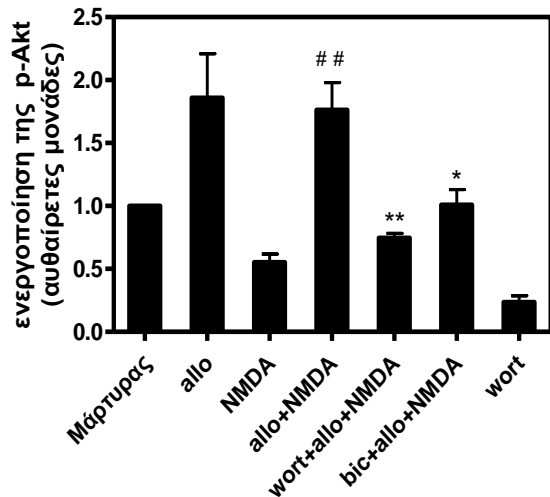
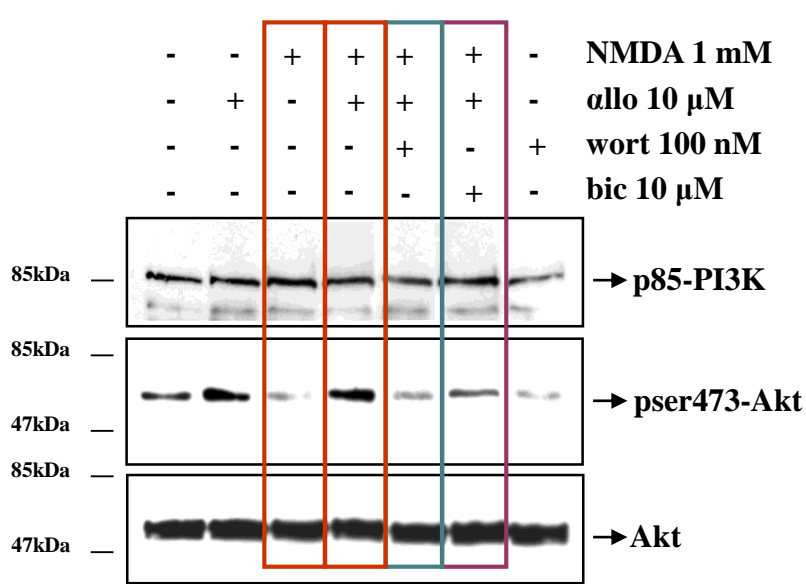
Φωσφορυλίωση υποδοχέα  $GABA_A$  (υπομονάδα  $\beta 2$ )  $\longrightarrow$  • ρύθμιση του αριθμού των υποδοχέων  
• πλαστικότητα, λειτουργία



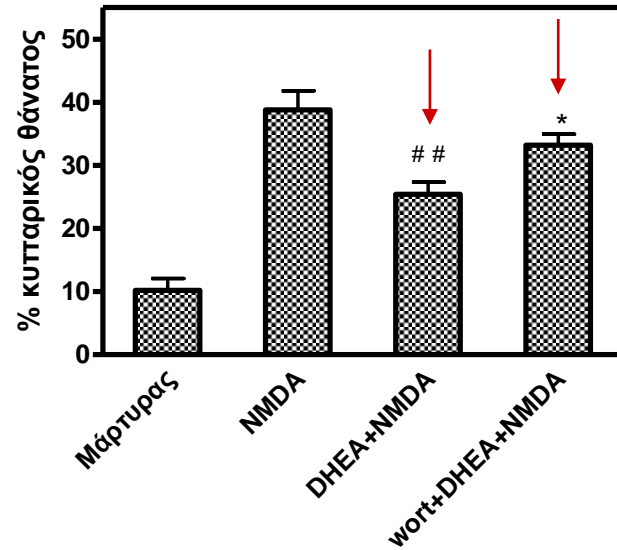
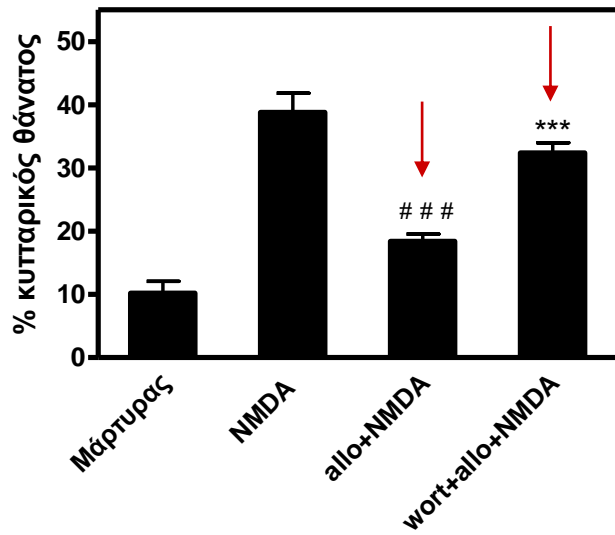
# □ Εμπλέκεται το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3-K/Akt κινάσης στη δράση των νευροστεροειδών ;



