



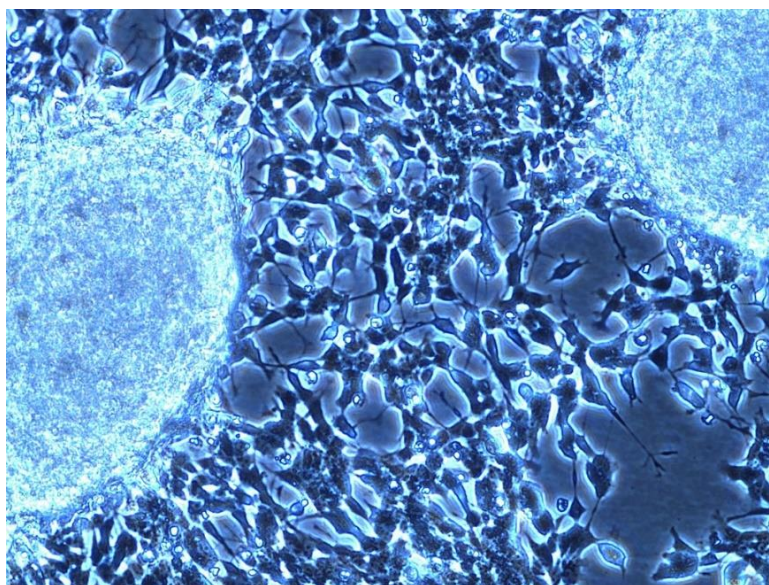
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Διερεύνηση της υποκυτταρικής εντόπισης των υποδοχέων οιστρογόνων κατά τη διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος SH-SY5Y”

“Investigation of the subcellular localization of estrogen receptors during neuroblastoma SH-SY5Y cell differentiation”



Ονοματεπώνυμο: Ζωγραφάκη Ειρήνη Μαρία του Γεωργίου

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ψαρρά Άννα-Μαρία

Συνεπιβλέποντες καθηγητές: Λεωνίδας Δημήτριος, Σκαμνάκη Βασιλική

Λάρισα 2024

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

Υπεύθυνη καθηγήτρια: Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία

Τριμελής επιτροπή:

- **Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- **Λεωνίδας Δημήτριος**, Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- **Σκαμνάκη Βασιλική**, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας- Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	σελ.5
Abstract.....	σελ.7
1. Εισαγωγή.....	σελ.9
1.1. Υποδοχείς πυρηνικών ορμονών.....	σελ.9
1.2. Υποδοχείς οιστρογόνων.....	σελ.10
1.3. Οιστρογόνα.....	σελ.11
1.4. Ο ρόλος του ERα στη διαφοροποίηση και λειτουργία των νευρικών κυττάρων.....	σελ.14
1.5. Ο ρόλος του ERβ στη διαφοροποίηση και λειτουργία των νευρικών κυττάρων.....	σελ.15
1.6. Ρόλος των μιτοχονδρίων σε σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου.....	σελ.17
1.7. Ρόλος μιτοχονδρίων στη διαφοροποίηση.....	σελ.18
1.8. Μιτοχονδριακή εντόπιση των υποδοχέων οιστρογόνων (mtERα & mtERβ).....	σελ.18
1.9. Διαφοροποίηση νευρικών κυττάρων SH-SY5Y.....	σελ.19
2. Πειραματικό μέρος.....	σελ.21
2.1. Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	σελ.21
2.1.1 Οργανολογία.....	σελ.21
2.1.2 Αναλώσιμα & Εταιρείες.....	σελ.21
2.1.3 Διαλύματα.....	σελ.22
2.1.4 Χημικές ουσίες & Θρεπτικά μέσα.....	σελ.23
2.1.5 Αντισώματα.....	σελ.23

2.2. Τεχνικές.....	σελ.24
2.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες SH-SY5Y: Δημιουργία δειγμάτων.....	σελ.24
2.2.2 Ανοσοκυτταροχημεία.....	σελ.27
2.2.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	σελ.28
2.3. Αποτελέσματα.....	σελ.34
2.3.1 Έλεγχος υποκυτταρικής μετατόπισης του ERβ σε σύστημα διαφοροποιημένων κυττάρων SH-SY5Y.....	σελ.34
2.3.2 Έλεγχος μεταβολής πρωτεϊνικών επιπέδων ERα σε σύστημα διαφοροποιημένων κυττάρων SH-SY5Y παρουσία και απουσία στεροειδών ορμονών.....	σελ.38
3. Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	σελ.40
<i>Ευχαριστίες.....</i>	<i>σελ.44</i>
4. Βιβλιογραφία.....	σελ.45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen receptors: ERs) ανήκουν στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (Nuclear receptors: NRs) και φαίνεται να έχουν ένα θεμελιώδη ρόλο στη διαμεσολάβηση των επιδράσεων των οιστρογόνων σε διάφορους ιστούς σε όλο το σώμα, δρώντας ως μεταγραφικοί παράγοντες. Οι ιστοί στους οποίους εμφανίζουν σημαντική δράση είναι αυτοί του αναπαραγωγικού, καρδιαγγειακού, μυϊκού, οστικού και νευρικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα για το νευρικό ιστό, υπάρχει μεγάλος αριθμός ερευνών που δείχνει τη σημαντικότητα της λειτουργίας των υποδοχέων αφενός κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων και αφετέρου στη νευροπροστασία και τη γνωστική λειτουργία.

Αναλυτικότερα, οι υποδοχείς οιστρογόνων διακρίνονται στους τύπους άλφα και βήτα (Estrogen receptor alpha: ER α , Estrogen receptor beta: ER β), οι οποίοι εμφανίζουν διαφορετικό εντοπισμό και πρωτεϊνικά επίπεδα στους ιστούς που δραστηριοποιούνται, αλλά και διαφορετική επίδραση σε επίπεδο κυττάρου. Η ενεργοποίησή τους επιτυγχάνεται με την πρόσδεση των οιστρογόνων και πιο συγκεκριμένα και με την πρόσδεση της στεροειδούς ορμόνης, 17 β -οιστραδιόλη (E2), που φαίνεται να αποτελεί την πιο δραστική μορφή. Οι επιδράσεις των οιστρογόνων, στις οποίες διαμεσολαβούν οι υποδοχείς, αφορούν γονιδιακές και μη γονιδιακές αποκρίσεις. Στην πρώτη περίπτωση, οι υποδοχείς βρίσκονται ανενεργοί στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς (chaperones) και με την πρόσδεση των οιστρογόνων μετατοπίζονται είτε στον πυρήνα είτε στα μιτοχόνδρια ρυθμίζοντας, έτσι, τη γονιδιακή έκφραση πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων. Παράλληλα εμφανίζουν καίριο ρόλο στη ρύθμιση του μιτοχονδριακού μεταβολισμού και μορφολογίας. Στη δεύτερη περίπτωση, οι υποδοχείς βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη σηματοδοτώντας μη γονιδιακές αποκρίσεις κυρίως μέσω σύζευξης, άμεσα ή έμμεσα, με G πρωτεΐνες. Στην παρούσα έρευνα με σκοπό τη διερεύνηση της υποκυτταρικής εντόπισης των υποδοχέων οιστρογόνων κατά τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν μελέτες ελέγχου μεταβολών στην υποκυτταρική εντόπιση και των επιπέδων των υποδοχέων σε κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y κατά τη διαφοροποίησή τους με την προσθήκη ρετινοϊκού οξέος, καθώς και την παρουσία ή απουσία στεροειδών ορμονών.

Τα κύτταρα SH-SY5Y ως μη διαφοροποιημένα παρουσιάζονται μικρά και στρογγυλεμένα με μια μορφολογία νευροβλάστης και, παράλληλα, έχουν την ικανότητα συνεχούς πολλαπλασιασμού σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Τα SH-SY5Y μπορούν να διαφοροποιηθούν σε νευρικά με την προσθήκη ρετινοϊκού οξέος (RA) και νευροτροφινών παρουσιάζοντας μια μορφολογία όμοια με τους πρωτογενείς νευρώνες και, συνάμα, εκφράζοντας ειδικούς δείκτες διαφοροποίησης, όπως για παράδειγμα τη βήτα III-τουμπουλίνη (Tuj-1: Neuron-specific class III beta-tubulin).

Για την επιτέλεση αυτής της ερευνητικής εργασίας πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη κυττάρων της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y σε πιάτα καλλιέργειας έξι πηγαδιών (6-well culture plate) παρουσία και απουσία οιστραδιόλης (E2) ή/και ρετινοϊκού οξέος για την επίτευξη διαφοροποίησης των κυττάρων. Ακολούθησε εφαρμογή ανοσοκυτταροχημείας και ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση ειδικών αντισωμάτων και κατάλληλων φθορίζοντων ιχνηθετών. Τα αποτελέσματα έδειξαν την εντόπιση του ER β στα μιτοχόνδρια, η οποία υπερίσχυε της εντόπισης του υποδοχέα στα άλλα υποκυτταρικά διαμερίσματα και δεν μεταβλήθηκε κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης, υποδηλώνοντας τη σημαντικότητά της εντόπισης αυτής και κατά τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων.

Κατά τον έλεγχο της πιθανής μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων σε σύστημα διαφοροποιημένων και μη κυττάρων παρουσία και απουσία στεροειδών ορμονών, συγκεκριμένα του

συνθετικού γλυκοκορτικοειδούς δεξαμεθαζόνη (DEX), της οιστραδιόλης (E2) και ενός εξειδικευμένου αγωνιστή του ERβ ονόματι διαρυλοπροπιονιτρίλιο (DPN), η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ανοσοαποτύπωση κατά Western. Εκτενέστερα, μέσω της τεχνικής αυτής ελέγχθηκε η πιθανή μεταβολή των επιπέδων του υποδοχέα οιστρογόνων άλφα και του ειδικού δείκτη διαφοροποίησης βήτα III-τουμπουλίνη (Tuj-1: Neuron-specific class III beta-tubulin), ώστε να υπάρχει επιπρόσθετη βεβαίωση, πέραν της αλλαγής στη μορφολογία τους, πως τα κύτταρα έχουν διαφοροποιηθεί. Τα αποτελέσματα αυτού του πειραματικού σκέλους έδειξαν πως απουσία στεροειδών ορμονών δεν υφίσταται μεταβολή στα επίπεδα του υποδοχέα κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων στο χρονικό διάστημα που μελετήθηκε. Όμως, παρουσία των E2 και DPN, στις πειραματικές συνθήκες διαφοροποίησης των SH-SY5Y (6 ημέρες παρουσία του παράγοντα διαφοροποίησης), τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα αυξάνονται σε ποσοστό 20% και 40% αντίστοιχα. Αυτή η μεταβολή μπορεί είτε να οφείλεται σε απ' ευθείας δράση των ορμονών είτε στη έμμεση ενεργοποίηση ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα. Όσον αφορά τον παράγοντα διαφοροποίησης Tuj-1, τα επίπεδα του αυξήθηκαν κατά τη διαδικασία επαγωγής διαφοροποίησης, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή διαφοροποίηση των SH-SY5Y κυττάρων. Επίσης, με την προσθήκη E2 και DPN τα επίπεδα Tuj-1 αυξήθηκαν κατά 30% και 70%, αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας τη σημαντικότητα τόσο των οιστρογόνων όσο και των ER, κατά τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων.

ABSTRACT

Estrogen receptors (ERs) are part of the nuclear receptor (NRs) superfamily and play a crucial role in mediating estrogen effects across various tissues throughout the body, functioning as transcription factors. Their action is particularly significant in the reproductive, cardiovascular, muscular, skeletal, and nervous systems. Regarding the nervous system, extensive research highlights the pivotal role of ERs in both neuronal differentiation and neuroprotection, as well as their influence on cognitive function.

In further detail, estrogen receptors are classified into two types: alpha (ER α) and beta (ER β), which present different localization and protein levels in the tissues they are active in, but also different effect at cell level. Their activation is achieved by the binding of the estrogen, particularly the steroid hormone 17 β -estradiol (E2), which is considered the most potent form. The effects mediated by these receptors encompass both genomic and non-genomic responses. As for the genomic pathway, receptors are initially inactive in the cytoplasm, protein-bounded with chaperones, and by the binding of estradiol they are translocated either to the nucleus or the mitochondria, thereby regulating the expression of nuclear and mitochondrial genes. Concurrently, they have a crucial role in the regulation of mitochondrial metabolism and morphology. In non-genomic responses, receptors are located on the plasma membrane, where they mediate signaling through direct or indirect coupling with G proteins. The presented study with the aim of the investigation of the subcellular localization of estrogen receptors during the differentiation of the neuronal cells, also examined the potential changes of the subcellular localization and their protein levels in differentiated SH-SY5Y cells in the presence of retinoic acid and the absence of steroid hormones.

The SH-SY5Y cells in their undifferentiated state, are small and rounded with a neuroblast morphology and, at the same time, have the ability to continuously multiply in a suitable nutrient medium. The SH-SY5Y can be differentiated into neural by the addition of retinoic acid (RA) and neurotrophins and then they appear morphologically similar to primary neurons while, also, expressing specific markers of differentiation, such as the Neuron-specific class III beta-tubulin (Tuj-1).

In order to conduct this specific research, the SH-SY5Y cell line was developed into six-well culture plates in the presence or the absence of estradiol (E2) or/ and retinoic acid (RA), thus the cells could differentiate. The next step was the performance of immunocytochemistry by using specific antibodies and proper fluorescent tags. The results showed the localization of ER β in the mitochondria without the translocation to some other subcellular compartment, indicating its significance within the mitochondrion during the early stages of neuronal cell differentiation.

Following with the assessment of potential changes in the protein levels of the receptors in both differentiated and undifferentiated cells, in the presence and absence of steroid hormones, the technique used was Western blotting. The steroid hormones included a synthetic glucocorticoid, dexamethasone (DEX), estradiol (E2), and a selective ER β agonist, diarylpropionitrile (DPN). More specific, this technique was used to examine potential changes in the levels of estrogen receptor alpha and the Neuron-specific marker beta III-tubulin (Tuj-1), to provide additional assurance about the cell's differentiation. The absence of the steroid hormones during cell differentiation did not result to changes in receptor levels over the studied period. However, in the presence of E2 and DPN, in the differentiated SH-SY5Y cells, the protein levels of ER α increased by 20% and 40%, respectively. This alteration may result either from the direct action of hormones or from the indirect activation of a signaling pathway that modulates the protein levels of ER α . In contrast, the levels of Tuj-1 in differentiated cells with the addition of E2 and DPN appeared to increase by 30% and 70%,

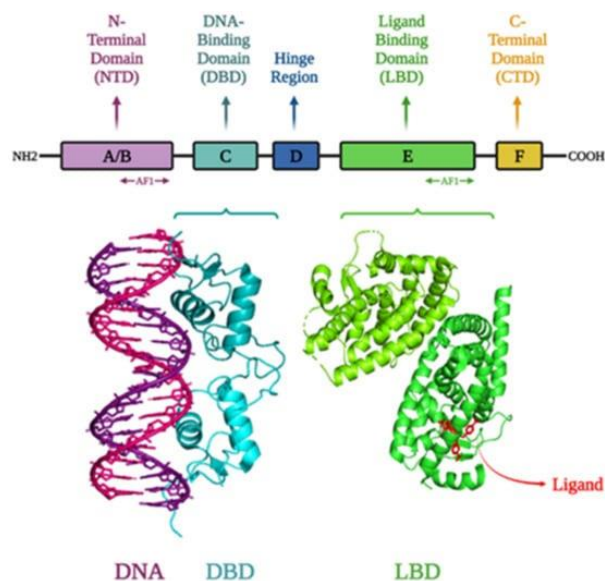
respectively, underscoring the significance of both estrogens and ERs, as DPN activates ER β , during neuronal cell differentiation.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Υποδοχείς πυρηνικών ορμονών

Η υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (Nuclear receptors: NRs) αποτελείται από μεταγραφικούς παράγοντες (Transcription factors: TFs) που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μια σειρά βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού, της αναπαραγωγής, της διαφοροποίησης και της φλεγμονής. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 48 μέλη της οικογένειας αναφορικά με το γονιδίωμα του ανθρώπου. Οι περισσότεροι NRs ρυθμίζονται ενδογενώς από μικρούς λιπόφιλους προσδέτες όπως τα στεροειδή, τα ρετινοειδή και τα φωσφολιπίδια, αλλά αυτή η οικογένεια πρωτεϊνών περιέχει επίσης "ορφανά" μέλη για τα οποία δεν έχει ακόμη εντοπιστεί προσδέτης. Επίσης, η δράση των πυρηνικών υποδοχέων ρυθμίζεται και μέσω της αλληλεπίδρασής τους με άλλα ρυθμιστικά πρωτεϊνικά μόρια (συν-ρυθμιστές). Η σύνδεση με τον προσδέτη προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του υποδοχέα, ο οποίος με τη σειρά του δεσμεύεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA των γονιδίων στόχων. Μόλις πραγματοποιηθεί η δέσμευση, οι πρωτεΐνες συν-ενεργοποιητές, όπως οι αναδιαμορφωτές της χρωματίνης και ο γενικός μηχανισμός της μεταγραφής επιστρατεύονται στο DNA για να ενεργοποιήσουν την έκφραση γονιδίων στόχων. Σε αντιδιαστολή έρχεται η δέσμευση συν-καταστολέων, η οποία συμβαίνει όταν ο υποδοχέας δεν έχει δεσμεύσει τον προσδέτη. Με αυτή την αλληλεπίδραση επιτυγχάνεται η καταστολή της εκάστοτε γονιδιακής έκφρασης που ρυθμίζεται από τους συγκεκριμένους υποδοχείς. ^[1, 2]

Οι πυρηνικοί υποδοχείς διακρίνονται σε 7 υποοικογένειες. Η υποοικογένεια 3 αφορά τους υποδοχείς στεροειδών (Steroid Receptors: SRs), στους οποίους και συγκαταλέγονται οι υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors: ERs). Αναφορικά με τη δομή των πυρηνικών υποδοχέων, αυτή χωρίζεται σε ένα σύστημα πέντε τομέων: A-E αν και μερικοί εμφανίζουν και μία έξτρα περιοχή, την F. Ο τομέας A/B περιλαμβάνει την αμινοτελική περιοχή (N-terminal domain: NTD), η οποία στερείται σταθερή/διαταγμένη τρισδιάστατη δομή. Ο υποδοχέας μέσω αυτής αλληλεπιδρά με μια ποικιλία συν-ρυθμιστών με τρόπο ειδικό για τα κύτταρα και τον υποκινητή των γονιδίων στόχων.^[1, 2] Επιπλέον, η NTD είναι στόχος για πολυάριθμες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορλίωσης, της σουμοϋλίωσης και της ακετυλίωσης. Αυτές οι τροποποιήσεις έχουν ποικίλα αποτελέσματα, τόσο ενεργοποιώντας όσο και καταστέλλοντας τη μεταγραφή.^[3] Επιπροσθέτως, εκεί έγκειται και η περιοχή Activation Function-1 (AF-1), η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων χωρίς τη δέσμευση ορμόνης. Περνώντας στον τομέα C, παρατηρείται η περιοχή πρόσδεσης του DNA (DNA binding domain: DBD), η οποία εμφανίζεται ως η πιο συντηρημένη από όλες τις περιοχές των πυρηνικών υποδοχέων. Η DBD έχει δύο υποπεριοχές, που η κάθε μία περιέχει τέσσερα υπολείμματα κυστεΐνης που συντονίζουν ένα ιόν ψευδαργύρου (Zn^{++}) για να δημιουργήσουν το κανονικό μοτίβο δακτύλου ψευδαργύρου που παρουσιάζει τη δυνατότητα δέσμευσης του DNA. Ακολούθως, ο τομέας D αφορά την περιοχή άρθρωσης (Hinge Region), η οποία είναι ένας μικρού μήκους και ευέλικτος συνδέτης μεταξύ των DBD και



Εικόνα 1: Απεικόνιση των δομικών και λειτουργικών τομέων των πυρηνικών υποδοχέων.^[4]

LBD. Τέλος, ο τομέας E αναφέρεται στην περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (Ligand binding domain: LBD). Η LBD είναι ένας σύνθετος αλλοστερικός τομέας σηματοδότησης που όχι μόνο δεσμεύει τον προσδέτη αλλά αλληλεπιδρά, επίσης, άμεσα με πρωτεΐνες συν-ρυθμιστές. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της περιοχής Activation Function-2 (AF-2), η οποία σε αντίθεση με την AF-1, είναι ορμονοεξαρτώμενη.^[1, 2]