# Ποια είναι η επίδραση του NMDA και των νευροστεροειδών στη φωσφορυλίωση της Akt κινάσης :

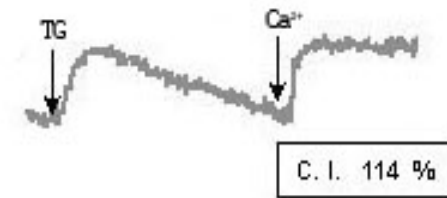
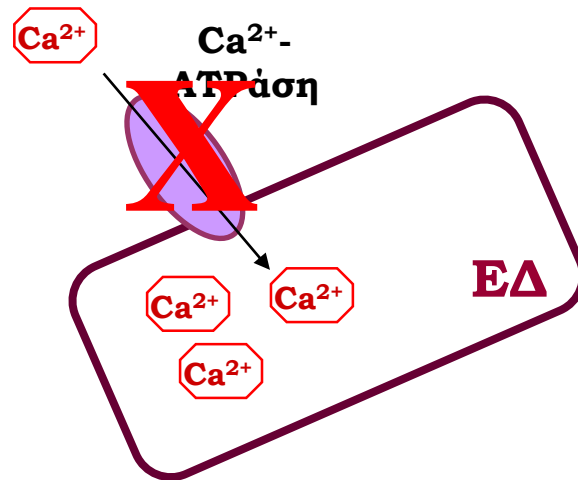
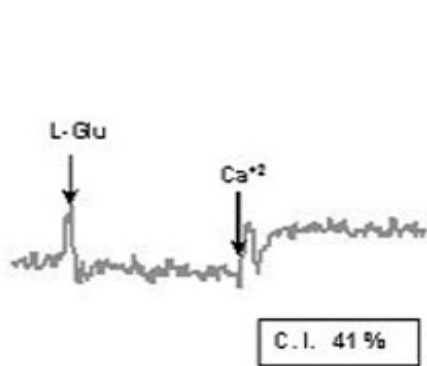
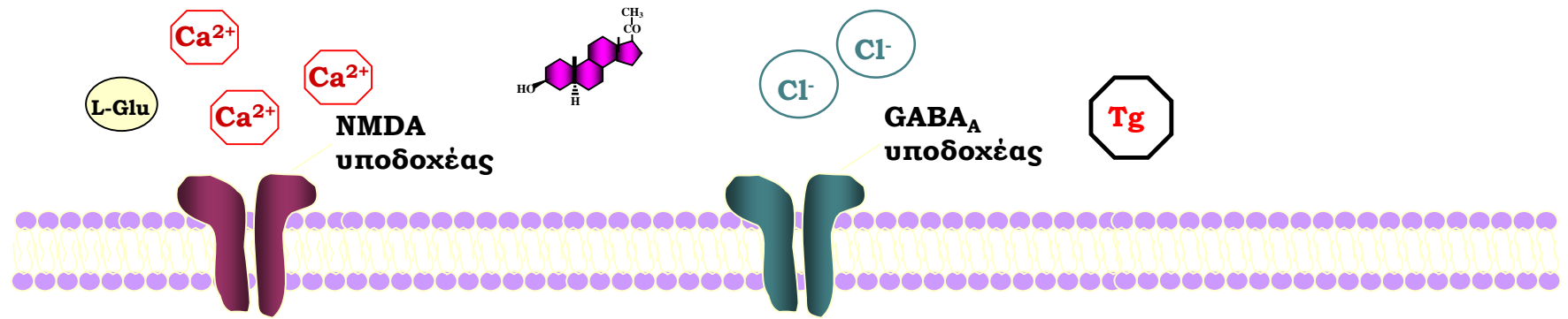


- Το σηματοδοτικό μονοπάτι της PI3-K/Akt κινάσης μεσολαβεί πράγματι τις προστατευτικές δράσεις των νευροστεροειδών ;



# Ποιος είναι ο ρόλος του $Ca^{2+}$ στην τοξικότητα που προκαλεί το NMDA

α) Εισροή ιόντων  $Ca^{2+}$  παρουσία Γλουταμινικού οξέος (L-Glu) και NMDA

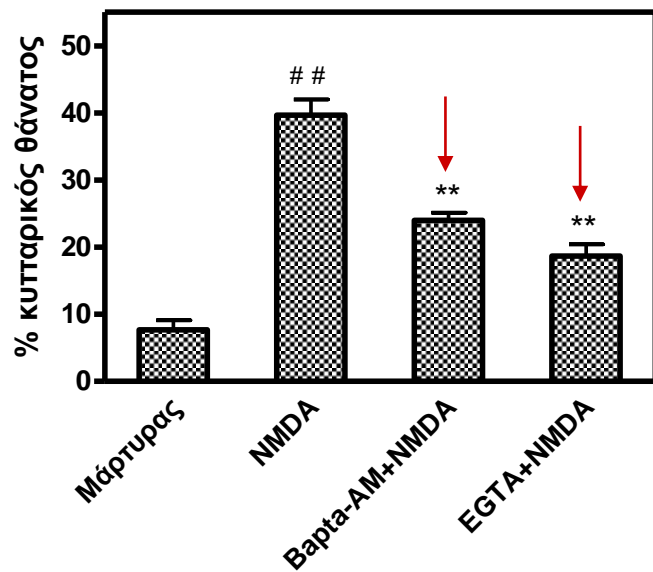


|          | εισορή $Ca^{2+}$ |
|----------|------------------|
| Μάρτυρας | 41 %             |
| allo     | 22 %             |
| DHEA     | 23 %             |

|           | εισορή $Ca^{2+}$ |
|-----------|------------------|
| Μάρτυρας  | 114 %            |
| allo      | 49 %             |
| allo+NMDA | 48 %             |

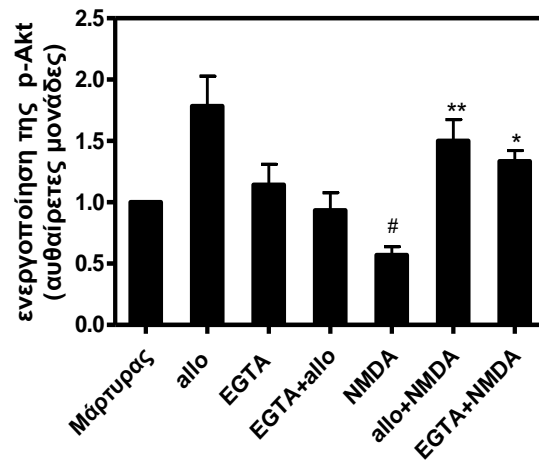
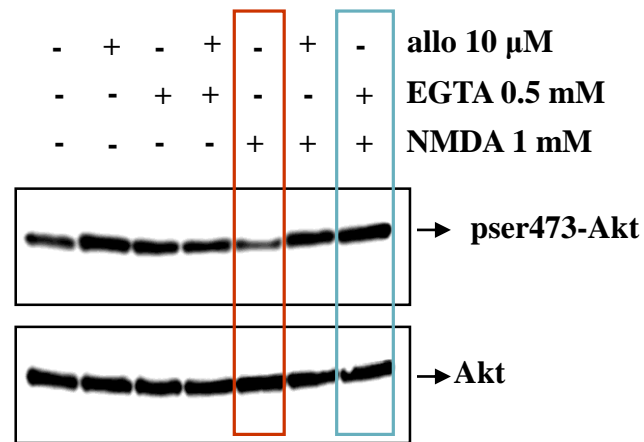
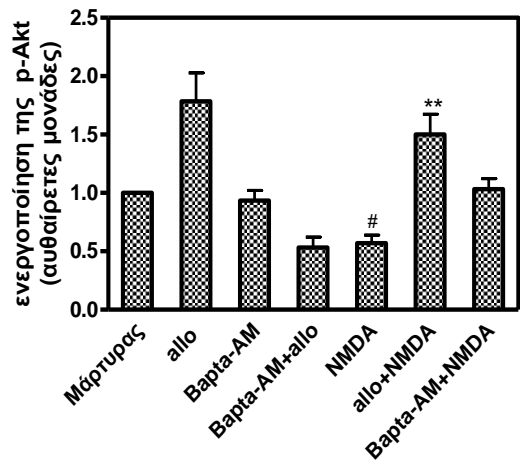
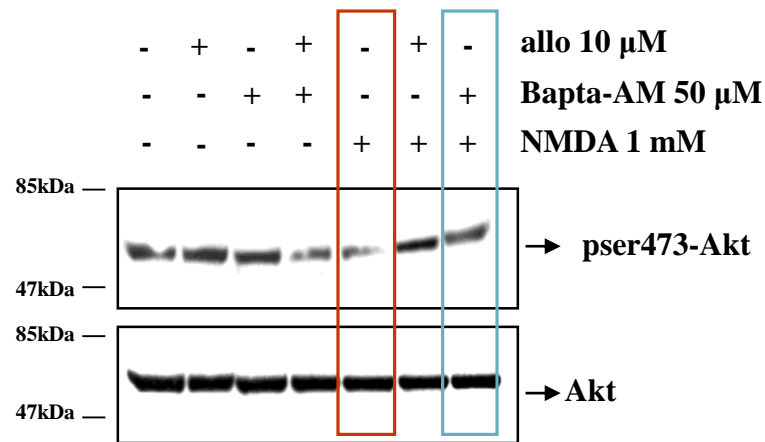
□ Ποιος είναι ο ρόλος του  $Ca^{2+}$  στην τοξικότητα που προκαλεί το NMDA ;