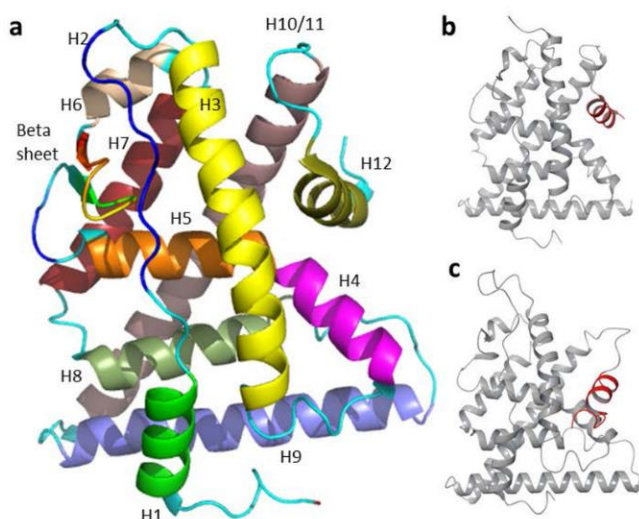
1.2 Υποδοχείς οιστρογόνων

Οι υποδοχείς οιστρογόνων ανήκουν στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και φαίνεται να έχουν έναν θεμελιώδη ρόλο στη διαμεσολάβηση των επιδράσεων των οιστρογόνων σε διάφορους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού. Οι υποδοχείς οιστρογόνων, εμφανίζονται σε δύο τύπους, τους άλφα και βήτα, με διαφορετικό εντοπισμό και πρωτεϊνικά επίπεδα στους ιστούς που δραστηριοποιούνται, αλλά και με διαφορετική επίδραση σε επίπεδο κυττάρου. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα ο υποδοχέας οιστρογόνων άλφα (Estrogen receptor alpha: ERα) χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 6: 6q25.1-q25.2 και ο υποδοχέας οιστρογόνων βήτα (Estrogen receptor beta: ERβ) στο χρωμόσωμα 14: 14q23.2-q23. Η ενεργοποίησή τους επιτυγχάνεται με την πρόσδεση των οιστρογόνων με την 17β-οιστραδιόλη (E2) να φαίνεται να είναι η πιο δραστική μορφή εξ' αυτών.^[5, 15, 16]

Αν και η δράση τους είναι κυρίως πυρηνική, η εντόπισή τους έγκειται και σε άλλα υποκυτταρικά διαμερίσματα όπως το κυτταρόπλασμα, το μιτοχόνδριο και σε μικρότερη συχνότητα στην πλασματική μεμβράνη, όπου σηματοδοτούν μη γονιδιακές αποκρίσεις κυρίως μέσω σύζευξης, άμεσα ή έμμεσα, με G πρωτεΐνες.^[9] Οι μη γονιδιακές αποκρίσεις επιτυγχάνονται μέσα σε λίγα λεπτά καθότι πραγματοποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων που οδηγούν στην ενεργοποίηση διαφόρων καταρρακτών σηματοδότησης. Επίσης, σε ορισμένους τύπους κυττάρων παρατηρείται εντόπιση των ERs στον πυρήνα, οι οποίοι παραμένουν ανενεργοί απουσία ορμόνης. Όσον αφορά αυτούς που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα παρουσιάζονται ανενεργοί, συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς (chaperones) και με την πρόσδεση των οιστρογόνων μετατοπίζονται είτε στον πυρήνα είτε στα μιτοχόνδρια.^[7, 8] Σε αμφότερες τις περιπτώσεις δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες σηματοδοτώντας

γονιδιακές αποκρίσεις, εν αντιθέτως από τις μη γονιδιακές, ως μια πιο αργή διαδικασία. Παράλληλα εμφανίζουν ρόλο στη ρύθμιση του μιτοχονδριακού μεταβολισμού και μορφολογίας.^[10]

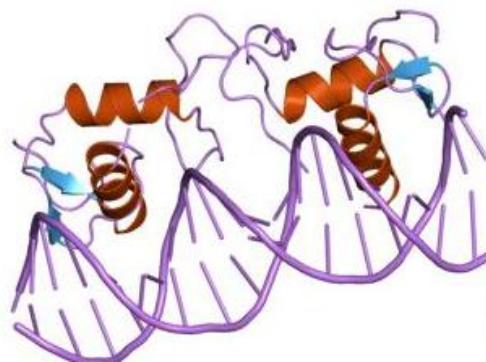
Πιο αναλυτικά, η πρόσδεση της οιστραδιόλης λαμβάνει χώρα στην περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (LBD) έχοντας ως αποτέλεσμα την μετακίνηση της έλικας 12 (H12→ AF-2) και μετέπειτα την έκθεση του θύλακα δέσμευσης του προσδέτη (ligand-binding pocket). Έτσι, η H12 αποτελεί μέρος μιας νέας επιφάνειας που διευκολύνει τις αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες συν-ενεργοποίησης. Την ίδια στιγμή λαμβάνει



Εικόνα 2: Απεικόνιση της LBD του υποδοχέα οιστρογόνων. a: Η περιοχή αποτελείται από 12 α-έλικες (χρωματισμένες με διαφορετικά χρώματα για λόγους σαφήνειας) και ένα βήτα φύλλο/φουρκέτα, b: Ενεργή απεικόνιση του υποδοχέα, c: Ανενεργή απεικόνιση του υποδοχέα. Η κύρια διαφορά μεταξύ b και c έγκειται στη διαμόρφωση της H12, που επισημαίνεται με κόκκινο χρώμα.^[12]

μέρος και ο διμερισμός του υποδοχέα, γεγονός κρίσιμο για την επιτυχημένη πρόσδεση στο DNA των γονιδίων στόχων.^[6, 11]

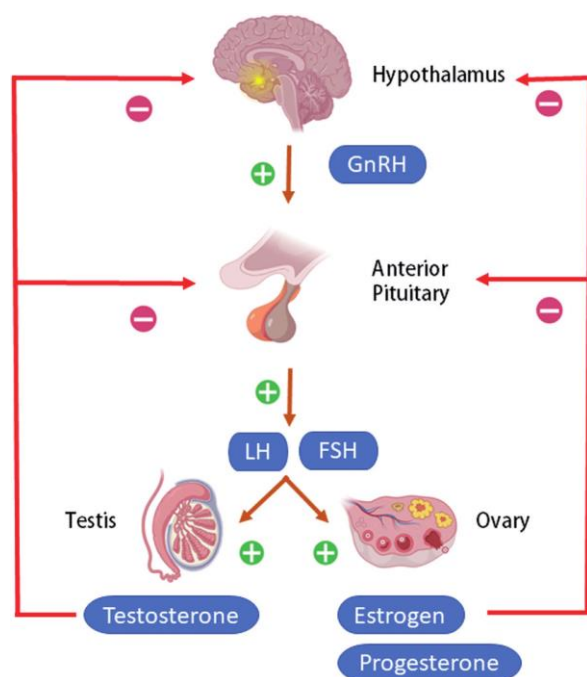
Η κατάσταση αυτή επιτυγχάνεται, πάλι, μέσω της LBD. Πιο εκτενώς, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ελίκων 10/11 είναι ζωτικής σημασίας, καθώς αποτελούν τη βασική διεπαφή μεταξύ των δύο LBD για τη σταθεροποίηση της δομής του διμερούς. Ακόμα, η έλικα 12 φαίνεται να έχει έναν έμμεσο ρόλο και σε αυτή τη διαδικασία. Μολονότι ο διμερισμός των υποδοχέων πραγματοποιείται μέσω της LBD, έρευνες έχουν δείξει την εμφάνιση ιδιαίτερης μεταβλητότητας σε μέγεθος και αλληλουχία (56% ταύτιση) μεταξύ των ERα και ERβ, συμβάλλοντας έτσι, στις διαφορές στις μεταγραφικές τους δραστηριότητες. Εξίσου, όμως, σημαντική περιοχή για τη μεταγραφική τους λειτουργία είναι η DBD. Η αμινοξική ταύτιση των δύο ισομορφών για την συγκεκριμένη περιοχή ισούται περίπου με 97%, πράγμα που υποδεικνύει ότι οι υποδοχείς θα αλληλεπιδρούν με το DNA στόχο με παρόμοια ειδικότητα και συγγένεια. Ακριβέστερα, το σημείο του γονιδιώματος με το οποίο η DBD αλληλεπιδρά ονομάζεται στοιχείο απόκρισης οιστρογόνου (Estrogen Response Element: ERE) και συνήθως βρίσκεται στον υποκινητή των γονιδίων που ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα.^[5, 6, 13]



Εικόνα 3: Η κρυσταλλική δομή της DBD του ERα που συνδέεται μέσω των ERE στο DNA^[20]

1.3 Οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα ανήκουν στην κατηγορία των στεροειδών ορμονών με τα πιο χαρακτηριστικά να είναι η οιστρόνη, οιστραδιόλη και οιστριόλη, με την οιστραδιόλη να αποτελεί την πιο δραστική μορφή.



Εικόνα 4: Απεικόνιση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων και των βρόχων αρνητικής και θετικής ανάδρασης για τη ρύθμιση της ισορροπίας των στεροειδών ορμονών.^[19]

Τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά, η σύνθεση των οιστρογόνων λαμβάνει χώρα στις γονάδες μέσω ενζυμικής δράσης της αρωματάσης, που χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τα ανδρογόνα.^[18] Όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης, τα οιστρογόνα εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία είτε ως ελεύθερη ορμόνη είτε δεσμευμένη με άλλες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορεί να είναι η σφαιρίνη που δεσμεύει ορμόνες του φύλου (Sex hormone-binding globulin: SHBG) ή η αλβουμίνη. Η ελεύθερη ορμόνη έχει τη δυνατότητα ελεύθερης διάχυσης μέσα στα κύτταρα χωρίς να υπόκειται σε ρύθμιση. Τα επίπεδα της ορμόνης στο σώμα ρυθμίζονται από τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (Hypothalamic-pituitary-gonadal axis: HPG) εξασφαλίζοντας, έτσι, τη συνολική ορμονική ισορροπία. Πιο συγκεκριμένα, η ισορροπία διατηρείται μέσω βρόχων αρνητικής και θετικής ανάδρασης, με διάφορους εσωτερικούς και εξωτερικούς παράγοντες που επηρεάζουν το σύστημα.^[14, 18]

Έρευνες έχουν δείξει πως τα οιστρογόνα έχουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση των φυσιολογικών διεργασιών, καθώς και στη γήρανση και παθολογία, με την παράλληλη εμπλοκή τους στη λειτουργία του αναπαραγωγικού, καρδιαγγειακού, μυϊκού, οστικού και νευρικού συστήματος. Έχουν αποδειχθεί δύο κύριοι τρόποι μέσω των οποίων δρουν τα οιστρογόνα: οι γονιδιακές και οι μη γονιδιακές αποκρίσεις.^[17] Οι γονιδιακές αποκρίσεις αφορούν τη σύνδεση της οιστραδιόλης με τον υποδοχέα οιστρογόνων άλφα ή βήτα, με την επακόλουθη ενεργοποίηση του υποδοχέα και τελικά τη μεταφορά του στον πυρήνα ή το μιτοχόνδριο για τη ρύθμιση των γονιδίων στόχων. Κάποια από αυτά τα γονίδια εμπλέκονται στην κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση.

Η διαδικασία μετατόπισης του υποδοχέα στον πυρήνα επιτυγχάνεται με την αρχική σύνδεση ειδικών πρωτεϊνών, ονόματι ιμπορτίνες, σε μία συγκεκριμένη περιοχή του υποδοχέα ονόματι περιοχή πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear localization signal: NLS). Επόμενο βήμα είναι το σύμπλοκο που έχει δημιουργηθεί να οδηγηθεί προς τη μεμβράνη του πυρήνα και να συνδεθεί στο πυρηνικό σύμπλεγμα πόρων (Nuclear pore complex: NPC). Μόλις συμβεί αυτό τότε το σύμπλοκο μπορεί να εισαχθεί στον πυρήνα. Όταν ολοκληρωθεί η δράση του υποδοχέα, μία άλλη ομάδα ειδικών πρωτεϊνών, οι εξπορτίνες, αναγνωρίζουν την ειδική περιοχή εξαγωγής από τον πυρήνα (Nuclear export signals: NES) του υποδοχέα. Με τη δημιουργία αυτού του συμπλέγματος προσδένονται ξανά στο NPC και έτσι ο υποδοχέας μπορεί να απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα.^[21]

Αντίστοιχα η διαδικασία μετατόπισης του υποδοχέα προς και από το μιτοχόνδριο προτείνεται ότι επιτελείται από ειδικές πρωτεΐνες μεταφοράς. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι οι τρανσλοκάσες της εξωτερικής (TOM) και της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων (TIM). Έτσι πιθανολογείται ότι ο υποδοχέας είτε φέρει κάποια ειδική αλληλουχία που μπορεί να αναγνωρίσει η TOM είτε βρίσκεται σε σύμπλοκο με πρωτεΐνες συνοδούς, οι οποίες επίσης βοηθούν στη σωστή αναδίπλωση του υποδοχέα καθώς αυτός περνά απ' την εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Με την εκτέλεση αυτής της διαδικασίας, ο υποδοχέας στη συνέχεια συνδέεται με την TIM, ώστε να μπορέσει να διαπεράσει την εσωτερική μεμβράνη, να εισέλθει στη μήτρα του μιτοχονδρίου και να επιτελέσει τη λειτουργία του.^[22]

Πυρηνικά γονίδια ρυθμιζόμενα από τα οιστρογόνα μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων^[23-28]

Cyclin D1 (CCND1)	E-cadherin (CDH1)	Progesterone Receptor (PR)	Insulin-like growth factor 1 (IGF1)
Ρόλος στον έλεγχο της μετάβασης από τη φάση G1 στην S→ πολλαπλασιασμός & διαφοροποίηση των κυττάρων (μαστικός ιστός)	Ρόλος στη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων (μαστικός ιστός & καρκίνος)	Ρόλος στη διαφοροποίηση του αναπαραγωγικού ιστού (κυρίως μήτρα & μαστικοί αδένες)	Ρόλος στη διαφοροποίηση των μυϊκών, οστικών και νευρικών κυττάρων
B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)	SRY-Box Transcription Factor 9 (SOX9)	Wnt Family Genes (Wnt4)	FOXL2 (Forkhead Box L2)

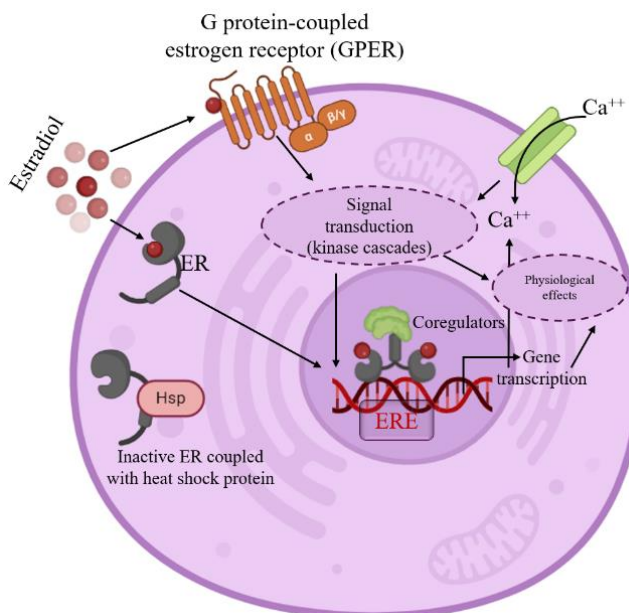
Ρόλος στην προώθηση της επιβίωσης των κυττάρων και της διαφοροποίησης ορμονοευαίσθητων ιστών (στήθος & ενδομήτριο	Ρόλος στη διαφοροποίηση χονδροκυττάρων εμπλεκόμενα στον προσδιορισμό του φύλου	Ρόλος στη διαφοροποίηση της γυναικείας αναπαραγωγικής οδού	Ρόλος στην ανάπτυξη & ωρίμανση των ωοθυλακίων
---	--	--	---

Πίνακας 1: Απεικόνιση πυρηνικών γονιδίων που ρυθμίζονται από την έκκριση της οιστραδιόλης ενεργοποιώντας τους υποδοχείς οιστρογόνων λαμβάνοντας το μονοπάτι της γονιδιακής απόκρισης.

Πυρηνικά γονίδια που ελέγχουν την έκφραση μιτοχονδριακών γονιδίων ^[29]			
TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A)		NRF1 and NRF2 (Nuclear Respiratory Factors 1 and 2)	
Ρόλος στην αντιγραφή και μεταγραφή του μιτοχονδριακού DNA		Ρόλος στη ρύθμιση της έκφρασης πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες	
mt-CYB (mitochondrial cytochrome b)	mt-ND1 (mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 1)	mt-ATP6 (ATP synthase subunit 6)	
Ρόλος στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων, συγκεκριμένα στο σύμπλεγμα III	Ρόλος στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, συγκεκριμένα σύμπλεγμα I	Ρόλος στη σύνθεση ATP και αποτελεί μέρος του συμπλέγματος V της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων	

Πίνακας 2: Απεικόνιση πυρηνικών γονιδίων που ελέγχουν την έκφραση γονιδίων που δρουν στο μιτοχόνδριο και ρυθμίζονται από την έκκριση της οιστραδιόλης ενεργοποιώντας τους υποδοχείς οιστρογόνων.

Στον αντίποδα, οι μη γονιδιακές αποκρίσεις αφορούν τη δέσμευση της οιστραδιόλης στον ER που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη συζευγμένος με G πρωτεΐνες και ενώ δεν συμμετέχει άμεσα στη γονιδιακή ρύθμιση, μπορεί να ελέγξει άλλες σημαντικές διεργασίες, όπως την ενεργοποίηση των μονοπατιών της κινάσης (Mitogen activated protein kinase: MAPK) και της 3-κινάσης φωσφατιδυλινοσιτόλης (Phosphoinositide 3-kinase: PI3K). Με την ενεργοποίηση αυτών των μονοπατιών (kinase cascades) ρυθμίζεται η διαφοροποίηση και ο κυτταρικός κύκλος αντίστοιχα.^[17] Στην παρακάτω εικόνα

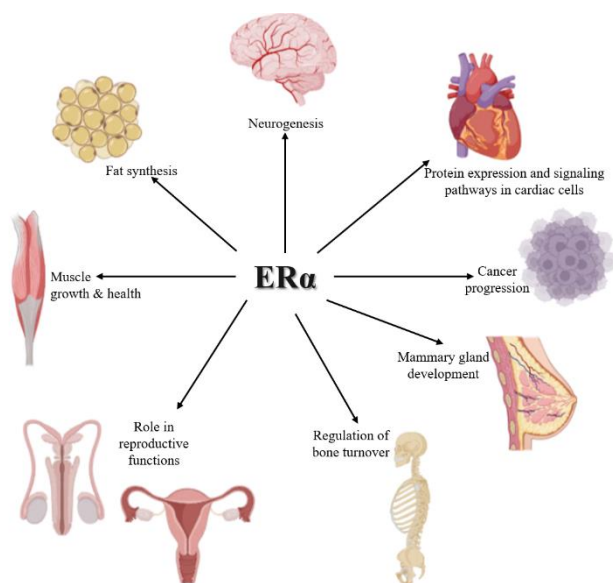


Εικόνα 5: Απεικόνιση της γονιδιακής και μη γονιδιακής απόκρισης των υποδοχέων οιστρογόνων μέσω δράσης της οιστραδιόλης. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις οι υποδοχείς ενεργοποιούνται με την σύνδεση του προσδέτη και στη συνέχεια είτε μέσω ενεργοποίησης ενός μεταγωγικού καταρράκτη είτε με την άμεση δράση τους στον πυρήνα, επιτυγχάνεται η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, με ταυτόχρονη παρατήρηση αύξησης του ενδογενούς ασβεστίου. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος BioRender.

παρουσιάζεται τόσο το μονοπάτι γονιδιακών όσο και μη γονιδιακών αποκρίσεων ως αποτέλεσμα της δράσης της οιστραδιόλης. Σε οποιεσδήποτε από τις δύο αποκρίσεις μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου που θα δράσει ως δευτερογενές μήνυμα ωθώντας τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων.

1.4 Ο ρόλος του ERα στη διαφοροποίηση και λειτουργία των νευρικών κυττάρων

Ο ERα αποτελεί ένα βασικό ρυθμιστή της κυτταρικής διαφοροποίησης σε πολλαπλούς ιστούς, επηρεάζοντας την ανάπτυξη, τη λειτουργία και την ομοιόσταση. Αναλυτικότερα, μέσω της ενεργοποίησής του είτε απ' την οιστραδιόλη είτε από τη φωσφορύλιωσή του, εμφανίζει απαραίτητη δράση για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων των ιστών όπως οι αναπαραγωγικοί, οι μαστικοί, ο οστίτης (ρύθμιση διαφοροποίησης και λειτουργίας οστεοβλαστών), ο καρδιακός-μυϊκός, ο λιπώδης καθώς και ο νευρικός.^[30-34]



Εικόνα 6: Συμμετοχή του υποδοχέα οιστρογόνων άλφα σε πολλαπλές διεργασίες του οργανισμού. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος BioRender.

Σχετικά με τη συμμετοχή του υποδοχέα στη διαφοροποίηση και λειτουργία των νευρικών κυττάρων, έρευνες δείχνουν ότι αυτός επιφέρει, επίσης, επιρροή στη νευροπροστασία και τη γνωστική λειτουργία.

Διαφοροποίηση νευρικών κυττάρων^[35]

Υπάρχει βιβλιογραφία που υποστηρίζει πως γονίδια που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση ποικίλων τύπων κυττάρων, ρυθμίζονται από τα οιστρογόνα μέσω των υποδοχέων τους. Μία από τις ενδείξεις της συμμετοχής του ERα στη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων, συνιστούν τα δεδομένα που δείχνουν τον υποδοχέα να έχει ως στόχο το γονίδιο Homeobox C10 (HOXC10), που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη/σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού καθώς και το σχηματισμό των

νευρώνων. Οι τύποι κυττάρων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη του νωτιαίου μυελού είναι κινητήριοι και αισθητήριοι νευρώνες, όπως επίσης αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα.

Λειτουργία νευρικών κυττάρων: Νευροπροστασία^[36]

Τα τελευταία χρόνια έχουν προκύψει πολλά ευρήματα που υποδηλώνουν τη νευροπροστατευτική ιδιότητα των οιστρογόνων μέσω της διαμεσολάβησης του ERα. Μερικά παραδείγματα αυτών των ευρημάτων είναι:

- Με τη χορήγηση του ισχυρού ανταγωνιστή ICI182,780 (Fulvestrant) του ERα σε θηλυκά ποντίκια που είχαν υποστεί μέση απόφραξη της εγκεφαλικής αρτηρίας (Middle cerebral artery occlusion: MCAO) εμφάνισαν δραματικά αυξημένο μέγεθος εμφράγματος στο ραβδωτό σώμα.
- Το mRNA του ERα αυξορρυθμίστηκε στην περιοχή penumbra (αναστρέψιμα τραυματισμένος εγκεφαλικός ιστός) του ισχαιμικού πυρήνα μετά από MCAO σε αρουραίους.

- Η χρήση εξειδικευμένων αγωνιστών του ERα έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει προστατευτική δράση στους νευρώνες του ιππόκαμπου έναντι του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από το γλουταμινικό.

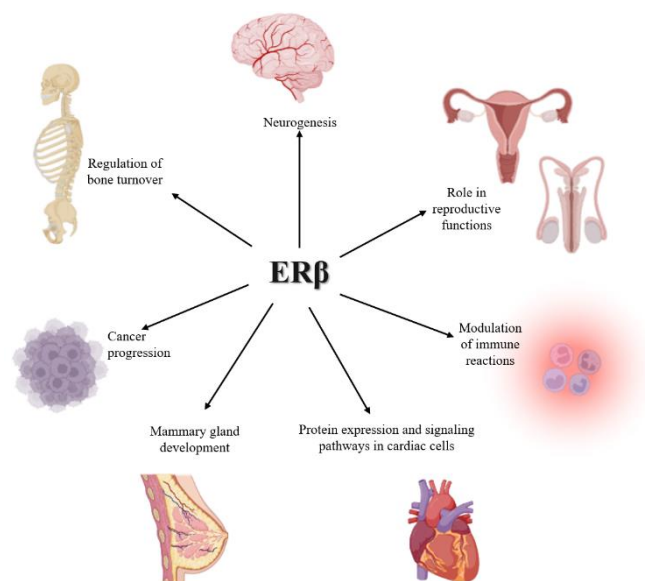
Γνωστική λειτουργία^[37]

Οι πιο βασικές γνωστικές λειτουργίες είναι η μνήμη, η συγκέντρωση, οι εκτελεστικές λειτουργίες, η επεξεργασία γλώσσας και η οπτική-χωρική επεξεργασία. Ποικίλα δεδομένα από σχετικές έρευνες δείχνουν ότι η απώλεια των ωοθηκικών ορμονών, λόγω ωοθηκεκτομής, μπορεί να έχει επιβλαβή επίδραση στις γνωστικές λειτουργίες, που περιλαμβάνουν τόσο συμπεριφορές που προκαλούνται από τον ιππόκαμπο όσο και από τον προμετωπιαίο φλοιό. Επιπλέον, η ωοθηκεκτομή πριν από τη φυσική εμμηνόπαυση σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο άνοιας ακόμα και νόσου του Πάρκινσον. Σε μία μετα-ανάλυση ορμονοθεραπείας (χορήγηση οιστρογόνων) και γνωστικής λειτουργίας σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες βρέθηκαν τα εξής αποτελέσματα:

- Θετική επιρροή από την ορμονοθεραπεία σε 21 από τις 44 δοκιμές μνήμης (48%) και 24 από τις 51 δοκιμές που δεν αφορούσαν λειτουργίες σχετικές με τη μνήμη (47%) (ταχύτητα επεξεργασίας πληροφοριών, οπτικοχωρική επεξεργασία, αφηρημένη συλλογιστική κλπ.)

1.5 Ο ρόλος του ERβ στη διαφοροποίηση και λειτουργία των νευρικών κυττάρων

Ο ERβ, ομοίως με τον ERα, αποτελεί ένα βασικό ρυθμιστή φυσιολογικών διεργασιών, όπως της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης πολλαπλών τύπων κυττάρων. Ακόμα, εμφανίζει ενεργό ρόλο στο αναπαραγωγικό, καρδιομυϊκό, ανοσολογικό, οστικό και νευρικό σύστημα. Οι δύο τύποι συχνά εκδηλώνουν αντίθετα αποτελέσματα και η ισορροπία στα επίπεδά τους μπορεί να επηρεάσει διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες.^[30-35] Αντίστοιχα με τον ERα, και ο ERβ συμμετέχει στη διαφοροποίηση και λειτουργία των νευρικών κυττάρων, με ταυτόχρονο ρόλο στη νευροπροστασία και τη γνωστική λειτουργία.



Εικόνα 7: Συμμετοχή του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα σε πολλαπλές διεργασίες του οργανισμού. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος BioRender.

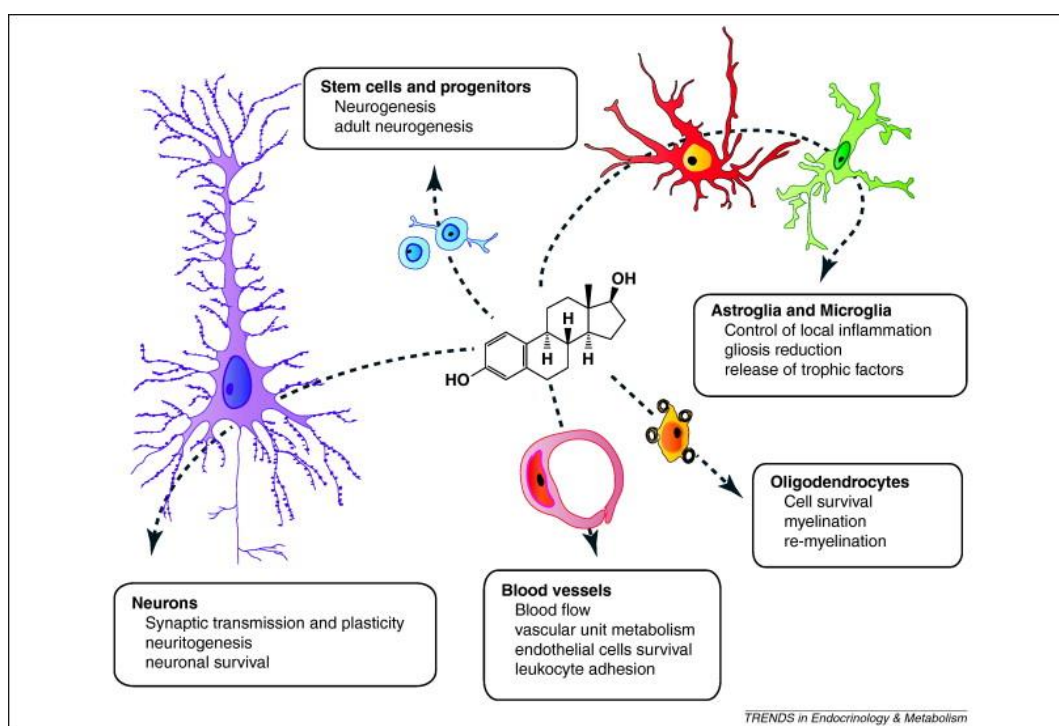
Διαφοροποίηση νευρικών κυττάρων^[38]

Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο ERβ είναι απαραίτητος για τη διατήρηση του πολλαπλασιασμού και της αυτοανανέωσης των νευρικών βλαστικών κυττάρων (Neural stem cells: NSC), πιθανώς μέσω της σηματοδότησης Notch-Hes, καθώς και για τις αποφάσεις του καθορισμού και της λειτουργίας των ντοπαμινεργικών-σεροτονινεργικών νευρώνων. Επιπλέον, η απώλεια του ERβ είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην πρόωρη ολιγοδενδρογλοιογένεση. (Στο νευρικό σύστημα, η σηματοδότηση Notch/Hes είναι ζωτικής σημασίας

για τη διατήρηση των νευρικών βλαστοκυττάρων και τη ρύθμιση της νευρογένεσης. Ελέγχει την ισορροπία μεταξύ της διατήρησης των βλαστικών κυττάρων και της νευρωνικής διαφοροποίησης).^[39]

Λειτουργία νευρικών κυττάρων: Νευροπροστασία^[40]

Ο κρίσιμος ρόλος του ERβ στη διαμεσολάβηση της ανάπτυξης του εγκεφάλου προτάθηκε για πρώτη φορά από τις παρατηρούμενες μορφολογικές ανωμαλίες και τα νευρωνικά ελλείμματα στους εγκεφάλους των ενήλικων ποντικών με απενεργοποίηση του γονιδίου (knockout) που κωδικοποιεί τον ERβ. Εκτενέστερα με τα αποτελέσματα που έχει το knockout του γονιδίου του υποδοχέα στον εγκεφαλο των τρωκτικών, σε ποντίκια ERβ knockout την εμβρυϊκή ημέρα 18,5, σε αντίθεση με εκείνους των αγρίων τύπων τους (wild type), εμφανίζονταν λιγότεροι μεταναστευτικοί νευρώνες σε φλοιώδη στρώματα και αυξημένος αριθμός αποπτωτικών κυττάρων στις κοιλιακές ζώνες (ventricular zones) του εγκεφαλικού φλοιού. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι ο ERβ μπορεί να προάγει την ανάπτυξη του εγκεφάλου ενισχύοντας τη νευρωνική μετανάστευση και τη νευρωνική επιβίωση.



Εικόνα 8: Η οιστραδιόλη ενεργοποιεί προστατευτικούς και επανορθωτικούς μηχανισμούς που δρουν σε διαφορετικούς κυτταρικούς στόχους στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Αυτή δρα σε νευρώνες που εκφράζουν πυρηνικούς και μεμβρανικούς ERs για την προώθηση της νευρωνικής επιβίωσης, της νευριτογένεσης και της συναπτικής λειτουργίας. Δρώντας σε βλαστοκύτταρα και προγονικά κύτταρα, η οιστραδιόλη ρυθμίζει τη δημιουργία νέων νευρικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των νευρώνων. Επιπλέον, η ορμόνη μειώνει την τοπική φλεγμονή των αστροκυττάρων και της μικρογλοίας και προάγει την επιβίωση των νευρώνων μέσω της απελευθέρωσης αυξητικών παραγόντων από τα αστροκύτταρα. Η οιστραδιόλη μειώνει, επίσης, την απομυελίνωση των ολιγοδενδροκυττάρων ενώ προάγει την επιβίωσή τους και, ακόμα, διευκολύνει την επαναμυελίνωση. Οι δράσεις της οιστραδιόλης εμπλέκονται επίσης στον ορμονικό έλεγχο της τοπικής φλεγμονώδους απόκρισης και στη ρύθμιση της ροής του αίματος, του μεταβολισμού της αγγειακής μονάδας, της προσκόλλησης των λευκοκυττάρων και της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. ^[41]

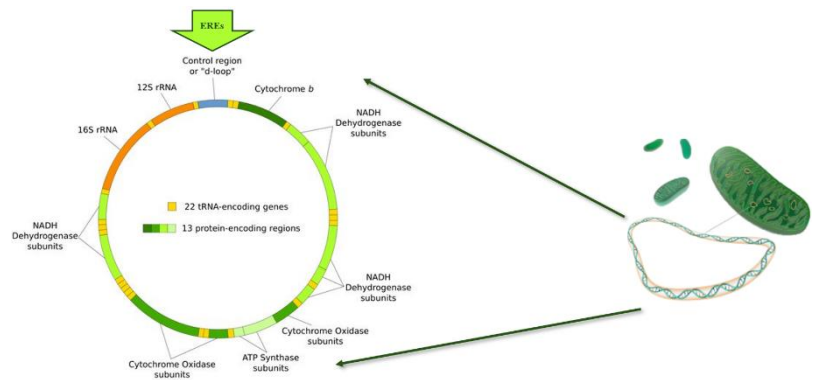
Γνωστική λειτουργία^[42]

Ο ERβ έχει ενεργό ρόλο και στη νευρική πλαστικότητα, διαμόρφωση της μάθησης και μνήμης. Σε ένα μοντέλο Morris Water Maze (μια διαδικασία ανοιχτού πεδίου με λαβύρινθο νερού, στην οποία τα τρωκτικά μαθαίνουν να ξεφεύγουν από το αδιαφανές νερό σε μια κρυφή πλατφόρμα, Morris 1982), ο Rissman και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι τα ποντίκια ERβ knockout, μετά από θεραπεία με 17β-

οιστραδιόλη, παρουσίασαν καθυστερημένη απόκτηση μάθησης ή απέτυχαν να μάθουν την εργασία, ενώ τα ζώα αγρίου τύπου εμφάνισαν σημαντική μάθηση. Μέσω αυτών και μετέπειτα ακόμα ερευνών, υποδηλώνεται ότι ο ERβ μεσολαβεί στην επαγόμενη από οιστρογόνα ενίσχυση της γνωστικής λειτουργίας.

1.6 Ρόλος των μιτοχονδρίων σε σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου

Τα μιτοχόνδρια, οι γνωστοί παραγωγοί ενέργειας του κυττάρου, όχι μόνο παράγουν το μεγαλύτερο μέρος του ATP (Adenosine triphosphate: Τριφωσφορική αδενοσίνη) του κυττάρου μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Oxidative phosphorylation: OXPHOS), αλλά, ταυτόχρονα παράγουν και τις περισσότερες από τις ενδογενείς δραστικές ρίζες οξυγόνου (Reactive oxygen species: ROS) ως τοξικό παραπροϊόν της διαδικασίας αυτής. Επιπλέον, έχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης, της ομοιόστασης του ασβεστίου και γενικότερα της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου. Ειδικότερα, η συνεχής παραγωγή των ROS οδηγεί σε μιτοχονδριακό οξειδωτικό στρες. Όταν το μιτοχόνδριο βρίσκεται σε αυτή την κατάσταση μία σειρά από συμβάντα συντελούνται και μία από τις συνέπειες αυτών είναι η αύξηση του ενδογενούς ασβεστίου, που επακόλουθα θα ενεργοποιήσει την απόπτωση των κυττάρων. Εκτός αυτών των λειτουργιών, μελέτες έχουν δείξει πως τα μιτοχόνδρια είναι ενεργοί συμμετέχοντες σε μεταγωγικά μονοπάτια. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των ενεργών ριζών αζώτου (Reactive nitrogen species: RNS) και των μιτοχονδρίων, ιδίως της δέσμευσης $\text{No}^\bullet$ (ρίζα μονοξειδίου του αζώτου) στην οξειδάση του κυτοχρώματος c. Η ρύθμιση αυτών των αλληλεπιδράσεων σε διάφορα επίπεδα έχει έντονες επιδράσεις τόσο στα μιτοχονδριακά όσο και στα κυτταρικά συμβάντα σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένου των μονοπατιών του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου και της οξειδοαναγωγικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Επιπρόσθετα, τα μιτοχόνδρια φαίνεται να συμμετέχουν και σε μια διαδικασία που ονομάζεται μεταβολικός επαναπρογραμματισμός κυττάρων και αφορά την επίδραση των μεταβολών του κυτταρικού μεταβολισμού στην επιγενετική και φαινότυπο του κυττάρου. Συν τοις άλλοις η παραγωγή ενέργειας, ρυθμίζεται σημαντικά τόσο από τις στεροειδείς όσο και τις θυροειδικές ορμόνες που ασκούν τη δράση τους μέσω της ενεργοποίησης των εκάστοτε υποδοχέων τους, (π.χ. Οιστρογόνα $\rightarrow$ ERα&β) επάγοντας, έτσι, πυρηνικά και μιτοχονδριακά γονίδια OXPHOS. Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) φέρει 37 γονίδια που κωδικοποιούν για περίπου 13 πρωτεΐνες από τις 3.000 που εντοπίζονται συνολικά στα μιτοχόνδρια. Από τα 37 αυτά γονίδια, τα 13 κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας. Σε κάποια σημεία του μιτοχονδριακού γονιδιώματος εντοπίζεται και η παρουσία εσωτερικών στοιχείων απόκρισης ορμονών (Hormone response elements: HREs), που μπορεί να ρυθμίζουν τη διαδικασία της μεταγραφής σε άλλα στάδια. Σίγουρα, όμως, έχουν βρεθεί τουλάχιστον 4 θέσεις που θεωρούνται EREs (mtEREs) και έχει δειχθεί από μελέτες πως στις θέσεις αυτές προσδένονται οι ERs και άλλες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, γεγονός που επιβεβαιώνει περαιτέρω την αλληλεπίδραση των ERs με τα μιτοχόνδρια. [43-48]

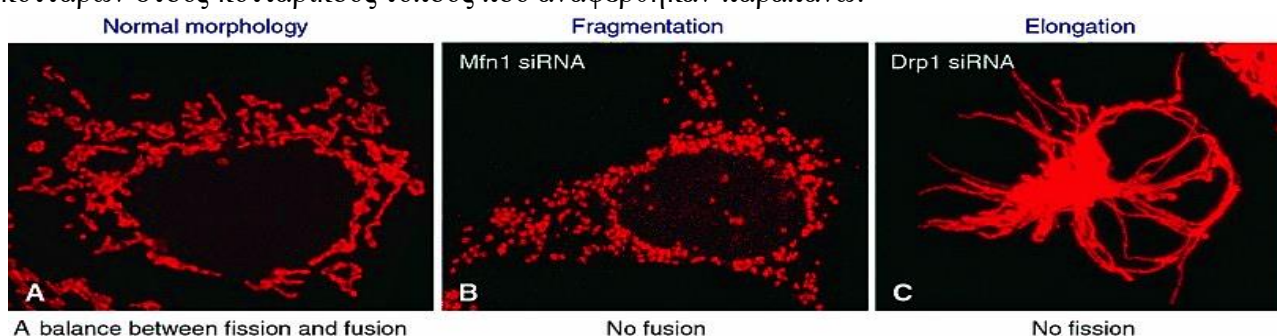


Εικόνα 9: Απεικόνιση της δομής του mtDNA και ένδειξη των θέσεων των estrogen response elements (EREs) στην περιοχή D-loop. [51, 52]

1.7 Ο ρόλος των μιτοχονδρίων στη διαφοροποίηση

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της κυτταρικής διαφοροποίησης μέσω ποικίλων ρόλων. Μερικοί από αυτούς αποτελούν η παραγωγή ενέργειας, η ρύθμιση του μεταβολισμού, η σηματοδότηση ROS, η απόπτωση και η αλληλεπίδραση με παράγοντες μεταγραφής. Σχετικά με τον πρώτο ρόλο, τα βλαστοκύτταρα μπορεί να μεταβούν από τη γλυκόλυση στην οξειδωτική φωσφορυλίωση τη στιγμή που διαφοροποιούνται σε πιο εξειδικευμένους τύπους κυττάρων. Αυτό συμβαίνει καθώς η τελευταία είναι μια πιο αποδοτική διαδικασία παραγωγής ενέργειας συγκριτικά με την πρώτη. Σε σχέση με το ρόλο της σηματοδότησης ROS, το μονοπάτι p53-ROS εμπλέκεται στη ρύθμιση της λιπογένεσης και έχει, επίσης, αποδειχθεί πως η ενεργοποίηση του NRF2 με διαμεσολάβηση ROS, ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των νευρικών βλαστοκυττάρων (NSC).^[47]