β) δέσμευση  $Ca^{2+}$  (Bapta-AM, EGTA)

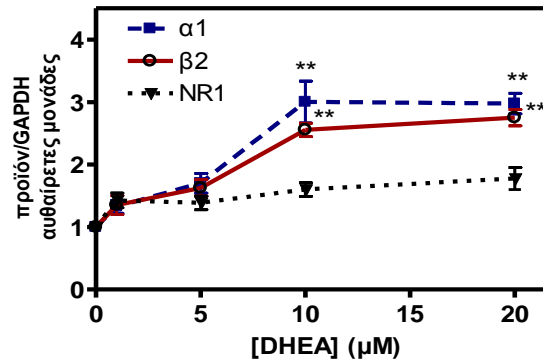
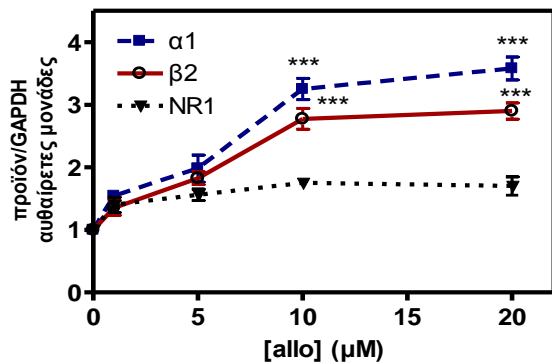
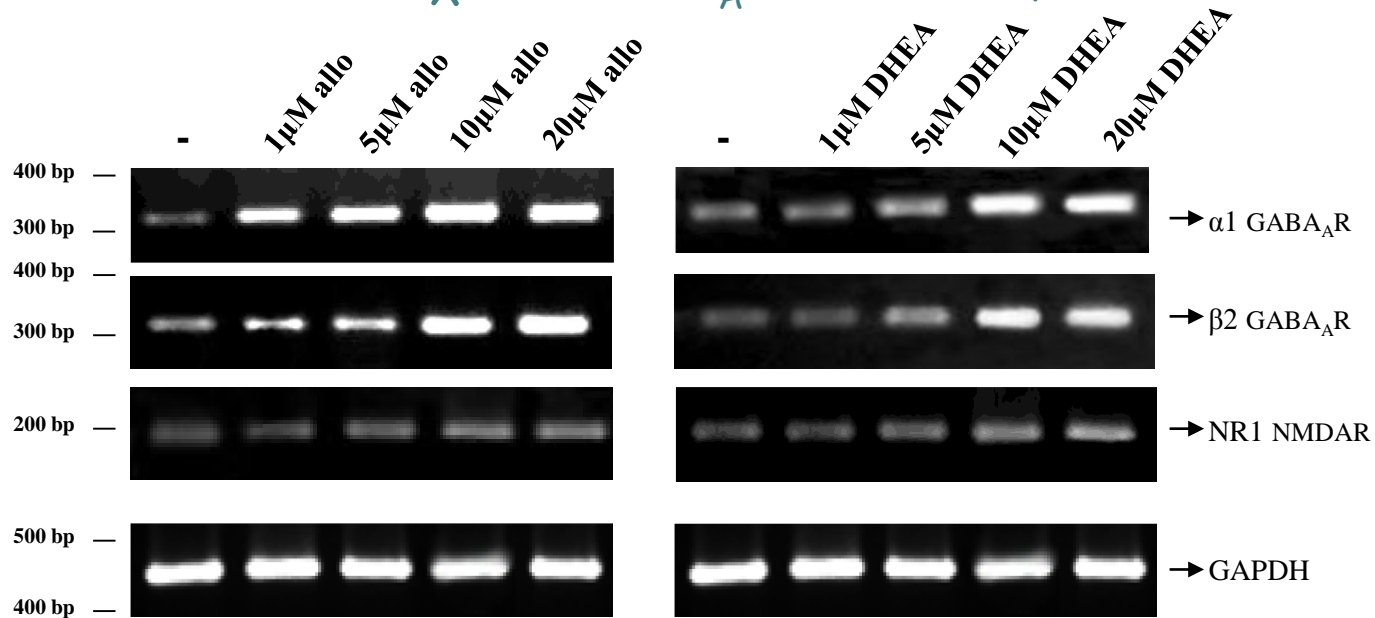


# Ποιος είναι ο ρόλος του $Ca^{2+}$ στην τοξικότητα που προκαλεί το NMDA

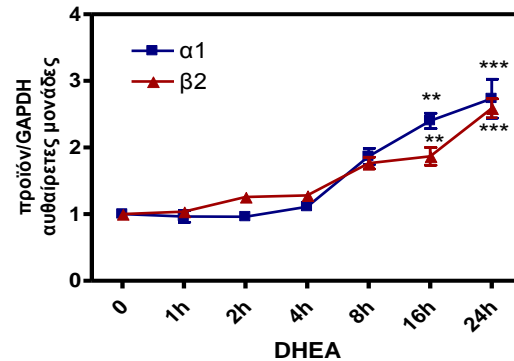
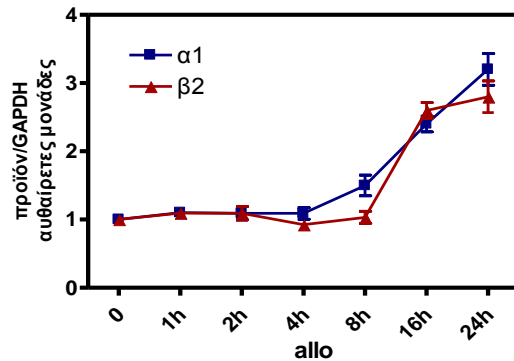
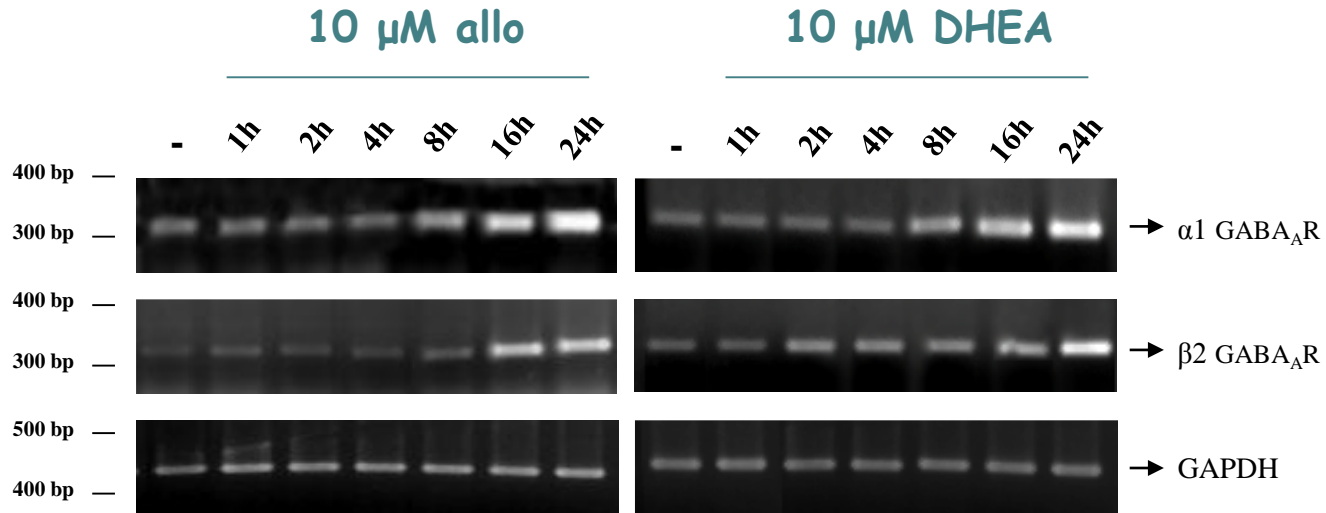
γ) επίδραση της δέσμευσης  $Ca^{2+}$  (Bapta-AM, EGTA) στη φωσφορυλίωση της Akt κινάσης



□ Ποια είναι η επίδραση των νευροστεροειδών στην έκφραση των υποδοχέων  $GABA_A$  και NMDA ;

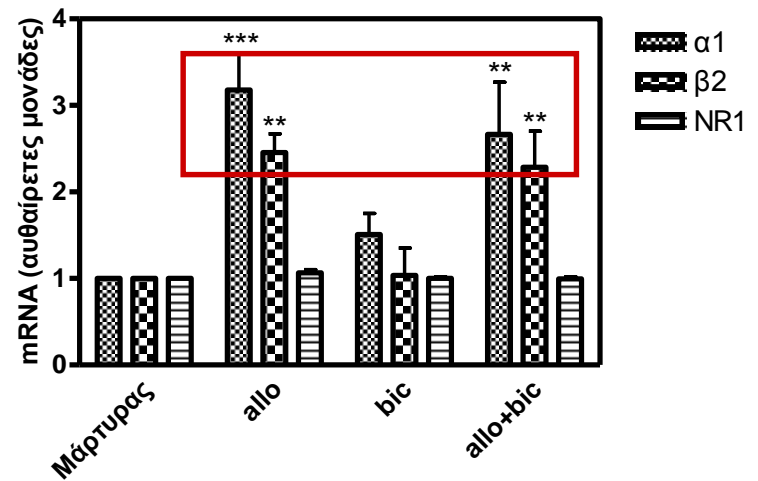
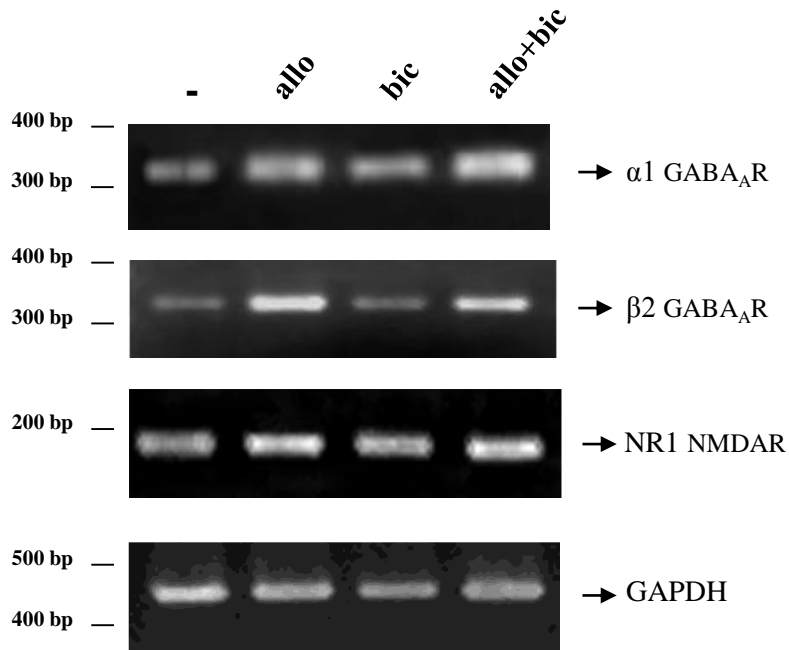