Ένα επιπρόσθετο σύνολο διαδικασιών με το οποίο επηρεάζεται η κυτταρική διαφοροποίηση είναι η μιτοχονδριακή δυναμική, που αφορά, συγκεκριμένα, τη δράση πρωτεϊνών μιτοχονδριακής σχάσης (fission) και σύντηξης (fusion). Εκτενέστερα με τη μιτοχονδριακή σχάση, σε ποντίκια με knockout για την ειδική για νευρικά κύτταρα Drp1 (Dynamin-related protein 1), εμφανίστηκε υποπλασία του εγκεφάλου και η *in vitro* καλλιέργεια του πρόσθιου εγκεφάλου έδειξε μείωση του αριθμού των νευριτών (οποιαδήποτε προβολή από το κυτταρικό σώμα ενός νευρώνα), καθώς και μη φυσιολογικό σχηματισμό συνάψεων. Εκτός από τη μιτοχονδριακή σχάση, η μιτοχονδριακή σύντηξη έχει εξίσου σημαντικό ρόλο στη διαδικασία κυτταρικής διαφοροποίησης, ειδικά σε αυτή των καρδιακών, νευρικών και μεσεγχυματικών κυττάρων. Σε σχετική έρευνα βρέθηκε πως η αποσιώπηση των γονιδίων των πρωτεϊνών Mfn1 και Mfn2 (Mitofusin 1 και 2) στις εμβρυϊκές καρδιές των ποντικών φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη της καρδιάς τους. Αναφορικά με τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (Mesenchymal stem cells MSC), η μιτοχονδριακή επιμήκυνση (αύξηση της έκφρασης των Mfn1 και Mfn2) συσχετίζεται και με την λιπογένεση και την οστεογένεση. Συγχρόνως ο μιτοχονδριακός κατακερματισμός (αυξημένη έκφραση των Drp1, Fission: Fis1 και Fis2) εμπλέκεται στη χονδρογένεση. Κατά συνέπεια, η καταστολή του Mfn2 και η υπερέκφραση μιας κυρίαρχης αρνητικής μορφής Drp1 οδήγησαν σε ελαττωματική διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων στους κυτταρικούς τύπους που αναφέρθηκαν παραπάνω.^[49]



Εικόνα 10: Α. Φυσιολογική μορφολογία των μιτοχονδρίων διαμορφώνοντας ένα μικτό δίκτυο με σωληνοειδείς και στρογγυλές μορφές, Β. Η απουσία σύντηξης με σίγηση του *Mfn1* οδηγεί σε μιτοχονδριακό κατακερματισμό, C. Η απουσία σχάσης με σίγηση του *Drp1* οδηγεί σε μιτοχονδριακή επιμήκυνση.^[50]

1.8 Μιτοχονδριακή εντόπιση των υποδοχέων οιστρογόνων (*mtERα* & *mtERβ*)

Πέρα από την έμμεση μιτοχονδριακή δράση των υποδοχέων οιστρογόνων μέσω της ενεργοποίησης πυρηνικών γονιδίων, τα οποία μετέπειτα ενεργοποιούν μιτοχονδριακά γονίδια σχετιζόμενα με την παραγωγή ενέργειας και την κυτταρική επιβίωση, φαίνεται να έχουν και άμεσους, σημαντικούς, ρόλους στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Μελέτες αποδεικνύουν την εντόπιση του ERβ στα

μιτοχόνδρια και τη ρύθμιση μιτοχονδριακών διεργασιών όπως μιτοχονδριακή μεταγραφή, οξειδωτικό stress και απόπτωση. [53, 54]

Μιτοχονδριακή εντόπιση του ERα^[55]

Ο ERα συμμετέχει και στις διαδικασίες που αφορούν τη μιτοχονδριακή δυναμική. Ένα μοντέλο γονιδιακής σίγησης (knockdown) του ERα στα β-παγκρεατικά κύτταρα έδειξε επιμήκη μιτοχόνδρια, υποδηλώνοντας αυξημένο το φαινόμενο της σύντηξής τους. Σε φυσιολογικά πλαίσια ο υποδοχέας ενεργεί ως καταστολέας της έκφρασης δύο συγκεκριμένων γονιδίων (OMA1 & CHOP) σχετιζόμενα με αποκρίσεις στο οξειδωτικό στρες. Ο τρόπος που ενεργεί ως καταστολέας είναι με την αλληλεπίδραση των EREs στους υποκινητές των δύο γονιδίων αναστέλλοντας την έκφρασή τους. Αυτός ο μηχανισμός διατηρεί επαρκή επίπεδα συμβάντων σύντηξης/σχάσης, τα οποία σχετίζονται με μείωση του οξειδωτικού στρες και του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου, αντίστοιχα με τη δράση των γονιδίων, συμβάλλοντας τελικά στην επιβίωση των β-κυττάρων και στην έκκριση ινσουλίνης.

Μιτοχονδριακή εντόπιση του ERβ^[56]

Ομοίως, όσο αφορά τη ρύθμιση της μιτοχονδριακής δυναμικής και των φαινομένων σύντηξης και σχάσης, ο ERβ εμφανίζει και σε αυτή την περίπτωση ενεργό ρόλο. Ακριβέστερα, ερευνητές σχετικής μελέτης αναφέρουν πως μετά από χορήγηση E2 σε T47D κύτταρα (επιθηλιακά κύτταρα καρκινώματος του μαστού με χαμηλά επίπεδα ATP) η υπερέκφραση του υποδοχέα οδήγησε σε αύξηση των πρωτεϊνών του συμπλέγματος OXPHOS. Σε αντιδιαστολή με τον ERα, βρέθηκε να μειώνει τη σχάση ενώ, παράλληλα, αύξησε τη σύντηξη.

Ακόμα, μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι τα χαμηλά επίπεδα μιτοχονδριακού ERβ (mtERβ) συσχετίστηκαν με αυξημένη υποτροπή του όγκου του μαστού. Αναλυτικότερα, η επιμόλυνση των κυττάρων τριπλού αρνητικού καρκίνου του μαστού (Triple negative breast cancer: TNBC) MDA-MB-231 με φορέα έκφρασης ERβ με στόχο τα μιτοχόνδρια, μείωσε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την εισβολή και τη μετανάστευση in vitro, καθώς και τον σχηματισμό όγκων in vivo. Προηγούμενες μελέτες έχουν εμπλέξει τον ERβ ως κατασταλτικό όγκου στον καρκίνο του μαστού και σε άλλους καρκίνους υπογραμμίζοντας τη σημαντικότητά του στην ογκογένεση και τη μετάσταση.

- ❖ Γνωρίζοντας, λοιπόν, τον καθοριστικό ρόλο των μιτοχονδρίων στην κυτταρική διαφοροποίηση, αλλά και την ύπαρξη, καθώς και τον ρόλο του mtERβ που έχει σε μετέπειτα στάδια της διαφοροποίησης, στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η πιθανή υποκυτταρική μετατόπιση του υποδοχέα οιστρογόνων β (ERβ) κατά τα πρώιμα στάδια διαφοροποίησης των κυττάρων SH-SY5Y. Επιπλέον, διερευνήθηκε η πιθανή μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα οιστρογόνων α (ERα) σε σύστημα διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων SH-SY5Y παρουσία και απουσία στεροειδών ορμονών.

1.9 Διαφοροποίηση νευρικών κυττάρων SH-SY5Y

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την επιτέλεση αυτής της μελέτης είναι η SH-SY5Y. Πιο συγκεκριμένα, αυτή η κυτταρική σειρά προήλθε απ' τον υποκλώνο SH-SY της γονικής κυτταρικής σειράς SK-N-SH ανθρώπινου νευροβλαστώματος. Η SK-N-SH δημιουργήθηκε το 1970 από μεταστατικά κύτταρα που βρέθηκαν κατά την αναρρόφηση μυελού των οστών μιας τετράχρονης κοπέλας, πράγμα που σημαίνει πως τα κύτταρα της SH-SY5Y είναι θηλυκού γένους.

Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y χρησιμοποιείται ως μοντέλο για νευροεκφυλιστικές διαταραχές, καθώς τα κύτταρα μπορούν να μετατραπούν σε διάφορους τύπους λειτουργικών νευρώνων με την προσθήκη συγκεκριμένων ενώσεων. Επιπλέον, βρίσκει ευρέως χρήση σε πειραματικές νευρολογικές μελέτες, συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης της νευρωνικής διαφοροποίησης, του μεταβολισμού και της λειτουργίας που σχετίζονται με νευροεκφυλιστικές διεργασίες, νευροτοξικότητα και νευροπροστασία.^[58]

Στη μη διαφοροποιημένη κατάσταση, τα κύτταρα της SH-SY5Y σειράς εμφανίζονται μικρά και στρογγυλεμένα με μορφολογία νευροβλάστης, ενώ παράλληλα έχουν την ικανότητα συνεχούς πολλαπλασιασμού σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Τα SH-SY5Y μπορούν να διαφοροποιηθούν σε νευρικά κύτταρα με την προσθήκη ρετινοϊκού οξέος (RA) και νευροτροφινών παρουσιάζοντας μια μορφολογία όμοια με τους πρωτογενείς νευρώνες και, συνάμα, εκφράζοντας ειδικούς δείκτες διαφοροποίησης, όπως για παράδειγμα η βήτα ΙΙΙ-τουμπουλίνη (Tuj-1: Neuron-specific class III beta-tubulin).^[57]

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός

2.1.1 Οργανολογία				
Αναδευτήρας: Heidolph Rotamax	Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης X-ray film από W.B Kodak	Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: Entrofriger- BLII/ PS Selecta®	Heat blocker: KISKER	Vortex: Bio Vortex V1
Ζυγοί: KERN EW + KERN 440-47 N	Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad miniPROTEAN® tetra cell	Φυγόκεντρος Helme Z36HK	Quick spin: Nippon Genetics Europe GmbH	Συνεστιακό μικροσκόπιο Zeiss LSM 800
Πιπέτες: Air displacement pipettes όγκων 0,1-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100- 1.000 µl	Συσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad minitrans Blot	Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYS TM	Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S	Hood: Biosan
Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss Optronic Germany	Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Newbauer)	Αυτόματος πιπεταδόρος: HTL Lab Solution	Επωαστήρας: New Brunswick (an Eppendorf Company) Galaxy 170S	Επωαστήρας: SHEL LAB
Υδατόλουτρο: Selecta	Φυγόκεντρος: Entrofriger- BLII/ PS Selecta	Laminar Flow Hood Tel Star AV- 30/70		

Πίνακας 3: Σύνολο οργάνων που χρησιμοποιήθηκαν

2.1.2 Αναλώσιμα & Εταιρείες				
Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15mL, 50mL), <u>Sarstedt</u>	Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, <u>Amersham™</u> <u>Protran™</u>	Πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorfs (1.5mL, 2.0mL), <u>Sarstedt</u>	Φωτογραφικά φιλμ ανίχνευσης σήματος σε μεμβράνη κατά τη διαδικασία Western blot, <u>FUJI MEDICAL</u>	Φλάσκες για καλλιέργεια κυττάρων, επιφάνειας 25cm ² και 75cm ² <u>Sarstedt</u>
Γυάλινα σιφώνια, <u>Kimble</u>	Πιπέττες ορολογικές - Serological (2, 5, και 10mL), <u>Sarstedt</u>	Ρύγχη (0.2-10µL, 20-200µL και 100-1000µL), <u>Sarstedt</u>	Χαρτιά Whatman, <u>Sigma</u>	Τριβλία καλλιέργειας 150×20mm

Πίνακας 4: Σύνολο όλων των αναλώσιμων που χρησιμοποιήθηκαν

2.1.3 Διαλύματα			
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10×: 91mM Na₂HPO₄, 17 mM NaH₂PO₄ και 1500 mM NaCl. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου (RT).	Lysis Buffer: 20 mM Tris pH 7.5, 0.5% v/v Triton X100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA. Αποθήκευση στους 4°C. Πριν τη χρήση του γίνεται προσθήκη 1mM DTT, 0,1mM PMSF και κατάλληλη ποσότητα μείγματος αναστολέων πρωτεασών.	Sample Buffer 4×: 1M Tris pH 6.8, 10% v/v γλυκερόλη, 10% w/v SDS, 5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 1%v/v κυανού της βρωμοφαινόλης. Αποθήκευση στους -20°C.	Υπερθεϊκό αμμώνιο (APS): Παρασκευή διαλύματος συγκέντρωσης 10% w/v με χρήση ως διαλύτη ddH₂O. Αποθήκευση στους -20°C.
Ρυθμιστικό διάλυμα PBST 1×: Αραίωση του stock buffer PBS10× σε ddH₂O ή ddH₂O. Προσθήκη Tween-20 σε αναλογία 1% v/v . Διατήρηση σε RT.	PMSF 200mM: Με αραίωση 10%v /v σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20mM.	Διάλυμα Bradford: Stock 5×. Χρήση σε τελική συγκέντρωση 1×, αραιωμένο σε ddH₂O.	TEMED: Χρήση χωρίς αραίωση. Αποθήκευση στους 4°C.
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10×: 10% v/v Running Buffer 10×, 20% v/v MeOH και 0.05%w/v SDS. Συμπλήρωση όγκου με ddH₂O. Αποθήκευση στους 4°C.	Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10×: 250 mM Tris 30g/L, 1920 mM glycine 144g/L. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος. Διατήρηση σε RT.	Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1×: Παρασκευή διαλύματος σε συγκέντρωση 10% v/v από RB 10x και χρήση ddH₂O ως διαλύτη. Προσθήκη SDS 10%w/v σε αναλογία 0.01%. Αποθήκευση σε RT.	Διαλύματα για εμφάνιση σήματος : Χρήση δύο εμπορικών σκευασμάτων της Kodak, ένα διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Παρασκευή με ανάμειξη 1:3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε ddH₂O.
Tris 20mM pH 7.5: Αραίωση stock διαλύματος Tris 1M pH= 7.5 (4°C) σε ddH₂O. Αποθήκευση σε RT.	TBS 10×: NaCl 88 g + Tris 24 g με pH=7,4-7,6 (προσθήκη HCl για να φτάσει το επιθυμητό pH)	TBST 1×: Παρασκευή διαλύματος σε συγκέντρωση 10%v/v από TBS 10x και χρήση ddH₂O ως διαλύτη. Προσθήκη Tween-20 σε αναλογία 0,0007%.	SDS: 10%w/v χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το ddH₂O.

Πίνακας 5: Σύνολο όλων των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

2.1.4 Χημικές ουσίες & Θρεπτικά μέσα			
Acrylamide/Bis acrylamide 40%v/v [Bio-Rad]	Fixer [Carestream]	PMSF [Serva]	Γλυκερόλη [Applichem]
Agarose [Sigma]	Glycine [Serva]	SDS [Sigma]	Μείγμα αναστολέων πρωτεασών [Sigma]
APS [Sigma]	L-Glutamine [Gibco]	Skimmed milk powder [Regilait]	HCl [Merck]
Bradford protein assay [Bio-Rad]	NaOH [Merck]	TEMED [Applichem]	Κυανούν της βρωμοφαινόλης [Research Organics]
EDTA [Serva]	Na ₂ HPO ₄ [Merck]	Triton X-100 [Applichem]	Low glucose FBS 10%v/v with phenol red
DTT [Serva]	NaCl [Panreac]	Tris [Serva]	Low glucose FBS cis 10%v/v
Developer [Carestream]	NaH ₂ PO ₄ [Merck]	Tween 20 [Sigma]	DMEM low glucose, 10%v/v FBS complete
ECLA + ECLB [Santa Cruz]	Paregular TM Prestained Protein Ladder [Thermo Scientific Fermentas]	β-μερκαπτοαιθανόλη [Riedel-de Haën]	DMEM low glucose, 10%v/v FBS cis
Αιθανόλη [Sigma]	Βιοαιθανόλη [Kalochev]	Πενικιλίνη-Στρεπταμυκίνη (P/S) [Gibco]	Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 1g/l Glucose [Life Technologies – Invitrogen]
DMSO [Sigma]	Trypsin-EDTA 5%w/v 10× [Gibco]		

Πίνακας 6: Σύνολο όλων των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν

2.1.5 Αντισώματα	
Έναντι του ERα: 21244-1-AP [Proteintech], Πολυκλωνικό	Έναντι της β-ακτίνης: b-actin [Sigma], Μονοκλωνικό
Έναντι του ERβ: ES5179 [ELK Biotechnology], Πολυκλωνικό	Έναντι της β III- τουμπουλίνης: Tuj-1 [Merck]
Δευτερογενές έναντι του πρωτογενούς των ERα&β: rAlexa-488, Πολυκλωνικό	Δευτερογενές έναντι του πρωτογενούς των β-ακτίνης και β III- τουμπουλίνης mAlexa-488, Μονοκλωνικό

Πίνακας 7: Σύνολο όλων των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

2.2 Τεχνικές

2.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες SH-SY5Y: Δημιουργία δειγμάτων

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της πιθανής υποκυτταρικής μετατόπισης του υποδοχέα οιστρογόνων β (ER β) κατά τα πρώιμα στάδια διαφοροποίησης των κυττάρων SH-SY5Y. Επιπλέον, διερευνήθηκε και η πιθανή μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα οιστρογόνων α (ER α) σε σύστημα διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων SH-SY5Y παρουσία και απουσία στεροειδών ορμονών.

Πρώτο στάδιο της έρευνας αποτέλεσε ο χειρισμός της κυτταροκαλλιέργειας των κυττάρων SH-SY5Y, ούτως ώστε να προκύψουν τα δείγματα για την ανοσοκυτταροχημεία. Η εκτέλεση του χειρισμού των κυτταροκαλλιεργειών πραγματοποιήθηκε από τον υποψήφιο διδάκτορα Γεωργαντόπουλο Αχιλλέα.

Τα δείγματα της ανοσοκυτταροχημείας αντιστοιχούν σε διαφοροποιημένα (Differentiated: DIF) και μη διαφοροποιημένα (None Differentiated: N.D) κύτταρα με και χωρίς την προσθήκη της ορμόνης οιστραδιόλη (E2). Με αυτόν τον τρόπο προκύπτει ο αρνητικός μάρτυρας που είναι το δείγμα μη διαφοροποιημένων κυττάρων χωρίς την προσθήκη ορμόνης και ο θετικός μάρτυρας που είναι το δείγμα διαφοροποιημένων κυττάρων με την προσθήκη ορμόνης. Τόσο ο αρνητικός όσο και ο θετικός μάρτυρας βοηθούν, ώστε να συγκριθούν στη συνέχεια τα αποτελέσματα των διαφοροποιημένων κυττάρων χωρίς την προσθήκη ορμόνης με τους δύο μάρτυρες, εφόσον στόχος της μελέτης είναι ο υποκυτταρικός εντοπισμός των υποδοχέων στα διαφοροποιημένα κύτταρα υπό φυσιολογικές συνθήκες και όχι την επιτηδευμένη προσθήκη της ορμόνης, που τους ενεργοποιεί.

N.D.	DIF.
Χωρίς προσθήκη E2 (αρνητικός μάρτυρας)	Χωρίς προσθήκη E2 (υπό μελέτη συνθήκη)
Με προσθήκη E2	Με προσθήκη E2 (θετικός μάρτυρας)

Πίνακας 8: Παρουσίαση συνθηκών διαφοροποιημένων και μη κυττάρων SH-SY5Y.

Τα υποκυτταρικά διαμερίσματα που στοχεύθηκαν με φθορίζουσες χρωστικές για την απεικόνισή τους μέσω συνεστιακού μικροσκοπίου ήταν ο πυρήνας και τα μιτοχόνδρια. Η χρώση του πυρήνα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μπλε χρωστικής Hoechst ενώ των μιτοχονδρίων με την κόκκινη χρωστική CMX, η οποία πρέπει να χρησιμοποιηθεί όσο τα κύτταρα είναι ζωντανά, καθότι συσσωρεύεται σε ενεργά μιτοχόνδρια. Επιπλέον, για τον εντοπισμό, μέσω φθορισμού, του ER β έγινε χρήση δευτερογενούς αντισώματος, έναντι του πρωτογενούς του υποδοχέα, με πράσινη φθορίζουσα χρωστική Alexa-488.

Hoechst-33342	CMX	rAlexa-488
Πυρήνας	Μιτοχόνδρια	ER β

Πίνακας 9: Εμφάνιση χρωστικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον υποκυτταρικό εντοπισμό του ER β .