# □ Ποια είναι η επίδραση των νευροστεροειδών στην έκφραση των υποδοχέων $GABA_A$ και NMDA ;

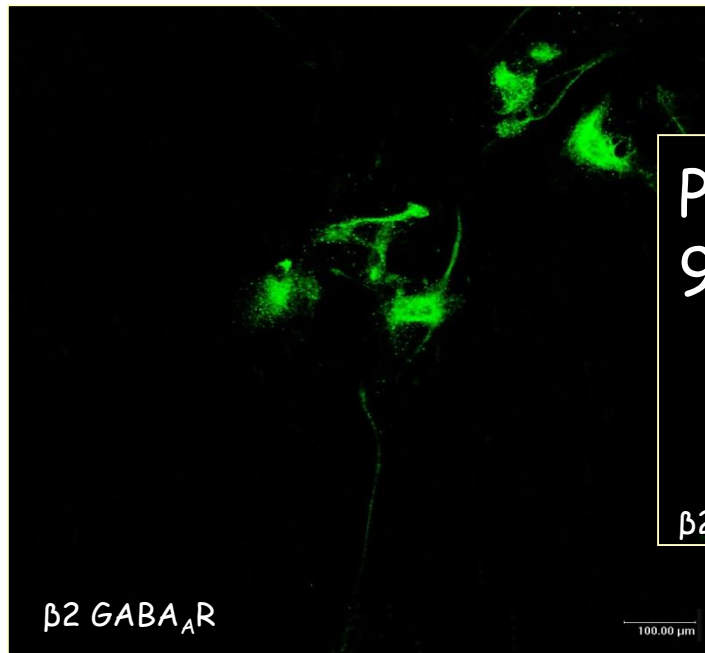
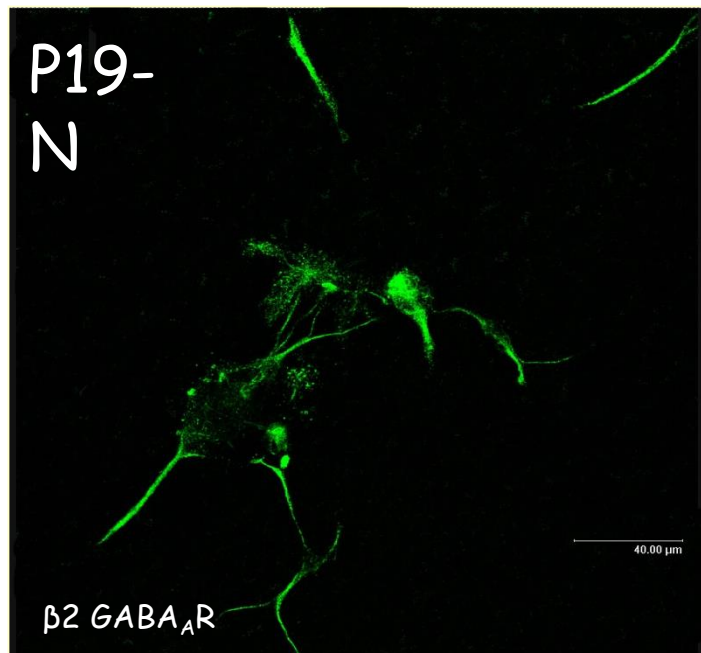
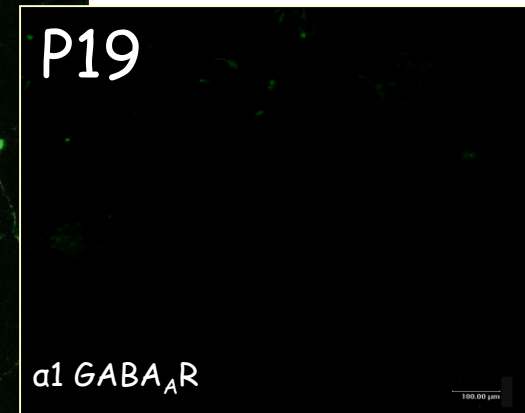
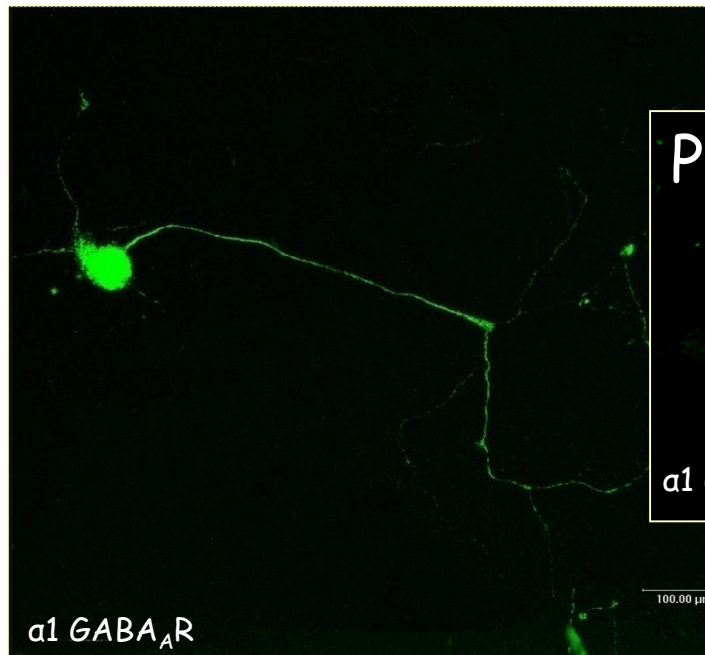
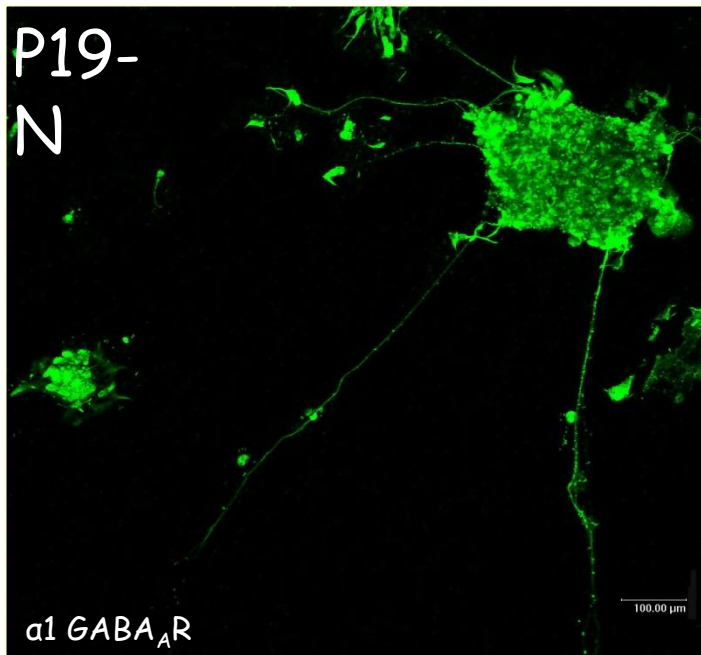




□ Οι γονιδιακές επιδράσεις των νευροστεροειδών εξαρτώνται από την ύπαρξη λειτουργικών υποδοχέων  $GABA_A$ :