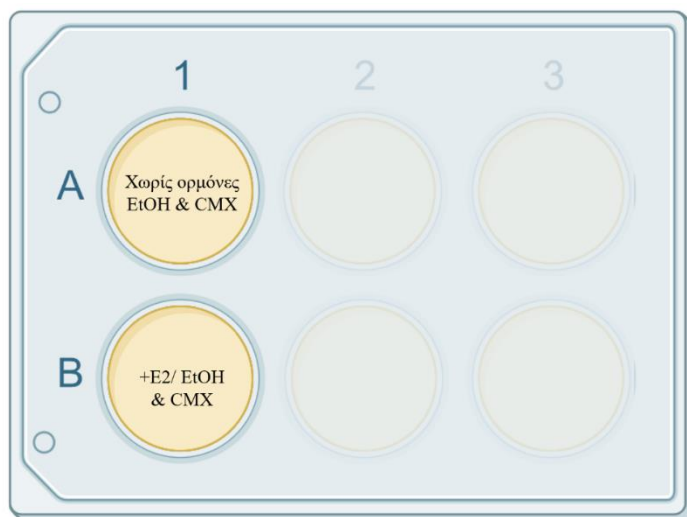
Αρχικό σκέλος της διαδικασίας χειρισμού της καλλιέργειας ήταν η επίστρωση 80.000 c/w σε 6 well plate με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας low glucose, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine. Την ημέρα μηδέν (Day 0) έλαβε χώρα η αλλαγή του παραπάνω θρεπτικού σε θρεπτικό διαφοροποίησης: low glucose, με phenol red, 1% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine και 10 μ M ρετινοϊκό οξύ (RA). Την ημέρα δύο (Day 2) διενεργήθηκε η αλλαγή του θρεπτικού σε θρεπτικό μέσο: low glucose, 1% v/v FBS cis, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine και 10 μ M ρετινοϊκό οξύ (RA), χωρίς phenol red. Την τέταρτη μέρα (Day 4) διαφοροποίησης ανανεώθηκε το θρεπτικό με το ίδιο θρεπτικού

της ημέρας δύο. Την τελευταία μέρα (Day 6) διαφοροποίησης πραγματοποιήθηκε η ανανέωση του θρεπτικού με πρόσμιξη της CMX σε τελική συγκέντρωση 200nM και στις συνθήκες που έπρεπε την οιστραδιόλη (E2) σε τελική συγκέντρωση 10^{-9} M, διαλυμένη σε αιθανόλη (EtOH). Στις συνθήκες χωρίς την προσθήκη ορμόνης έγινε απλά προσθήκη του διαλύτη αιθανόλη. Ακολούθησε επώαση για 30-45 min και συλλογή των διαφοροποιημένων κυττάρων.

Για τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα ισχύει το πρώτο βήμα, δηλαδή η επίστρωση 80.000 c/w σε 6 well plate με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας low glucose, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine και στη συνέχεια την δεύτερη μέρα (Day 2) πραγματοποιήθηκε η αλλαγή θρεπτικού με το θρεπτικό μέσο: low glucose, χωρίς phenol red, 10% v/v FBS cis, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine, καθώς τα κύτταρα των συνθηκών N.D και DIF πρέπει να βρίσκονται τις ίδιες μέρες στο FBS cis. Τις ημέρες τέσσερα και έξι (Day 4&6) έγινε η ανανέωση του ίδιου θρεπτικού μέσου της ημέρας 2, και την μέρα 6 ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία χρώσης με τη CMX σε τελική συγκέντρωση 200nM. Για τις συνθήκες παρουσίας και απουσίας ορμόνης ισχύει το ίδιο με τα διαφοροποιημένα κύτταρα.

Ο λόγος αφαίρεσης του *phenol red* είναι οι ουσίες με δακτυλίους που εμπεριέχονται σε αυτό και μπορεί να δώσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω ομοιότητας με την οιστραδιόλη. Ακόμα, ο λόγος που χρησιμοποιείται το *FBS cis* (*Charcoal inactivated Serum*) είναι η απουσία βιταμινών και ιχνοστοιχείων σε αυτό, σταματώντας, έτσι, τον πολλαπλασιασμό και ωθώντας περισσότερο τη διαδικασία της διαφοροποίησης.

Εικόνα 11: Το 6 well plate των διαφοροποιημένων κυττάρων (DIF) έχει την παραπάνω τελική μορφή με το τελικό (Day 6) θρεπτικό μέσο να είναι: low glucose, 1% v/v FBS cis, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine και 10μM ρετινοϊκό οξύ (RA), χωρίς phenol red. Το 6 well plate των μη διαφοροποιημένων κυττάρων (N.D) έχει την παραπάνω τελική μορφή με το τελικό (Day 6) θρεπτικό μέσο να είναι: low glucose, χωρίς phenol red, 10% v/v FBS cis, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος BioRender.



DIF. SH-SY5Y					
Nutrient medium	Low Glucose, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine	Phenol red	1% v/v FBS	1% v/v FBS cis	Retinoic acid
Day 0	+	+	+		+
Day 2	+			+	+
Day 4	+			+	+
Day 6	+			+	+

Πίνακας 10: Παρουσίαση των θρεπτικών μέσων κατά τη διαφοροποίηση τις πρώτες έξι ημέρες.

N.D. SH-SY5Y				
Nutrient medium	Low Glucose, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine	Phenol red	10% v/v FBS	10% v/v FBS cis
Day 0	+	+	+	
Day 2	+			+
Day 4	+			+
Day 6	+			+

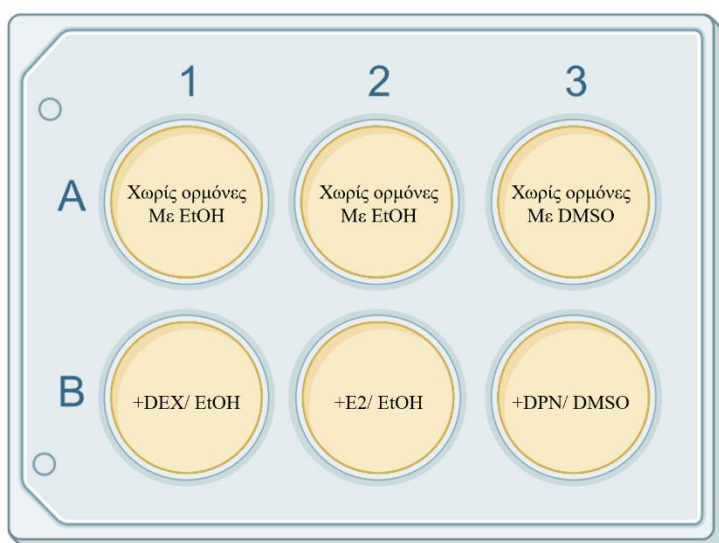
Πίνακας 11: Παρουσίαση των θρεπτικών μέσων κατά την καλλιέργεια των μη διαφοροποιημένων κυττάρων τις πρώτες έξι ημέρες.

Δευτερευόντως, αφού λήφθηκαν τα αποτελέσματα της ανοσοκυτταροχημείας, ακολούθησε η προετοιμασία της καλλιέργειας των κυττάρων SH-SY5Y για τη δημιουργία των δειγμάτων που θα χρησιμοποιούνταν στην ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα δείγματα αυτά αφορούσαν, ομοίως με την προηγούμενη τεχνική, διαφοροποιημένα και μη κύτταρα με και χωρίς την προσθήκη των στεροειδών ορμονών: δεξαμεθαζόνης (Dexamethasone: DEX, είδος συνθετικού γλυκοκορτικοστεροειδούς φαρμάκου και αγωνιστής των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών), οιστραδιόλης (E2) και ενός εξειδικευμένου αγωνιστή του ERβ ονόματι διαρυλοπροπιονιτρίλιο (DPN).

Πρώτο βήμα του χειρισμού της κυτταροκαλλιέργειας ήταν η επίστρωση 250.000 c/w σε 6 well plate σε DMEM καλλιέργειας low glucose με phenol red με 10% v/v FBS. Την ημέρα μηδέν (Day 0) έλαβε χώρα η αλλαγή του παραπάνω θρεπτικού σε θρεπτικό διαφοροποίησης: 1% v/v FBS complete σε DMEM low glucose με phenol red, παρουσία RA τελικής συγκέντρωσης 10μM. Την ημέρα δύο (Day 2) άλλαξε το θρεπτικό σε θρεπτικό μέσο: 1% v/v FBS cis σε DMEM low glucose, w/o phenol red, παρουσία 10μM RA. Την τέταρτη μέρα (Day 4) διαφοροποίησε το ίδιο θρεπτικό της Day 2 ανανεώθηκε, αλλά πρώτα προστέθηκαν οι ορμόνες E2, DEX & DPN με τελικές συγκεντρώσεις 10^{-9} M και 10^{-8} M για τις δύο τελευταίες. Στις συνθήκες διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων απουσία ορμονών, στο στάδιο προσθήκης των ορμονών πραγματοποιήθηκε προσθήκη EtOH και DMSO σε αναλογία 1/1.000 v/v. Τέλος, την έκτη μέρα (Day 6) συλλέχθηκαν τα κύτταρα σε διαφορετικά erppendorf με αναγεγραμμένες τις συνθήκες.

Για τα μη διαφοροποιημένα SH-SY5Y ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια λογική και τα ίδια χρονικά διαστήματα απλά δεν προστέθηκε ποτέ στα θρεπτικά μέσα το RA. Πολλαπλασιάστηκαν σε DMEM καλλιέργειας low glucose με phenol red με 10% v/v FBS και από τη Day 2 μέχρι και τη συλλογή τους βρισκόταν σε θρεπτικό μέσο 10% v/v FBS cis σε DMEM low glucose, w/o phenol red. Η διαδικασία

για την προσθήκη των ορμονών, οι μέρες επώασης και οι τελικές συγκεντρώσεις είναι ίδια.



Εικόνα 12: Το 6 well plate των διαφοροποιημένων κυττάρων (DIF) έχει την παραπάνω τελική μορφή με το τελικό (Day 6) θρεπτικό μέσο να είναι: 1% v/v FBS cis σε DMEM low glucose και 10μM ρετινοϊκό οξύ (RA), χωρίς phenol red. Το 6 well plate των μη διαφοροποιημένων κυττάρων (N.D) έχει την παραπάνω τελική μορφή με το τελικό (Day 6) θρεπτικό μέσο να είναι: χωρίς phenol red, 10% v/v FBS cis σε DMEM low glucose. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος BioRender.

DIF. SH-SY5Y						
Nutrient medium	DMEM Low Glucose, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine	Phenol red	1% v/v FBS	1% v/v FBS cis	Retinoic acid	Hormones or EtOH & DMSO
Day 0	+	+	+		+	
Day 2	+			+	+	
Day 4	+			+	+	+
Day 6	+			+	+	+

Πίνακας 12: Παρουσίαση των θρεπτικών μέσων κατά τη διαφοροποίηση τις πρώτες έξι ημέρες.

N.D. SH-SY5Y					
Nutrient medium	DMEM Low Glucose, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine	Phenol red	1% v/v FBS	1% v/v FBS cis	Hormones or EtOH & DMSO
Day 0	+	+	+		
Day 2	+			+	
Day 4	+			+	+
Day 6	+			+	+

Πίνακας 13: Παρουσίαση των θρεπτικών μέσων κατά την καλλιέργεια των μη διαφοροποιημένων κυττάρων τις πρώτες έξι ημέρες.

2.2.2 Ανοσοκυτταροχημεία

Η πρώτη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια αυτής της έρευνας ήταν η ανοσοκυτταροχημεία, ώστε να επιτευχθεί ο έλεγχος της υποκυτταρικής μετατόπισης του ERβ στο σύστημα διαφοροποιημένων και μη διαφοροποιημένων κυττάρων SH-SY5Y παρουσία και απουσία ορμονών. Αυτή η τεχνική αφορά την *απεικόνιση* επιθυμητών μορίων, στα οποία προσδένονται μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα σημασμένα με φθορισμό, με τη χρήση συνεστιακού ή μικροσκοπίου φθορισμού σε μία ορισμένη συνθήκη μέσα στο κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα, σε αυτή τη μελέτη βασική επιδίωξη αποτέλεσε ο εντοπισμός του υποδοχέα οιστρογόνων β στον πυρήνα ή στα μιτοχόνδρια. Έτσι, έγινε χρήση διαφορετικών χρωμάτων φθορίζοντων ουσιών για να είναι δυνατή η εκπομπή φθορισμού από τα υποκυτταρικά οργάνδια και, έτσι, να είναι ξεκάθαρη η παρουσία ή μη του υποδοχέα σε αυτά. Η διαδικασία χρώσης ξεκίνησε από τα τελευταία βήματα χειρισμού της κυτταροκαλλιέργειας, καθώς η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση των μιτοχονδρίων προαπαιτούσε τα κύτταρα να είναι ζωντανά. Η χρώση αυτή ήταν η CMX και χρησιμοποιήθηκε σε τελική συγκέντρωση 200nM. Μετά από 30-45 min επώασης, πραγματοποιήθηκε η αφαίρεση του θρεπτικού και ακολούθησε η διαδικασία της μονιμοποίησης. Στο 6 well plate που χρησιμοποιήθηκε υπήρχαν στη βάση του κολλημένες καλυπτρίδες, στις οποίες είχαν παραμείνει τα κύτταρα μετά την αφαίρεση του θρεπτικού. Οι καλυπτρίδες αυτές αποκολλήθηκαν απ' τα πηγάδια και ως το πέρας της διαδικασίας και επεξεργάστηκαν περαιτέρω, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.. Για την μονιμοποίηση, λοιπόν, εισήχθησαν 2mL μεθανόλης 100%, στις καλυπτρίδες, για 10 min στους -20°C. Στη συνέχεια της διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με PBSx1 και τέλος επώαση με 2mL ακετόνης 100%

για 5 min στους -20°C . Επόμενο βήμα της τεχνικής ήταν η επώαση των καλυπτρίδων με το πρωτογενές αντίσωμα ES5179, σε τελική συγκέντρωση 1/50 v/v σε PBSTx1, έναντι του υποδοχέα οιστρογόνων β , για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα χρειάστηκαν 2 πλύσεις με PBSx1 με το πέρας της επώασης με το πρωτογενές αντίσωμα. Εν συνεχεία, τα δείγματα πάνω στις καλυπτρίδες επώαστηκαν με εξειδικευμένο δευτερογενές αντίσωμα, rAlexa-488, έναντι του αντίστοιχου πρωτογενούς, για 1h σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό μέρος. Πιο αναλυτικά, στο διάλυμα του δευτερογενούς αντισώματος προστέθηκε και η χρωστική Hoechst-33342 για τη χρώση των πυρήνων, με τελική συγκέντρωση 1/500 v/v σε PBSTx1 τόσο για το αντίσωμα όσο και για τη χρωστική. Μετά τη 1h επώαση πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με PBSx1 και οι καλυπτρίδες κολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με τη χρήση πολυβινυλοξαιικού αιθυλεστέρα (PVA: Polyvinyl acetate). Τελικά, τα δείγματα ήταν έτοιμα και τα αποτελέσματα απεικονίστηκαν με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου με φακό εστίασης 20X.

2.2.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη πρωτεϊνικών επιπέδων σε ένα δείγμα ομογενοποιημένου ή εκχυλίσματος ιστού. Εκτός, όμως, από την ανίχνευση χρησιμοποιείται και για τη διάκριση και ποσοτικοποίηση διαφορετικών πρωτεϊνών σε ένα περίπλοκο μίγμα πρωτεϊνών. Η τεχνική αυτή, λοιπόν, αξιοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη πιθανής μεταβολής των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα στα δείγματα διαφοροποιημένων και μη κυττάρων με και χωρίς την προσθήκη των προαναφερθέντων ορμονών (DEX, E2 & DPN). Προτού ξεκινήσει η επιτέλεση αυτής της τεχνικής ήταν απαραίτητη η προετοιμασία των δειγμάτων.

Συλλογή των κυττάρων (Harvest)

Σε αυτό το στάδιο η συλλογή των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με παρουσία του θρεπτικού υλικού, και όχι του PBS λόγω ευαισθησίας των κυττάρων. Η διαδικασία ξεκινά με τα 6-well plates να βρίσκονται στον πάγο, εξασφαλίζοντας πως οι διεργασίες εντός των κυττάρων σταματούν και έτσι ορίζεται ο χρόνος $t=0$, ο οποίος εν τέλει αντιπροσωπεύει τα αποτελέσματα που λήφθηκαν.

Με τη χρήση ενός ειδικού εργαλείου: scraper ξύνεται ελαφρά ο πυθμένας κάθε πηγαδιού του 6-well plate και συλλέγονται 0,75μL σε ξεχωριστό eppendorf με αναγραφόμενη την εκάστοτε συνθήκη και ημερομηνία. Αυτό επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά ενώ γίνεται χρήση διαφορετικού scraper για κάθε συνθήκη. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν στα eppendorf τους υπόκεινται σε φυγόκεντρη στους 4°C σε 2.000 rpm. για 5 min, αφότου η φυγόκεντρος είχε υποβληθεί σε σύστημα fast cool στους 4°C . Έπειτα αφαιρείται το υπερκείμενο με προσοχή και τα δείγματα τοποθετούνται ξανά στον πάγο.

Λύση κυττάρων

Εκ παραλλήλου δημιουργείται το τελικό lysis buffer:

Συστατικά	Ποσότητες (μL)
Lysis buffer	500
Protease inhibitors	5
PMSF	2,5
DTT	1

Πίνακας 14: Απεικόνιση συστατικών του τελικού lysis buffer που χρησιμοποιήθηκε.

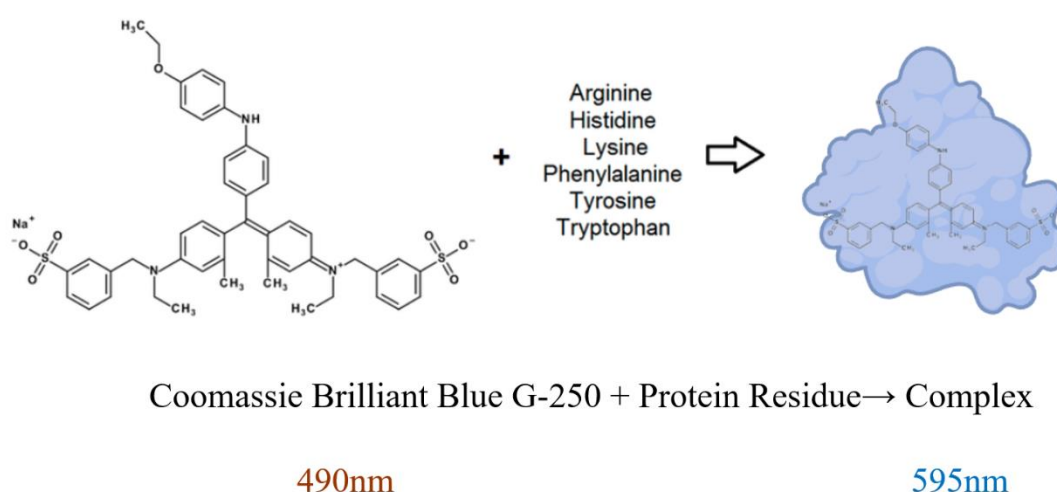
Το τελικό lysis buffer αποτελείται από lysis buffer, protease inhibitors, PMSF, DTT στις ποσότητες που αναγράφονται στον παραπάνω πίνακα. Μετά τη δημιουργία του buffer προστίθενται τα επιθυμητά μl lysis buffer, ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος, σε κάθε δείγμα και επωάζονται για 30 min.

Λύση με υπερήχους/Sonication

Με το πέρας της επώασης πραγματοποιείται sonication με το μηχάνημα υπερήχων (Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S) με εφαρμογή 5 κύκλων για το κάθε δείγμα. Πραγματοποιείται πίεση του start button για 2 sec και ο ένας κύκλος απέχει 30 sec απ' τον επόμενο.

Bradford

Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων ακολουθείται απ' την χρωματογραφική μέθοδο Bradford για τον υπολογισμό συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στο εκάστοτε βιολογικό δείγμα. Η βάση της μεθόδου στηρίζεται στη χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία σε όξινες συνθήκες μετατρέπεται από καφέ-κόκκινη σε μπλε. Η χρωστική αυτή προσδένεται με τις πρωτεΐνες και ειδικότερα στα κατάλοιπα λυσίνης που περιέχονται στο εκάστοτε διάλυμα που εξετάζεται. Αυτή η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα 595nm. Το αντιδραστήριο Bradford του εργαστηρίου χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1X. Μετά την προσθήκη του σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες τύπου erppendorf, όπου έχει ήδη προστεθεί το δείγμα σε συγκέντρωση 1/1.000, ακολουθεί vortex και επώαση των δειγμάτων για 30-45 min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature, RT). Με την πάροδο αυτού του χρόνου τα δείγματα μεταφέρονται από το χώρο όπου επωάζονταν και φωτομετρούνται στα 595nm. Το φωτόμετρο μηδενίζεται με το τυφλό, το οποίο περιέχει μόνο το lysis buffer, με την ποσότητα του να είναι ίση με την ποσότητα του δείγματος που προστέθηκε στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Τελικά, η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος υπολογίζεται από την εξίσωση που προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA που έγινε στο εργαστήριο. Η ακριβής σύσταση των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση προκύπτει από την ανάλυση των δεδομένων με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος excel.



Εικόνα 13: Απεικόνιση της αντίδρασης της χρωματογραφικής μεθόδου Bradford. Η εικόνα δημιουργήθηκε με τη χρήση του προγράμματος BioRender.

Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Εφόσον έχει υπολογισθεί η σύσταση ώστε όλα τα δείγματα να έχουν την ίδια συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). Σε αυτόν τον τύπο ηλεκτροφόρησης ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με βάση *μόνο* το μοριακό τους βάρος, καθώς γίνεται χρήση του απορρυπαντικού δωδεκανοθειϊκού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulfate: SDS) ως βασικό συστατικό της πηκτής. Το SDS μετουσιώνει τις πρωτεΐνες φορτίζοντάς τις αρνητικά με αποτέλεσμα να προσδίδει ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα. Τελικά, οι πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους κινούνται γρηγορότερα και περισσότερο από αυτές με μεγαλύτερο, καθώς το μεγαλύτερο μέγεθος αυξάνει την τριβή και μειώνει την κινητικότητα.

Δημιουργία τελικής μορφής δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση

Προτού παρασκευασθεί η πηκτή, πραγματοποιείται η δημιουργία “δειγμάτων ηλεκτροφόρησης”. Τα δείγματα αυτά περιέχουν πάντα: κυτταρικό εκχύλισμα (cell extract) και sample buffer 4X, αν ο τελικός όγκος δεν έχει καλυφθεί απ’ τα προαναφερθέντα συστατικά τότε συμπληρώνεται το Tris-HCl pH=7,5. Επειδή είναι επιθυμητή η ισοφόρτωση των δειγμάτων στα πηγαδάκια της πηκτής για τη σωστή αξιολόγηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης κάθε δείγματος, έτσι υπολογίζεται η συγκέντρωση των δειγμάτων και η απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος αυτών μέσω της πρότυπης καμπύλης από τη μέθοδο Bradford. Σε όλα τα δείγματα προστίθεται τελευταίο το sample buffer, ενώ συνεχώς κατά την παρασκευή τους τα δείγματα βρίσκονται στον πάγο. Το sample buffer είναι ένας αναγωγικός παράγοντας αποτελούμενος από διθειοθρεϊτόλη (DTT) και β-μερκαπτοαιθανόλη. Το buffer αυτό διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς καταργώντας την τρισδιάστατη δομή των πρωτεϊνών. Αφού έχει ολοκληρωθεί η δημιουργία της τελικής μορφής των δειγμάτων, τοποθετούνται στο heat block και θερμαίνονται στους 95°C για 5 min. Μετά τη θέρμανση ακολουθεί φυγοκέντρωση στιγμιαία σε Vmax (spin). Παράλληλα με τα δείγματα αναλύεται και ένα μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (protein marker), που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες μοριακών μεγεθών.

Δημιουργία πηκτωμάτων πολυακρυλαμίδης

Αρχικά δημιουργείται το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) που έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδα. Πιο συγκεκριμένα, σε αυτή τη μελέτη η περιεκτικότητά της ήταν της τάξης του 10%.

Οι πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους διαχωρίζονται καλά σε μεγάλης συγκέντρωσης πηκτής ακρυλαμιδίου. Έτσι, επειδή οι πρωτεΐνες στόχοι βρίσκονται μεταξύ 15-70kDa επιλέχθηκε η 10% συγκέντρωση ακρυλαμίδης.

% Acrylamide	Best resolution range (kDa)
5	25-200
10	15-70
15	12-45

Πίνακας 15: Απεικόνιση αναλογίας ποσοστού ακρυλαμίδης σε σχέση με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών στόχων.

Τα συστατικά του πηκτώματος διαχωρισμού αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Separating gel	
ddH ₂ O	2,425mL
Tris-HCl (pH=8,8) 1,5M	1,25mL
SDS 10%	50μL

Acrylamide	1,25mL
APS	25μL
TEMED	2,5μL

Πίνακας 16: Συστατικά του πηκτώματος διαχωρισμού

Εν συνεχεία, το τζελ διαχωρισμού προστίθεται στο ειδικό τμήμα της συσκευής της ηλεκτροφόρησης και ακολουθείται από προσθήκη ddH₂O. Παράλληλα δημιουργείται και το πήκτωμα συμπύκνωσης (stacking gel) με τα συστατικά του να αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Με το πέρας 25-30 min αφαιρείται το ddH₂O που είχε προστεθεί πάνω απ' το τζελ διαχωρισμού και προστίθεται το τζελ συμπύκνωσης. Την ίδια στιγμή τοποθετείται το αντικείμενο που θα σχηματίσει τα πηγαδάκια στο τζελ συμπύκνωσης.

Stacking gel	
ddH ₂ O	2,025mL
Tris-HCl (pH=6,8) 1,5M	0,21mL
SDS 10%	25μL
Acrylamide	0,25mL
APS	12,5μL
TEMED	2,5μL

Πίνακας 17: Συστατικά του πηκτώματος συμπύκνωσης

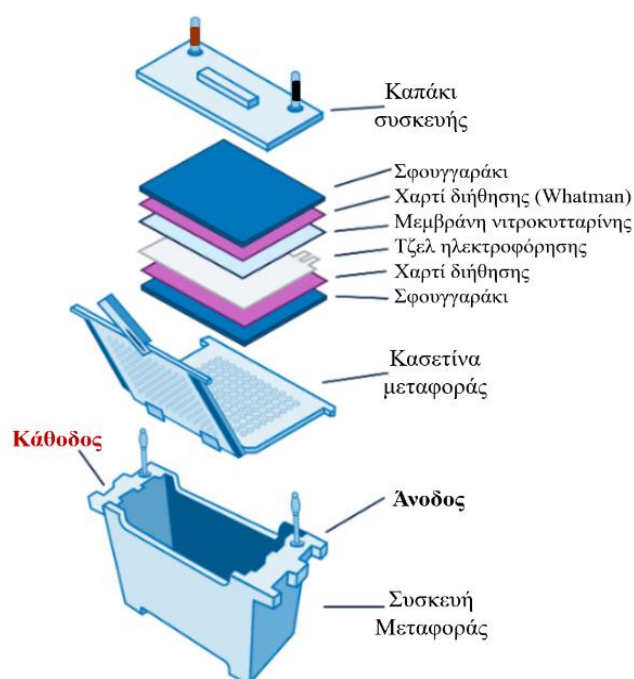
Να σημειωθεί πως είναι υψίστης σημασίας όλα τα συστατικά να έχουν προστεθεί ακριβώς στις αναγραφόμενες ποσότητες. Το Tris-HCl δρα ως ρυθμιστικό διάλυμα ώστε το pH να παραμείνει σταθερό, το APS (Ammonium Persulfate: Υπερθεϊκό Αμμώνιο) είναι ένα αντιδραστήριο σχηματισμού ελευθέρων ριζών και είναι ο εναρκτήριο παράγοντας του πολυμερισμού των μονομερών της ακρυλαμίδης οπότε πρέπει να προστίθεται κάθε φορά στην παρασκευή ενός πηκτώματος τελευταίο, ενώ το TEMED (N, N, -τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη) δρα ως αντιδραστήριο καταλύτης και άρα επιταχύνει τον πολυμερισμό. Η ακρυλαμίδα και το TEMED είναι φωτοευαίσθητα, ενώ το APS είναι θερμοευαίσθητο.

Όταν η πηκτή είναι έτοιμη μεταφέρεται στη βάση της συσκευής της ηλεκτροφόρησης και προστίθεται σε αυτή το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (running buffer 1X), με ακόλουθο βήμα την αφαίρεση του αντικειμένου που σχηματίζει τα πηγαδάκια στην πηκτή. Σε αυτό το σημείο είναι δυνατό το "φόρτωμα" των δειγμάτων στην πηκτή. Πρώτα "φορτώνεται" ο protein marker και στη συνέχεια τα δείγματα με τη σειρά που έχουμε ορίσει στο πείραμα. Τελικά τοποθετείται το τελευταίο κομμάτι της συσκευής και εφαρμόζονται 90 Volt για 1,5-2h.

Κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης οι πρωτεΐνες, στην αρχή, τοποθετούνται στο πήκτωμα συμπύκνωσης που έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο και ο διαχωρισμός τους πραγματοποιείται, όταν περάσουν στο πήκτωμα διαχωρισμού, καθώς εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο και εφόσον όλες έχουν φορτιστεί αρνητικά κινούνται προς την κάθοδο (θετικός πόλος).

Εξισορρόπηση/ Μεταφορά

Αφότου ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται το πιο πρόσφατα παρασκευασμένο transfer buffer για την εμβάπτιση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, καθώς και των σφουγγαριών και διηθητικών χαρτιών που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την εξισορρόπηση/ μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Το τζελ της ηλεκτροφόρησης αφαιρείται απ' τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και εμβαπτίζεται στο λιγότερο πρόσφατο transfer buffer. Οι εμβαπτίσεις διαρκούν για περίπου 15min και πραγματοποιούνται προκειμένου να εξισορροπηθούν το τζελ και η μεμβράνη και να μην είναι απότομη η τοποθέτησή τους σε ένα διαφορετικό περιβάλλον από αυτό που βρισκόταν. Κατόπιν, στην ανοιχτή κασετίνα προστίθεται το 1ο σφουγγαράκι και πάνω από αυτό το 1ο whatman. Ένα 2ο whatman ευθυγραμμίζεται με το τζελ, που βρίσκεται στο transfer buffer και μαζί τοποθετούνται πάνω απ' το 1ο



Εικόνα 14: Απεικόνιση της συσκευής με την οποία πραγματοποιείται το στάδιο της εξισορρόπησης/ μεταφοράς των δειγμάτων στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

whatman. Στη συνέχεια, τοποθετείται ευθυγραμμισμένα η μεμβράνη και χρησιμοποιείται ένα αντικείμενο με λεία επιφάνεια ασκώντας λίγη πίεση για να διωχθεί τυχόν παγιδευμένος αέρας. Έπειτα τοποθετούνται το 3ο και 4ο whatman ενώ στο ενδιάμεσο έχει διωχθεί πάλι τυχόν αέρας. Τέλος, προστίθεται το 2ο σφουγγαράκι και κλείνει η κασετίνα. Με το κλείσιμο της κασετίνας, αυτή τοποθετείται στη συσκευή μεταφοράς με βάση τις σωστές ενδείξεις χρωμάτων, ώστε τα χρώματα που αντιστοιχούν στην άνοδο και την κάθοδο να ταιριάζουν. Τελικά η συσκευή κλείνει πάλι με τη σωστή τοποθέτηση του καπακιού. Λόγω μεγάλης αύξησης θερμοκρασίας κατά αυτή τη διαδικασία η συσκευή τοποθετείται σε ένα φρενιζόλ που υπάρχουν περιμετρικά παγοκύστες. Η διαδικασία διαρκεί για 70 min και ρυθμίζεται στα 0,35 Αμπέρ.

Blocking/ Επώαση με αντισώματα

Ακολούθως της μεταφοράς αφαιρείται απ' την κασετίνα η μεμβράνη, στην οποία και έχει μεταφερθεί οτιδήποτε υπήρχε στο τζελ, και εμβαπτίζεται σε TBST buffer. Έπειτα, η μεμβράνη τοποθετείται σε διάλυμα γάλακτος 10% w/v υπό ανάδευση για 1h. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται blocking και πραγματοποιείται με σκοπό τον αποκλεισμό των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης που θα μπορούσε να δεθεί το πρωτογενές αντίσωμα και έτσι να αποκλεισθεί η μη ειδική σύνδεση του αντισώματος. Επόμενο βήμα αποτελούν οι δύο πλύσεις της μεμβράνης με TBST buffer και μετά κατασκευάζεται ένα περιβάλλον που περιέχει η μεμβράνη και προστίθεται το πρωτογενές αντίσωμα. Η μεμβράνη τίθεται υπό ανάδευση και το 1ο γενές αντίσωμα μένει ολονυκτίς. Την επόμενη ημέρα αφαιρείται το 1ο γενές αντίσωμα και η μεμβράνη υπόκειται σε πέντε πλύσεις, με TBST, των 5 min υπό ανάδευση. Ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα για 1h υπό ανάδευση. Το TBST είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που δημιουργείται απ' την αραιώση του stock TBS10X και την προσθήκη μικρής ποσότητας του απορρυπαντικού tween-20. Το tween δρα ως αρωγός για την

καλύτερη σύνδεση του αντισώματος. Επιπροσθέτως, το TBST χρησιμοποιείται για τη δημιουργία του τελικού πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος που θα χρησιμοποιηθούν για τη συγκεκριμένη τεχνική. Για τη δημιουργία του δευτερογενούς αντισώματος προστίθεται σε falcon των 50mL 2% w/v γάλακτος, TBST μέχρι να φτάσει η ένδειξη στον επιθυμητό τελικό όγκο και μικρή ποσότητα δευτερογενούς αντισώματος που είναι αντίστοιχη του τελικού όγκου που επιλέγεται.

Εμφάνιση σήματος χημειοφωταύγειας

Για να ξεκινήσει η διαδικασία της εμφάνισης χρειάζονται τρεις πλύσεις των 5 min της μεμβράνης μετά την επώαση και με το δευτερογενές αντίσωμα. Έπειτα η μεμβράνη τοποθετείται σε μια πλαστική πλάκα και προστίθεται πάνω από το σημείο που βρίσκεται το μοριακό βάρος της επιθυμητής πρωτεΐνης υπολογισμένος ισόποσος όγκος των αντιδραστηρίων ECL_{A&B}. Επιτρέπεται η δράση των αντιδραστηρίων για 3 min στο σκοτάδι. Με το πέρας του χρόνου η μεμβράνη τοποθετείται στην ειδική κασετίνα και ακολουθεί η συνέχεια της διαδικασίας στον σκοτεινό θάλαμο εμφάνισης. Σε αυτό το σημείο τοποθετείται προσεκτικά X ray φιλμ μέσα στην κασετίνα για όσο χρόνο χρειάζεται η εκάστοτε πρωτεΐνη. Στη συνέχεια το φιλμ εμβαπτίζεται σε δοχείο που περιέχεται το αντιδραστήριο developer για την ανάπτυξη του σήματος, μετά σε ένα δοχείο με νερό, έπειτα σε δοχείο που περιέχεται το fixer για τη μονιμοποίηση του σήματος και τέλος στο δοχείο με το νερό. Αργότερα χρησιμοποιείται ο stratagen που υπάρχει στην κασετίνα, ώστε να σημειωθεί η σωστή πλευρά από το φιλμ και να άρα να έχει γίνει σωστή αποτύπωση των δεδομένων. Αφού ολοκληρωθεί και αυτό το βήμα η ανοσοαποτύπωση κατά Western έχει ολοκληρωθεί και τελικό βήμα αποτελεί η υπολογιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων που έχουν αποτυπωθεί στο φιλμ.

- ❖ Κατά την εκτέλεση της τεχνικής αυτής χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα για την β-ακτίνη, τον υποδοχέα οιστρογόνων άλφα και του δείκτη διαφοροποίησης β III-τουμπουλίνη, Tuj-1. Η β-ακτίνη χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από τον ERα και την β III-τουμπουλίνη, ακόμα, αυτή χρησιμοποιήθηκε για την απόδειξη ότι τα κύτταρα πέρασαν από το στάδιο της διαφοροποίησης.

Υπολογιστική επεξεργασία

Τόσο κατά τη διάρκεια όσο και με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας ήταν απαραίτητη η υπολογιστική επεξεργασία. Ειδικότερα, έγινε χρήση του *Microsoft Office Excel*, του προγράμματος *Image J* και της εφαρμογής *Adobe Photoshop CS*. Το πρώτο χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ποσότητας των πρωτεϊνών (με τη μέθοδο Bradford), για τον υπολογισμό της σύστασης των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση καθώς και για κανονικοποίηση και γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων ανοσοαποτύπωσης. Το δεύτερο και το τρίτο, χρησιμοποιήθηκαν για την απεικονιστική ανάλυση των σημάτων χημειοφωταύγειας από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

2.3 Αποτελέσματα

2.3.1 Έλεγχος υποκυτταρικής μετατόπισης του ERβ σε σύστημα διαφοροποιημένων κυττάρων SH-SY5Y

Κάτωθι σημειώνονται τα αποτελέσματα της ανοσοκυτταροχημείας ενός συστήματος διαφοροποιημένων και μη κυττάρων SH-SY5Y, της έκτης ημέρας διαφοροποίησης, με στόχο τη διερεύνηση της υποκυτταρικής εντόπισης του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα σε πυρήνα και μιτοχόνδρια. Πιο αναλυτικά, το σύστημα διαφοροποιημένων και μη κυττάρων δημιουργήθηκε με την καλλιέργεια των SH-SY5Y σε δύο 6 well plates. Στο πρώτο επιστρώθηκαν 80.000 c/w και καλλιεργήθηκαν τα κύτταρα που θα παρέμεναν μη διαφοροποιημένα (N.D). Το αρχικό θρεπτικό μέσο στο οποίο αναπτύχθηκαν ήταν low glucose, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine. Μετά από 48h το θρεπτικό ανανεώθηκε σε low glucose, χωρίς phenol red, 10% v/v cis, 1% v/v P/S, 1%v/v L-glutamine. Με την αλλαγή του FBS σε cis επιτυγχάνεται η στέρηση αναπτυξιακών παραγόντων και ορμονών. Ανά 48h πραγματοποιούνταν η ανανέωση του προαναφερθέντος θρεπτικού έως την τελευταία, έκτη μέρα (Day 6). Επίσης, την έκτη μέρα με την ανανέωση του θρεπτικού πραγματοποιήθηκε και η προσθήκη της χρωστικής CMX σε τελική συγκέντρωση 200 nM. Στο πείραμα ελέγχθηκε η πιθανή υποκυτταρική εντόπιση του ERβ παρουσία και απουσία 10^{-9} M E2. Στη συνθήκη απουσία ορμόνης προστέθηκε μόνο ο διαλύτης της E2 (EtOH). Και στις δύο περιπτώσεις, παρουσία CMX. Ακολούθησε επώαση για 30-45 min και τέλος η συλλογή των κυττάρων.

Στο δεύτερο 6 well plate καλλιεργήθηκαν τα κύτταρα που θα διαφοροποιούνταν (DIF). Ομοίως με τα N.D, επιστρώθηκαν 80.000 c/w σε αρχικό θρεπτικό μέσο low glucose, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine. Την ημέρα μηδέν το θρεπτικό άλλαξε σε θρεπτικό διαφοροποίησης: low glucose, με phenol red, 1% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1%v/v L-glutamine και 10 μ M ρετινοϊκό οξύ (RA). Μετά από 48h (Day 2) έγινε η ανανέωση του θρεπτικού διαφοροποίησης με το θρεπτικό low glucose, 1% v/v FBS cis, 1%v/v P/S, 1%v/v L-glutamine και 10 μ M ρετινοϊκό οξύ (RA), χωρίς phenol red. Ο συνδυασμός του FBS cis και του ρετινοϊκού οξέος δίνουν ξεκάθαρο μήνυμα στα κύτταρα να σταματήσουν τον πολλαπλασιασμό, αφού στερούνται αναπτυξιακών παραγόντων (FBS cis), και να ξεκινήσουν τη διαφοροποίηση (RA). Για τις επόμενες δύο 48h πραγματοποιούνταν ανανέωση με το ίδιο θρεπτικό της Day 2. Την έκτη ημέρα και τελευταία μέρα, λοιπόν, τα κύτταρα βρισκόταν σε θρεπτικό low glucose, 1% v/v FBS cis, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine και 10 μ M ρετινοϊκό οξύ (RA), χωρίς phenol red. Όπως και τα N.D, τα διαφοροποιημένα είχαν δύο συνθήκες που αφορούσαν την προσθήκη ή όχι της ορμόνης. Η πρόσμιξη της CMX στο θρεπτικό της έκτης ημέρας, καθώς και η προσθήκη μόνο του διαλύτη ή/και της οιστραδιόλης έγινε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο και ποσότητες όπως στα μη διαφοροποιημένα. Ο χρόνος επώασης και η διαδικασία συλλογής των κυττάρων ήταν ίδια. Ακολούθησε η χρώση των πυρήνων των κυττάρων όλων των συνθηκών με τη χρωστική Hoechst-33342 και η σήμανση του ERβ με την εφαρμογή πρωτογενούς και δευτερογενούς αντισώματος. Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν σημασμένο με Alexa-488.

Αναλυτικότερα, με μπλε απεικονίζονται οι πυρήνες που έχει ενσωματωθεί η χρωστική Hoechst, με κόκκινο απεικονίζονται τα μιτοχόνδρια, στα οποία έχει ενσωματωθεί η χρωστική CMX και με πράσινο απεικονίζεται ο υποδοχέας οιστρογόνων βήτα με τη χρήση του δευτερογενούς αντισώματος anti rabbit Alexa-488. Η τέταρτη φωτογραφία κάθε τετράδας απεικονίζει τις τρεις πρώτες εικόνες συγχωνευμένες. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η παρακολούθηση συνεντοπισμού, καθώς αν ο υποδοχέας εμφανίσει μετατόπιση θα είναι αισθητή με την εμφάνιση της ανάμειξης των χρωμάτων. Αν εντοπιστεί στον πυρήνα το σκούρο μπλε θα εμφανιστεί ως γαλάζιο και αν εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια το κόκκινο θα εμφανιστεί ως πορτοκαλί-κίτρινο. Η σειρά με την οποία απεικονίζονται τα

αποτελέσματα των συνθηκών είναι: μη διαφοροποιημένα κύτταρα απουσία και παρουσία ορμόνης (Εικόνα 15_{A&B}), διαφοροποιημένα κύτταρα απουσία ορμόνης (Εικόνα 16_{A&B}) και διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσία ορμόνης (Εικόνα 17).