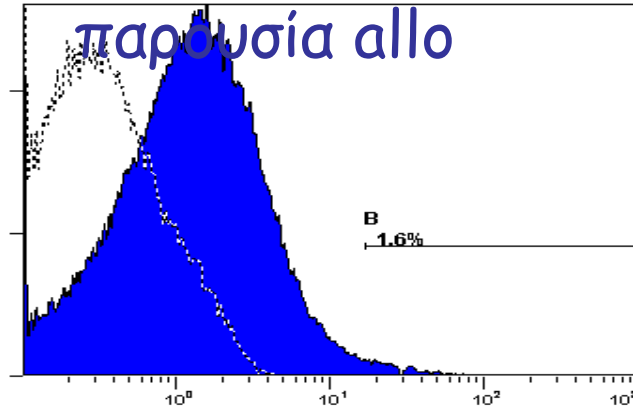


□ Έκφραση των υποδοχέων  $GABA_A$  στα P19 κύτταρα (πρωτεΐνες)

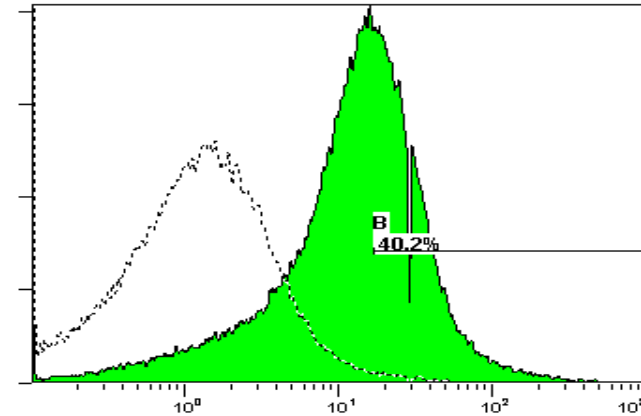


□ Η αύξηση της έκφρασης των mRNA των υπομονάδων  $\alpha 1$  και  $\beta 2$  του υποδοχέα  $GABA_A$  συνοδεύεται και από αύξηση της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών ;

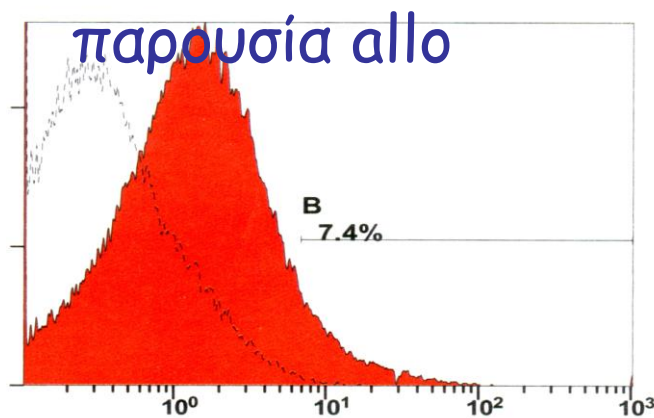
υπομονάδα  $\alpha 1$  (μάρτυρας)



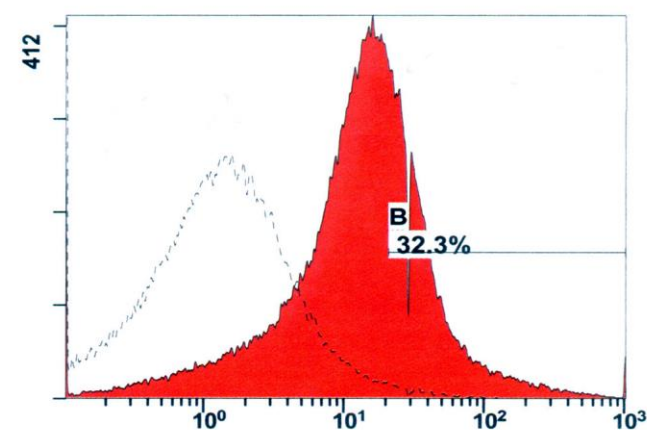
υπομονάδα  $\alpha 1$



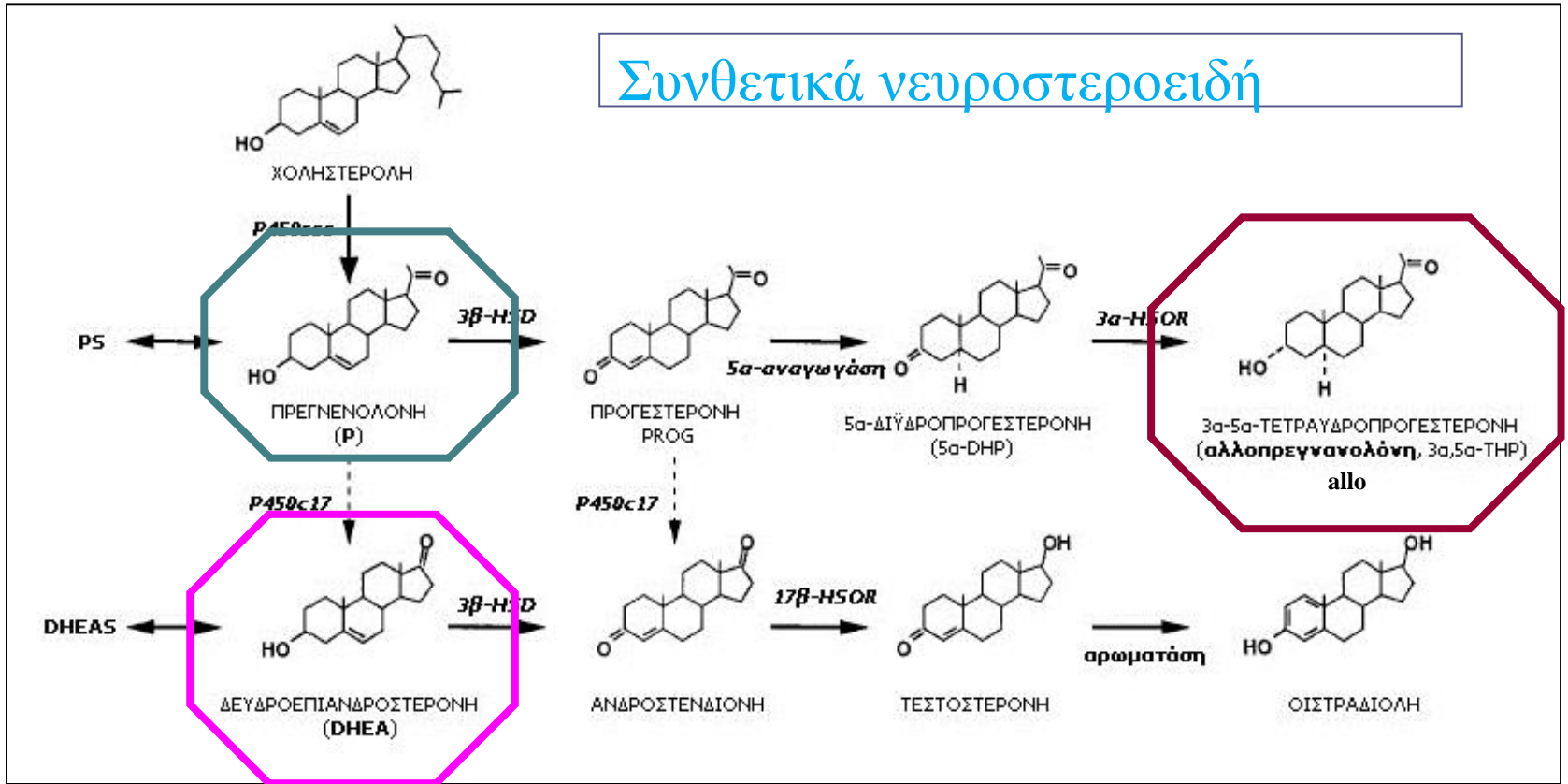
υπομονάδα  $\beta 2$  (μάρτυρας)



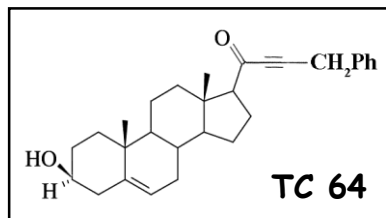
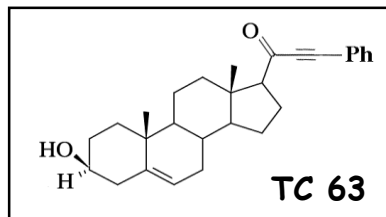
υπομονάδα  $\beta 2$



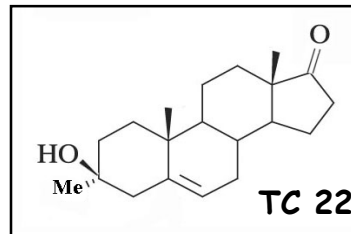
# Συνθετικά νευροστεροειδή



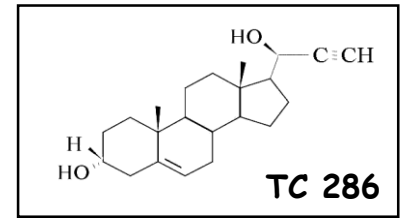
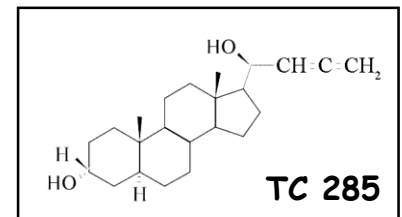
## ανάλογα πρεγνενολόνης

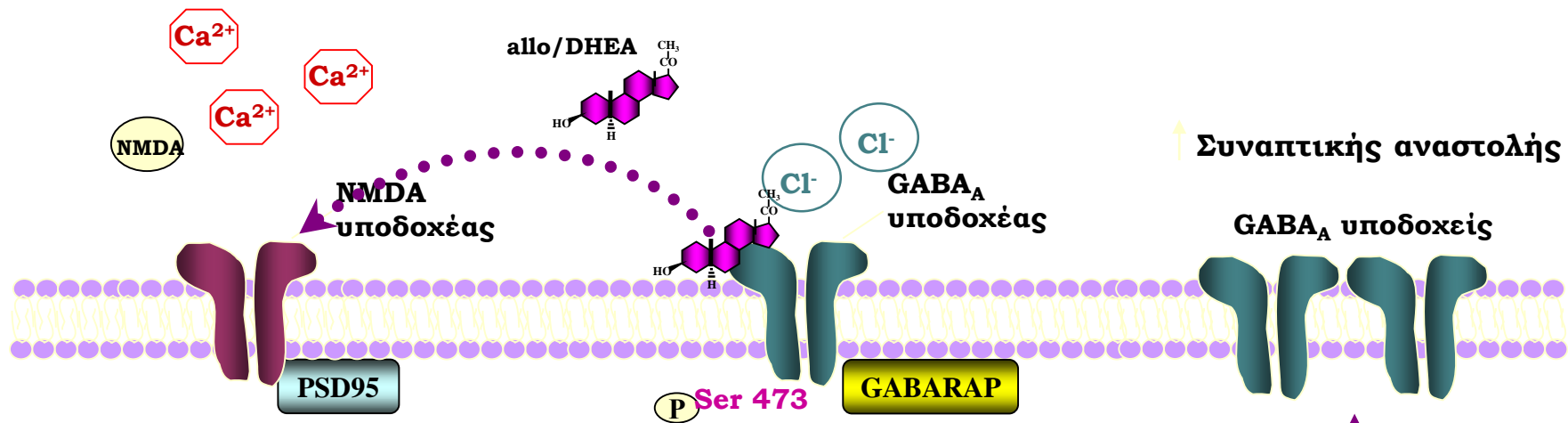


## ανάλογο DHEA



## ανάλογα allo



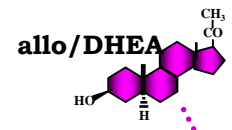
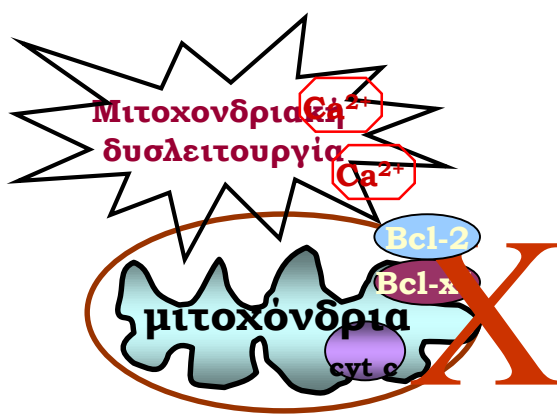