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανοσοκυτταροχημείας για τον υποκυτταρικό έλεγχο του ERβ σε σύστημα *μη διαφοροποιημένων* κυττάρων SH-SY5Y, *απουσία* της ορμόνης E2 (Εικόνα 15A). Η μιτοχονδριακή εντόπιση του υποδοχέα οιστρογόνων β (ERβ) είναι διακριτή παρατηρώντας τις εικόνες CMX (Εικόνα 15A₂) και ERβ (Εικόνα 15A₃), ενώ ο εντοπισμός αυτός επιβεβαιώνεται και στην Merge (Εικόνα 15A₄).

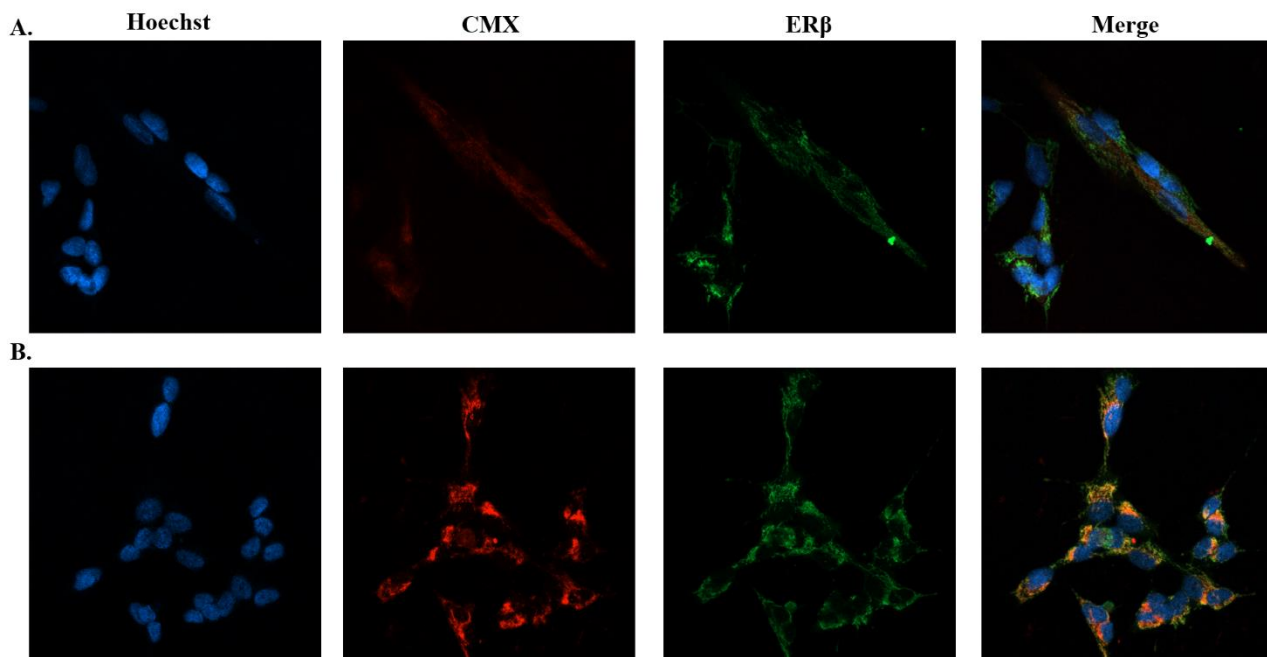
Στην εικόνα 15B διακρίνονται τα αποτελέσματα για το σύστημα *μη διαφοροποιημένων* κυττάρων SH-SY5Y *παρουσία* της ορμόνης E2. Φαίνεται πως ο υποδοχέας οιστρογόνων β (ERβ) παραμένει, και σε αυτή τη συνθήκη, στα μιτοχόνδρια των *μη διαφοροποιημένων* κυττάρων χωρίς κάποια μετατόπιση στον πυρήνα. Πιο συγκεκριμένα, ο φθορισμός στην εικόνα ERβ φαίνεται να ταυτίζεται ακριβώς με τα σημεία φθορισμού της CMX, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη συγχώνευση των φωτογραφιών με την εμφάνιση του πορτοκαλί χρώματος, άρα και συνεντοπισμού.

Τόσο στη 15_A όσο και στη 15_B φαίνεται ξεκάθαρα το στρογγυλό σχήμα των κυττάρων καθώς και η μορφή νευροβλάστης, που είναι αναμενόμενο στα *μη διαφοροποιημένα* κύτταρα.

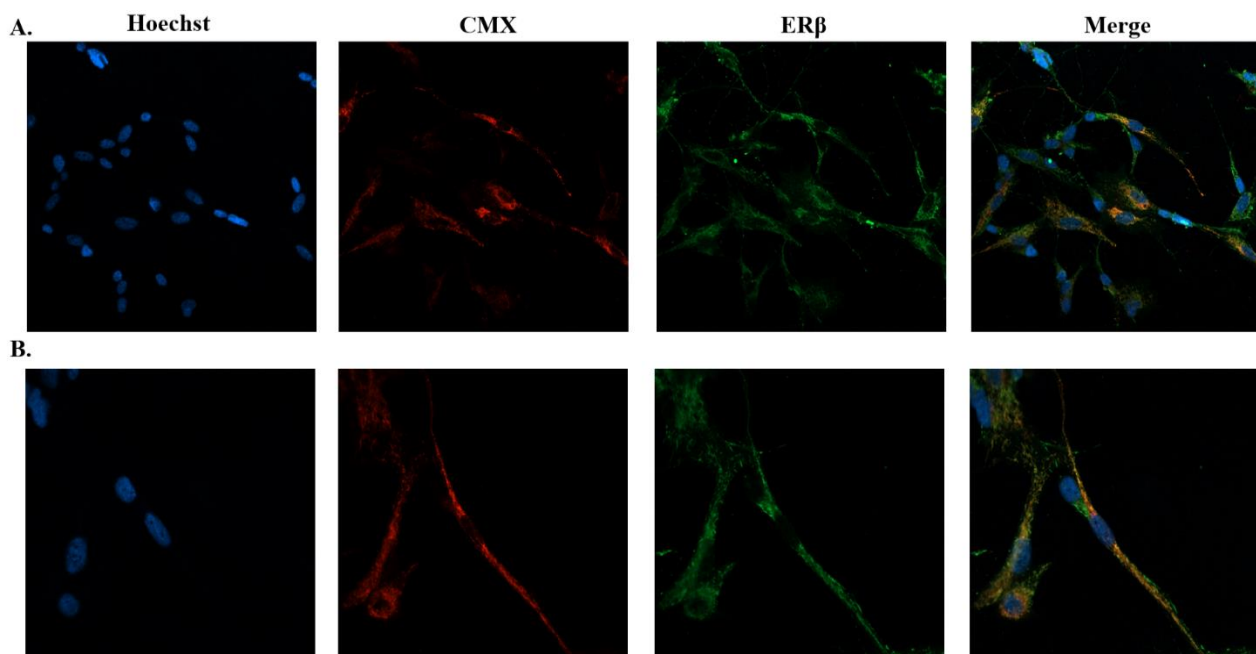
Στην επακόλουθη εικόνα οι συνθήκες που απεικονίζονται αφορούν τη συνθήκη των *διαφοροποιημένων* κυττάρων *απουσία* της E2 (Εικόνα 16A&B). Κοιτάζοντας τόσο τις μεμονωμένες εικόνες των CMX & ERβ όσο και στη Merge φαίνεται η ξεκάθαρη παρουσία του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια. Πάλι, και σε αυτή τη συνθήκη δεν φαίνεται κάποια πυρηνική εντόπιση του υποδοχέα.

Η τελευταία εικόνα αποτελεσμάτων της ανοσοκυτταροχημείας απεικονίζει τη συνθήκη των *διαφοροποιημένων* κυττάρων *παρουσία* της E2 (Εικόνα 17). Η κατανομή του υποδοχέα μοιάζει με αυτή της συνθήκης υπό εξέταση (*διαφοροποιημένα απουσία ορμόνης*), αφού παρατηρούνται τα σημεία φθορισμού απεικόνισης του ERβ να ταυτίζονται σε μεγάλο ποσοστό με τα σημεία φθορισμού της CMX. Ακόμα, και στα αποτελέσματα της Merge φαίνεται ο συνεντοπισμός μέσω του πορτοκαλί χρώματος που δημιουργείται. Όπως και στη συνθήκη *μη διαφοροποιημένων* κυττάρων *παρουσία* ορμόνης, ο ERβ δε φαίνεται να μετατοπίζεται στον πυρήνα.

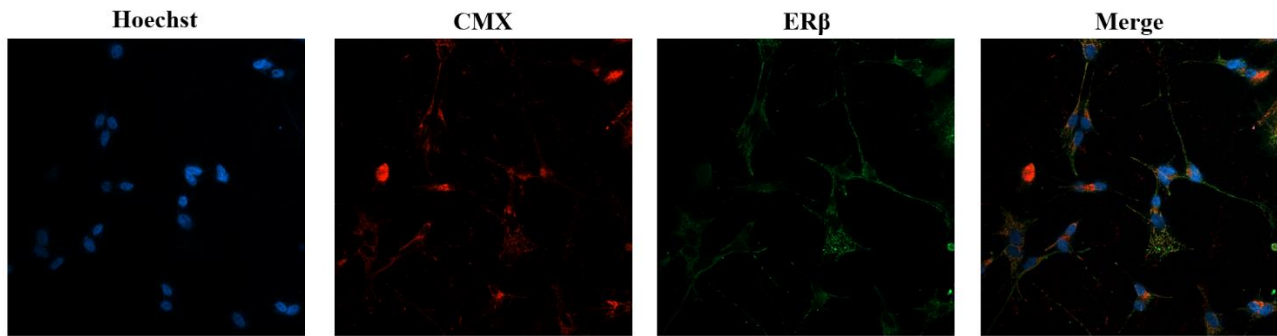
Στις εικόνες 16 και 17 τα κύτταρα φαίνεται να παρουσιάζουν ακτινωτό σχήμα με άξονες και να δημιουργούν μεταξύ τους νευρωνικό δίκτυο, γεγονός που είναι χαρακτηριστικό στα διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα. Άρα υπάρχει επιβεβαίωση από τις εικόνες των αποτελεσμάτων πως τα κύτταρα υπό μελέτη όντως διαφοροποιήθηκαν.



Εικόνα 15: Διερεύνηση της υποκυτταρικής εντόπισης του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα κατά την 6^η ημέρα καλλιέργειας των μη διαφοροποιημένων SH-SY5Y κυττάρων, απουσία (A) και παρουσία (B) της οιστραδιόλης, με εφαρμογή ανοσοκυτταροχημείας. Παρατηρείται μιτοχονδριακή εντόπιση του υποδοχέα. Ένδειξη μη διαφοροποίησης των κυττάρων είναι το στρογγυλό σχήμα των κυττάρων με τη μορφολογία νευροβλάστης. A. Σύστημα μη διαφοροποιημένων κυττάρων απουσία ορμόνης. B. Σύστημα μη διαφοροποιημένων κυττάρων παρουσία ορμόνης



Εικόνα 16: Διερεύνηση της υποκυτταρικής εντόπισης του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα κατά την 6^η ημέρα διαφοροποίησης των SH-SY5Y κυττάρων, απουσία της οιστραδιόλης, με εφαρμογή ανοσοκυτταροχημείας. Παρατηρείται μιτοχονδριακή εντόπιση του υποδοχέα. Ένδειξη διαφοροποίησης των κυττάρων είναι η δημιουργία δικτύου που τα ενώνει μεταξύ τους, καθώς και η ακτινωτή μορφολογία τους. A. Απεικόνιση του δικτύου που δημιουργούν τα διαφοροποιημένα κύτταρα. B. Απεικόνιση μεμονωμένου, διαφοροποιημένου κυττάρου με τον άξονα που έχει σχηματίσει.



Εικόνα 17: Διερεύνηση της υποκυτταρικής εντόπισης του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα κατά την 6^η ημέρα διαφοροποίησης των SH-SY5Y κυττάρων, παρουσία της οιστραδιόλης, με εφαρμογή ανοσοκυτταροχημείας. Παρατηρείται μιτοχονδριακή εντόπιση του υποδοχέα. Ένδειξη διαφοροποίησης των κυττάρων είναι η δημιουργία δικτύου που τα ενώνει μεταξύ τους, καθώς και η ακτινωτή μορφολογία τους.

2.3.2 Έλεγχος μεταβολής πρωτεϊνικών επιπέδων ERα σε σύστημα διαφοροποιημένων κυττάρων SH-SY5Y παρουσία και απουσία στεροειδών ορμονών

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα από τη μελέτη της πιθανής μεταβολής επιπέδων του υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (ERα) και του δείκτη διαφοροποίησης νευρικών κυττάρων β III-τουμπουλίνη (Tuj-1) σε ένα σύστημα μη διαφοροποιημένων και διαφοροποιημένων SH-SY5Y κυττάρων απουσία και παρουσία στεροειδών ορμονών. Αναλυτικότερα, το σύστημα διαφοροποιημένων και μη κυττάρων δημιουργήθηκε με την καλλιέργεια των SH-SY5Y σε δύο 6 well plates. Στο πρώτο καλλιεργήθηκαν τα κύτταρα που θα παρέμεναν μη διαφοροποιημένα (N.D). Την ημέρα μηδέν (Day 0) επιστρώθηκαν 250.000 c/w σε θρεπτικό DMEM καλλιέργειας low glucose με phenol red με 10% v/v FBS και θα αφορούσαν τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Μετά από 48h μέχρι και την έκτη μέρα που θα συλλέγονταν βρισκόταν σε θρεπτικό μέσο 10% v/v FBS cis σε DMEM low glucose, w/o phenol red, ενώ την τέταρτη ημέρα (Day 4) μαζί με το θρεπτικό πραγματοποιήθηκε η προσθήκη των στεροειδών ορμονών E2, DEX & DPN, διαλυμένες σε EtOH και DMSO, με τελικές συγκεντρώσεις 10^{-9} M και 10^{-8} M για τις δύο τελευταίες. Στη συνθήκη απουσίας ορμονών πραγματοποιήθηκε προσθήκη μόνο της EtOH και του DMSO σε αναλογία 1/1.000 v/v. Τέλος, την έκτη μέρα (Day 6) συλλέχθηκαν τα κύτταρα σε διαφορετικά erpendorf με αναγεγραμμένες τις συνθήκες.

Αντίστοιχα, στο δεύτερο 6 well καλλιεργήθηκαν τα κύτταρα που θα διαφοροποιούνταν. Έγινε επίστρωση 250.000 c/w σε DMEM καλλιέργειας low glucose με phenol red με 10% v/v FBS. Την Day 0 το θρεπτικό που βρισκόταν ήταν θρεπτικό διαφοροποίησης: 1% v/v FBS complete σε DMEM low glucose με phenol red, παρουσία RA τελικής συγκέντρωσης 10μM. Την Day 2 άλλαξε το θρεπτικό σε θρεπτικό μέσο: 1% v/v FBS cis σε DMEM low glucose, w/o phenol red, παρουσία 10 μM RA. Με το πέρασ 48h το ίδιο θρεπτικό της Day 2 ανανεώθηκε, αλλά πρώτα έγινε προσθήκη των ορμονών E2, DEX & DPN, διαλυμένες σε EtOH και DMSO, με τελικές συγκεντρώσεις 10^{-9} M και 10^{-8} M για τις δύο τελευταίες. Στις συνθήκες διαφοροποιημένων κυττάρων απουσία ορμονών, στο στάδιο προσθήκης των ορμονών ακολουθήθηκαν τα ίδια βήματα με τη συνθήκη των μη διαφοροποιημένων. Την Day 6 έγινε η συλλογή των κυττάρων σε διαφορετικά erpendorf με αναγεγραμμένες τις συνθήκες.

Αφού πραγματοποιήθηκε όλη η προετοιμασία των κυττάρων που αναφέρθηκε προηγουμένως, ακολούθησε το πρωτόκολλο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της β- ακτίνης, του υποδοχέα οιστρογόνων άλφα και του δείκτη διαφοροποίησης β III-τουμπουλίνη. Τα αποτελέσματα από τα φιλμ υπέστησαν υπολογιστική επεξεργασία και προέκυψαν τα κάτωθι ευρήματα.

Στην εικόνα 18A παρουσιάζονται οι μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (ERα) και του δείκτη διαφοροποίησης νευρικών κυττάρων β III-τουμπουλίνη (Tuj-1) με μορφή λόγων ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης. Στην εικόνα 18B παρουσιάζονται οι ίδιες μεταβολές αλλά με διαγραμματική απεικόνιση σε όλες τις συνθήκες του πειράματος.

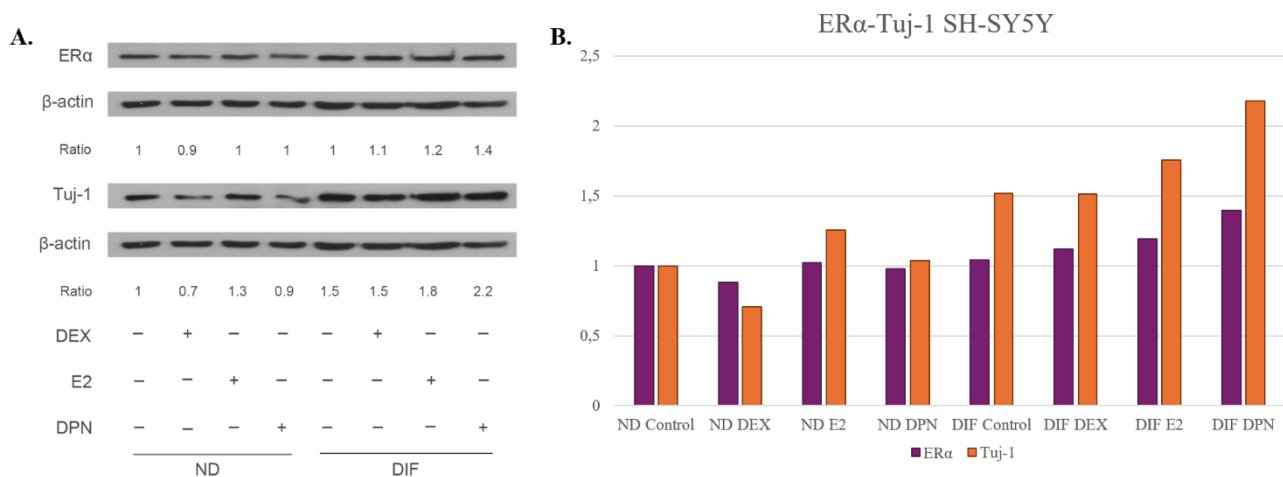
Ξεκινώντας με τη σύγκριση των επιπέδων του ERα και του Tuj-1 στα *μη διαφοροποιημένα* κύτταρα *απουσία* ορμονών και στα *διαφοροποιημένα* κύτταρα *απουσία* ορμονών, δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα, αλλά τα επίπεδα του δείκτη διαφοροποίησης αυξάνονται κατά 50%.

Παρατηρώντας τα επίπεδα του υποδοχέα και του δείκτη διαφοροποίησης στη συνθήκη *μη διαφοροποιημένων* κυττάρων *παρουσία* της DEX συγκριτικά με τη συνθήκη *μη διαφοροποιημένων*

κυττάρων απουσία ορμονών, τα επίπεδα του ERα δε φαίνεται να μεταβάλλονται, όμως του Tuj-1 εμφανίζονται μειωμένα κατά 30%. Στις συνθήκες διαφοροποιημένων κυττάρων απουσία ορμονών συγκριτικά με αυτή των διαφοροποιημένων παρουσία της DEX δεν παρουσιάζεται κάποια μεταβολή στα επίπεδα του υποδοχέα ή του δείκτη διαφοροποίησης.

Εν συνεχεία, στη συνθήκη μη διαφοροποιημένων κυττάρων παρουσία της E2 τα επίπεδα του ERα συνεχίζουν να μην μεταβάλλονται συγκριτικά με την τιμή που έχουν στη συνθήκη μη διαφοροποιημένων κυττάρων απουσία ορμονών, αλλά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του Tuj-1 εμφανίζουν αύξηση της τάξης του 30%. Στο σύστημα των διαφοροποιημένων κυττάρων παρουσία της E2 τα επίπεδα του ERα εμφανίζουν αύξηση 20% σε σύγκριση με τα επίπεδα ERα σε διαφοροποιημένα κύτταρα απουσία ορμόνης. Αντίστοιχα τα πρωτεϊνικά επίπεδα του Tuj-1 αυξάνονται κατά 30% συγκριτικά με τα επίπεδά τους στη συνθήκη διαφοροποιημένων κυττάρων απουσία ορμονών.