↑ Συναπτικής αναστολής

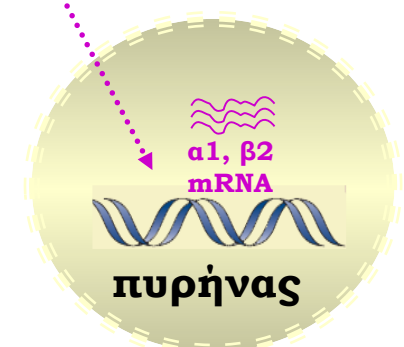
X

↑ Συναπτικής αναστολής

α1, β2 πρωτεΐνες υποδοχέα GABA<sub>A</sub>



Κυτταρική επιβίωση



Κυτταρικός θάνατος

X

κυτταρόπλασμα



# Συμπεράσματα

- τα νευροστεροειδή επάγουν μια πληθώρα αλληλοσυνδεόμενων κυτταρικών λειτουργιών που επηρεάζουν τη νευρωνική λειτουργία.
- σε ένα *in vitro* σύστημα όπου συνυπάρχουν λειτουργικοί υποδοχείς GABA<sub>A</sub> και NMDA, η δράση των νευροστεροειδών απαιτεί α1, β2, NR1 υπομονάδες και είναι διπλή: μια άμεση, που μεσολαβείται από την κινάση Akt και μια έμμεση, που αφορά στην επιλεκτική αύξηση μεταγράφων του υποδοχέα GABA<sub>A</sub>. Έτσι, τα νευροστεροειδή μέσω ενεργοποίησης του PI3K→Akt μονοπατιού και παρεμβολής στο ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι, αναστέλλουν την απόπτωση νευρικών κυττάρων που προκαλεί η αυξημένη ενεργοποίηση των υποδοχέων NMDA και ταυτόχρονα, προκαλούν ενίσχυση της GABA<sub>A</sub>-εργικής αναστολής μέσω επαγωγής της έκφρασης μεταγράφων και πρωτεϊνικών υπομονάδων του υποδοχέα GABA<sub>A</sub>, γεγονός που μεταβάλλει την πλαστικότητα του υποδοχέα και πιθανόν οδηγεί σε αυξημένο αριθμό υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη.
- η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Akt μέσω της φωσφορυλίωσης του υποδοχέα GABA<sub>A</sub>, ή από έναν διακριτό υποδοχέα για τα νευροστεροειδή, ή κατά την απ' ευθείας αλληλεπίδραση των νευροστεροειδών με τη λιπιδική κυτταρική μεμβράνη (ως κλασσικά στεροειδή), μπορεί να ενεργοποιήσει έναν καταρράκτη αντιδράσεων με αποτέλεσμα την κυτταρική επιβίωση, μέσω ανεξάρτητων από τη μεταγραφή γεγονότων, αλλά και την τροποποίηση της νευρωνικής λειτουργίας, μέσω μηχανισμών εξαρτώμενων από τη μεταγραφή.

# Σημαντικά Αντιδραστήρια

**N-methyl-D-aspartic acid (NMDA, N-μέθυλο-D-ασπαρτικό οξύ):** αγωνιστής του υποδοχέα NMDA

**L-Glutamic acid (L-Glu, Γλουταμινικό οξύ):** αγωνιστής των γλουταμινεργικών υποδοχέων

**DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5, DL-2-άμινο-5-φωσφοπεντανοϊκό οξύ):** ειδικός ανταγωνιστής των υποδοχέων NMDA

**Bicuculline (Μπικουκουλίνη):** ειδικός ανταγωνιστής του υποδοχέα GABA<sub>A</sub>

**Wortmannin:** ειδικός αναστολέας της PI3-K

**Cytosine β-D-Arabinofuranoside (Ara C, β-D-αραβινοφουρανοσιδική κυτοσίνη):** μιτωτικός αναστολέας που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των αστροκυττάρων-γλοιοκυττάρων από τις νευρικές καλλιέργειες

**5-Fluoro-2-deoxyuridine (FrdU, 5-φλουορο-2-δεοξουριδίνη):** μιτωτικός αναστολέας που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των γλοιοκυττάρων από τις νευρικές καλλιέργειες

**Uridine (Οουριδίνη, Urd):** μιτωτικός αναστολέας που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των γλοιοκυττάρων από τις νευρικές καλλιέργειες

# Βιβλιογραφία

- ▣ Andrews, P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C., and Fogh, J. (1984). Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation *in vivo* and *in vitro*. Lab. Invest. 50, 147–162.
- ▣ Andrews, P.W., Casper, J., Damjanov, I., Duggan-Keen, M., Giwercman, A., Hata, J., von Keitz, A., Looijenga, L.H., Millan, J.L., Oosterhuis, J.W., Pera, M., Sawada, M., Schmoll, H.J., Skakkebaek, N.E., van Putten, W., and Stern, P. (1996). Comparative analysis of cell surface antigens expressed by cell lines derived from human germ cell tumours. Int. J. Cancer. 66, 806–816.
- ▣ Andrews, P.W. (1998). Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. APMIS. 106, 158–167.
- ▣ Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. Nature Rev Cancer 2002;2:315–319.
- ▣ Skerjanc IS. Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells. Trends Cardiovasc Med 1999;9:139–143.
- ▣ MacPherson, P. A., Jones, S., Pawson, P. A., Marshall, K. C. and McBurney, M. W. (1997). "P19 cells differentiate into glutamatergic and glutamate-responsive neurons *in vitro*." Neuroscience 80(2): 487-99.
- ▣ Magnuson, D. S., Morassutti, D. J., McBurney, M. W. and Marshall, K. C. (1995). "Neurons derived from P19 embryonal carcinoma cells develop responses to excitatory and inhibitory neurotransmitters." Brain Res Dev Brain Res 90(1-2): 141-50.
- ▣ McBurney, M. W., Reuhl, K. R., Ally, A. I., Nasipuri, S., Bell, J. C. and Craig, J. (1988). "Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture." J Neurosci 8(3): 1063-73.
- ▣ McBurney, M. W. (1993). "P19 embryonal carcinoma cells." Int J Dev Biol 37(1): 135-40.



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αρχές Φυσιολογίας, 2η έκδοση. Berne RM and Levy MN, 1996. Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης Ηλίας Κούβελας. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης 1999.
2. Fundamentals of Anatomy and Physiology, 5<sup>th</sup> edition. Frederic H. Martini 2001. Prentice-Hall Inc.
3. Σύγχρονη Ενδοκρινολογία. Μ. Μπατρίνος 1999. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης
4. Φυσιολογία του Ανθρώπου και Μηχανισμοί των νόσων. Guyton and Hall. Επιμέλεια Ελληνικής Έκδοσης Α. Ευαγγέλου. Επιστημονικές Εκδόσεις Γρ. Παρισιάνος
5. Endocrinology: An Integrated Approach. Nussey, S.S. and Whitehead, S.A. Oxford, UK: [BIOS Scientific Publishers, Ltd](#) 2001.