Τέλος, στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσία του DPN δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα και του Tuj-1. Εν αντιθέσει στα διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσία του DPN τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα και του Tuj-1 εμφανίζουν αύξηση της τάξης του 40% και 70% αντίστοιχα σε σύγκριση με τα επίπεδά τους στα διαφοροποιημένα κύτταρα απουσία ορμόνης.



Εικόνα 18: Α. Απεικόνιση της μεταβολής των επιπέδων του ERα και του Tuj-1 σε μορφή λόγου (ratio) ως προς τα επίπεδα της β-ακτίνης σε κάθε συνθήκη, σε ένα σύστημα μη διαφοροποιημένων και διαφοροποιημένων κυττάρων παρουσία και απουσία στεροειδών ορμονών. Β. Διαγραμματική απεικόνιση των λόγων ERα/β-ακτίνης και Tuj-1/β-ακτίνης της εικόνας Α.

3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα οιστρογόνα ανήκουν στην κατηγορία των στεροειδών ορμονών, με την 17β-οιστραδιόλη (E2) να αποτελεί την πιο δραστική μορφή από αυτά. Πολυάριθμες έρευνες τη δείχνουν να συμμετέχει στη ρύθμιση ποικίλων φυσιολογικών διεργασιών, καθώς και στη γήρανση και την παθολογία.^[17, 18] Αυτή η ρύθμιση επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων οιστρογόνων (Estrogen receptors: ERs), στους οποίους δρα ως προσδέτης. Οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν στην υπερικογενεία των υποδοχέων πυρηνικών ορμονών (Nuclear receptors: NRs) και διακρίνονται στους τύπους άλφα και βήτα (Estrogen receptor α: ERα & Estrogen receptor β: ERβ) εμφανίζοντας δράση μεταγραφικών παραγόντων. Τόσο ο ERα όσο και ο ERβ εμπλέκονται στη λειτουργία του αναπαραγωγικού, καρδιαγγειακού, μυϊκού, οστικού, ανοσολογικού και νευρικού συστήματος. Πιο εκτενώς με το ρόλο των υποδοχέων στη λειτουργία του νευρικού συστήματος, όλο και περισσότερη βιβλιογραφία εμφανίζεται τονίζοντας τη σημαντικότητα των ER τόσο κατά τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων όσο και στη νευροπροστασία.^[5, 30-36, 40]

Ο καταρράκτης σηματοδότησης που διαδέχεται την πρόσδεση της οιστραδιόλης στους υποδοχείς αφορά γονιδιακές και μη γονιδιακές αποκρίσεις. Αναφορικά με τις γονιδιακές αποκρίσεις, οι υποδοχείς βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ανενεργοί, συνδεδεμένοι με μοριακές πρωτεΐνες συνοδούς (chaperones). Με την πρόσδεση της οιστραδιόλης αυτοί ενεργοποιούνται, διμερίζονται και μετατοπίζονται είτε στον πυρήνα είτε στο μιτοχόνδριο για να ρυθμίσουν τη γονιδιακή έκφραση συγκεκριμένων στόχων τους. Επίσης, σε ορισμένους τύπους κυττάρων παρατηρείται εντόπιση των ERs στον πυρήνα, οι οποίοι παραμένουν ανενεργοί απουσία ορμόνης. Οι μη γονιδιακές αποκρίσεις σχετίζονται με την άμεση ή έμμεση σύζευξη των υποδοχέων με G πρωτεΐνες στη μεμβράνη του κυττάρου, όπου με την πρόσδεση της οιστραδιόλης ενεργοποιούν ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια κινασών, ρυθμίζοντας, έτσι, έμμεσα τη γονιδιακή έκφραση. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις, οι υποδοχείς εκδηλώνουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση, καθώς ο ρόλος των γονιδίων που ρυθμίζουν έγκειται στις παραπάνω φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου.^[7-10]

Σε αυτές τις λειτουργίες συμμετέχουν ενεργά και τα μιτοχόνδρια, όντας οι σημαντικότεροι πάροχοι ενέργειας του κυττάρου. Εκτός από την παροχή ενέργειας μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Oxidative phosphorylation: OXPHOS), παράγουν και μεγάλα ποσά ενεργών ριζών οξυγόνου (Reactive oxygen species: ROS) ως υποπροϊόν αυτής της διαδικασίας. Με τη συσσώρευση των ROS επέρχεται οξειδωτικό στρες, μία κατάσταση την οποία το μιτοχόνδριο ρυθμίζει μέσω της αύξησης ενδογενούς ασβεστίου και, με την παρεμβολή άλλων συμβάντων, το κύτταρο τελικά οδηγείται στην απόπτωση. Οι ROS, όμως, δεν αποτελούν μόνον ένα παράγοντα απόπτωσης αλλά διαθέτουν και ένα μονοπάτι σηματοδότησης που εμφανίζει ρόλο στη διαφοροποίηση κυττάρων του νευρικού ιστού. Ειδικότερα έχει αποδειχθεί πως η ενεργοποίηση του NRF2 (Nuclear Respiratory Factor 2) με διαμεσολάβηση ROS, ρυθμίζει τη διαφοροποίηση των νευρικών βλαστοκυττάρων (Neural stem cells: NSC), ένα από τα πολλά παραδείγματα του πως τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν στη διαδικασία της διαφοροποίησης, η οποία αποτελεί και αντικείμενο συγκεκριμένης μελέτης. Επιπρόσθετα, ένας άλλος τρόπος που το μιτοχόνδριο συμμετέχει στη διαφοροποίηση των κυττάρων είναι μέσω των διαδικασιών που σχετίζονται με τη μιτοχονδριακή δυναμική. Ειδικότερα, οι διαδικασίες αυτές περιλαμβάνουν τη δράση πρωτεϊνών μιτοχονδριακής σχάσης (fission) και σύντηξης (fusion), πολλά από τα γονίδια των οποίων ρυθμίζονται και από τους μιτοχονδριακούς υποδοχείς οιστρογόνων.^[43-49]

Λαμβάνοντας, λοιπόν, υπ' όψιν τον καίριο ρόλο που εμφανίζουν τα μιτοχόνδρια και οι υποδοχείς οιστρογόνων κατά τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων, η παρούσα ερευνητική εργασία παρακολουθεί τόσο την υποκυτταρική εντόπιση των υποδοχέων οιστρογόνων όσο και την πιθανή μεταβολή των πρωτεϊνικών τους επιπέδων κατά τις πρώτες έξι ημέρες διαφοροποίησης της κυτταρικής σειράς νευροβλαστώματος SH-SY5Y, υπό την επίδραση του παράγοντα διαφοροποίησης RA, παρουσία και απουσία στεροειδών ορμονών. Επιστημονικές μελέτες υποδηλώνουν τη σημαντικότητα της μετατόπισης των ER στα μιτοχόνδρια κατά τα στάδια διαφοροποίησης των νευρικών κυττάρων.^[38] Οπότε στόχος αυτής της μελέτης είναι να ελεγχθεί εάν ο ERβ μετατοπίζεται στον πυρήνα ή στα μιτοχόνδρια κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων SH-SY5Y, καθώς και η πιθανή μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα στο σύστημα διαφοροποιημένων και μη κυττάρων παρουσία ή απουσία στεροειδών ορμονών, εφαρμόζοντας τεχνικές όπως η ανοσοκυτταροχημεία και η ανοσοαποτύπωση.

Τα κύτταρα SH-SY5Y ως μη διαφοροποιημένα, παρουσιάζονται μικρά και στρογγυλεμένα με μια μορφολογία νευροβλάστης και, παράλληλα, έχουν την ικανότητα συνεχούς πολλαπλασιασμού σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Τα SH-SY5Y μπορούν να διαφοροποιηθούν σε διάφορους τύπους νευρικών κυττάρων με την προσθήκη ρετινοϊκού οξέος (RA) και νευροτροφινών, παρουσιάζοντας μια μορφολογία όμοια με τους πρωτογενείς νευρώνες και, συνάμα, εκφράζουν ειδικούς δείκτες διαφοροποίησης, όπως για παράδειγμα η β III-τουμπουλίνη (Tuj-1).^[57]

Για την επιτέλεση αυτής της ερευνητικής εργασίας πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη των κυττάρων SH-SY5Y σε δύο πιάτα καλλιέργειας έξι πηγαδιών (6-well culture plate), ώστε να χωριστούν με αυτόν τον τρόπο και οι συνθήκες του πειράματος. Ο χειρισμός των κυτταροκαλλιεργειών πραγματοποιήθηκε από τον υποψήφιο διδάκτορα Γεωργαντόπουλο Αχιλλέα. Στο πρώτο 6-well plate βρισκόταν τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα που θα λάμβαναν δράση control και στο δεύτερο πραγματοποιήθηκε η διαφοροποίηση των κυττάρων με την προσθήκη ρετινοϊκού οξέος. Τόσο στη μία όσο και στην άλλη περίπτωση η διαδικασία διήρκεσε έξι ημέρες. Με τη συλλογή των κυττάρων και με τη μετέπειτα χρώση τους με κατάλληλες φθορίζουσες χρωστικές ήταν δυνατή η παρακολούθηση της υποκυτταρικής κατανομής του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα μέσα στο κύτταρο. Οι χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι η Hoechst-33342 για τον πυρήνα, η CMX για τα μιτοχόνδρια και το δευτερογενές αντίσωμα του υποδοχέα που περιείχε την Alexa-488.

Τα αποτελέσματα έδειξαν τον ERβ, στο χρονικό διάστημα της διαφοροποίησης όπου εστιάζουμε, να παραμένει στο μιτοχονδριακό περιβάλλον χωρίς κάποια μεταβολή στην υποκυτταρική του κατανομή (σε πυρήνα, κυτταρόπλασμα). Ακόμα και στη συνθήκη παρουσίας της E2 τόσο στα μη διαφοροποιημένα όσο και στα διαφοροποιημένα κύτταρα, φαίνεται να μην μετατοπίζεται στον πυρήνα. Αυτό αποτελεί ένα εύρημα που υποστηρίζει την αναγκαιότητα της εντόπισης του υποδοχέα στο μιτοχόνδριο, ώστε να ρυθμίσει τον μεταβολισμό του κυττάρου μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των μιτοχονδριακών γονιδίων της OXPHOS και του NRF2, εμφανίζοντας έτσι καίριο ρόλο στη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων SH-SY5Y.^[29, 47]

Με τη λήψη αυτών των αποτελεσμάτων έλαβε μέρος το δεύτερο σκέλος του πειράματος που ήταν η εκτίμηση πιθανής μεταβολής των επιπέδων του ERα στις ίδιες συνθήκες που μελετήθηκαν και στην ανοσοκυτταροχημεία, με τη διαφορά πως συμπεριλήφθηκαν δύο ακόμα συνθήκες που αφορούσαν την προσθήκη ενός συνθετικού γλυκοκορτικοστεροειδούς φαρμάκου, τη δεξαμεθαζόνη (DEX) και ενός εξειδικευμένου αγωνιστή του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα, το διαρυλοπροπιονιτρίλιο (DPN). Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι η ανοσοαποτύπωση κατά Western. Εκτός από τη μέτρηση των επιπέδων των υποδοχέων μετρήθηκαν και τα επίπεδα του ειδικού δείκτη διαφοροποίησης βήτα III-

τουμπουλίνη (Tuj-1: Neuron-specific class III beta-tubulin), ώστε να υπάρχει επιπρόσθετη επιβεβαίωση, πέρα των μορφολογικών μεταβολών, πως τα κύτταρα έχουν διαφοροποιηθεί.

Στα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης των SH-SY5Y απουσία των στεροειδών ορμονών, ενώ παρατηρήθηκε μία αύξηση της τάξεως του 20% με 40% παρουσία των ορμονών E2 και DPN. Οι μεταβολές αυτές θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναυσμα για περαιτέρω έρευνα στο σηματοδοτικό μονοπάτι του ERβ και πως μπορεί να επηρεάζει τα επίπεδα του ERα ενεργοποιούμενος από τον εξειδικευμένο αγωνιστή του, DPN. Συνήθως οι δύο υποδοχείς εμφανίζουν ανταγωνιστικές δράσεις αλλά δεν είναι απαραίτητο πως κατά αυτά τα στάδια της διαφοροποίησης ακολουθούν τη συνήθη δράση τους.^[61]

Στον αντίποδα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του Tuj-1 αυξάνονται κατά 50% στα διαφοροποιημένα κύτταρα απουσία ορμονών, συγκριτικά με τα αντίστοιχα μη διαφοροποιημένα, γεγονός που υποδεικνύει την επιτυχή διαφοροποίηση των κυττάρων. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσία DEX και E2 φαίνεται να μειώνονται και να αυξάνονται τα επίπεδά του δείκτη διαφοροποίησης κατά 30% αντίστοιχα, αποτέλεσμα που μπορεί να ερμηνευθεί πως η DEX δεν ωθεί τα κύτταρα αυτά προς τη διαφοροποίηση αλλά αντίθετα η προσθήκη της E2 μπορεί δρα ως παράγοντας ώθησης των κυττάρων προς τη διαφοροποίηση. Ανάλογη δράση των οιστρογόνων, παρατηρείται και στα διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα. Βέβαια, παρουσία των E2 και DPN τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β III-τουμπουλίνης στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα παραμένουν σχεδόν αμετάβλητα σε σχέση με τα διαφοροποιημένα κύτταρα απουσία ορμόνης. Οι ενδείξεις αυτές συνάδουν με αποτελέσματα άλλων ερευνών που υποστηρίζουν πως τα οιστρογόνα επηρεάζουν και μπορεί να ωθούν τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων μέσω της «γονιδιακής» ή της «μη γονιδιακής» απόκρισης. Αναφορικά με την πρώτη περίπτωση, μία έρευνα των Brannvall et. al με τίτλο “Estrogen-Receptor-Dependent Regulation of Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation” βρήκαν πως η E2 μέσω ενεργοποίησης του ERβ επηρεάζει τις αποφάσεις της πορείας των εμβρυϊκών νευρικών βλαστοκυττάρων αρουραίων (NSC), προωθώντας τη διαφοροποίηση των νευρώνων σε σχέση με τα γλοιακά κύτταρα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των NSC.^[59] Όσον αφορά τη δεύτερη περίπτωση, μία έρευνα των Varea et al. με τίτλο “Oestradiol signaling through the Akt-mTORC1-S6K1” καταδεικνύει ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Akt-Rheb-mTORC1-S6K1 έχει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και μορφογένεση των νευρώνων με τη διαμεσολάβηση του υποδοχέα οιστρογόνων σε κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού N2A.^[60] Ακόμα, υπάρχει πληθώρα βιβλιογραφιών που υπογραμμίζουν τη σημαντικότητα του ERβ στη διατήρηση του πολλαπλασιασμού και της αυτοανανέωσης των νευρικών βλαστικών κυττάρων, καθώς και στη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων, έτσι δεν εμφανίζει έκπληξη πως με την προσθήκη του DPN, ενός εξειδικευμένου αγωνιστή του ERβ, οδηγεί σε μία τόσο μεγάλη αύξηση των επιπέδων της β III-τουμπουλίνης.^[38]

Συμπερασματικά, ο υποδοχέας οιστρογόνων βήτα (ERβ) φαίνεται να παραμένει στα μιτοχόνδρια κατά τα αρχικά στάδια διαφοροποίησης των ανθρώπινων νευρικών κυττάρων SH-SY5Y, χωρίς να παρατηρείται κάποια μετατόπισή του στον πυρήνα. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει την κρίσιμη σημασία της παραμονής του ERβ στο μιτοχονδριακό περιβάλλον, πιθανώς συμβάλλοντας στη ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό αλλά και τη μιτοχονδριακή δυναμική, τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαφοροποίηση των κυττάρων.

Ως προς τα αποτελέσματα του Western Blot, τα ολικά, πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα οιστρογόνων άλφα δε φαίνεται να μεταβάλλονται στις συνθήκες μη διαφοροποιημένων κυττάρων ούτε κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης των κυττάρων απουσία των στεροειδών ορμονών. Στα

διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσία E2 και DPN παρατηρείται μία αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων της τάξης του 20% και 40%. Αυτή η μεταβολή μπορεί να οφείλεται είτε στην απ' ευθείας δράση των ορμονών είτε στην έμμεση ενεργοποίηση ενός σηματοδοτικού μονοπατιού που επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα. Παράλληλα στο σύστημα μη διαφοροποιημένων κυττάρων με προσθήκη της DEX και της E2 τα επίπεδα της β III-τουμπουλίνης δείχνουν να μειώνονται και να αυξάνονται κατά 30% αντίστοιχα, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει πως η οιστραδιόλη δρα ως προωθητής της διαφοροποίησης σε αντίθεση με τη δεξαμεθαζόνη. Δράση η οποία μένει να επαληθευτεί με επιπλέον πειραματικές επαναλήψεις. Η παρατήρηση ότι η E2 πιθανόν να ενεργοποιεί τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων ενισχύεται και από την παρατήρηση ότι στα διαφοροποιημένα κύτταρα η προσθήκη της E2 και DPN προκάλεσε 30% και 70% αύξηση των επιπέδων του δείκτη διαφοροποίησης. Βιβλιογραφικά δεδομένα μπορούν να υποστηρίξουν τις ορμόνες αυτές ως σημαντικούς παράγοντες της διαφοροποίησης, ακολούθως και του ERβ, καθώς η εμπλοκή του σε αυτή τη διαδικασία είναι γνωστή.

Μελλοντικοί στόχοι μπορεί να αποτελέσουν η διερεύνηση της επίδρασης του DPN στη μεταβολή της υποκυτταρικής εντόπισης του ERβ κατά τη διαφοροποίηση SH-SY5Y κυττάρων με εφαρμογή της μεθόδου της ανοσοκυτταροχημείας. Επιπλέον, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η εκτίμηση των επιπέδων των υποδοχέων στα υποκυτταρικά διαμερίσματα, πυρήνα και μιτοχόνδριο με εφαρμογή υποκυτταρικής κλασμάτωσης και ανοσοαποτύπωσης. Τέλος, θα μπορούσαν να ελεγχθούν ταυτόχρονα με τα επίπεδα του ERα τα μετάγραφα, καθώς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα των πρωτεϊνών σχάσης, για παράδειγμα OMA1 & CHOP^[55], και άλλων ρυθμιστικών μορίων, που εμπλέκονται στη διαδικασία της διαφοροποίησης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον υποψήφιο διδάκτορα Γεωργαντόπουλο Αχιλλέα για την καθοδήγησή του και κυρίως την υπομονή του στη λύση των αποριών μου καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Άννα-Μαρία Ψαρρά για την, πολύ σημαντική για μένα, ευκαιρία να επιτελέσω την πτυχιακή μου εργασία υπό την επίβλεψή της.

Εννοείται πως ευχαριστώ θερμά και τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής της πτυχιακής μου εργασίας, τον κύριο Λεωνίδα Δημήτριο και την κυρία Σκαμνάκη Βασιλική.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους ανθρώπους που στάθηκαν δίπλα μου, όχι μόνο κατά τη διάρκεια της πτυχιακής, αλλά σε όλο το ταξίδι που βίωσα στο υπέροχο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Ευχαριστώ και τον εαυτό μου για την επιμονή που επέδειξα έως ότου πραγματοποιήσα το στόχο μου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Weikum, E. R., Liu, X., & Ortlund, E. A. (2018). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. In *Protein Science* (Vol. 27, Issue 11, pp. 1876–1892). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/pro.3496>
2. Aranda, A., & Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological Reviews*, 81(3), 1269–1304. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1269>
3. Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., & Rowan, B. G. (2012). Post-Translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nuclear Receptor Signaling*, 10(1), nrs.10001. <https://doi.org/10.1621/nrs.10001>
4. Jayaprakash, S., Hegde, M., Girisa, S., Alqahtani, M. S., Abbas, M., Lee, E. H. C., Yap, K. C., Sethi, G., Kumar, A. P., & Kunnumakkara, A. B. (2022). Demystifying the functional role of nuclear receptors in esophageal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10952. <https://doi.org/10.3390/ijms231810952>
5. Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S. A., Jordan, V. C., Katzenellenbogen, J. A., Korach, K. S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M. G., & Gustafsson, J. (2006). International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), 773–781. <https://doi.org/10.1124/pr.58.4.8>
6. Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., & Gustafsson, J. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews*, 81(4), 1535–1565. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1535>
7. Echeverria, P. C., & Picard, D. (2010). Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1803(6), 641–649. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.11.012>
8. Knoblauch, R., & Garabedian, M. J. (1999). Role for Hsp90-Associated Cochaperone p23 in Estrogen Receptor Signal Transduction. *Molecular and Cellular Biology*, 19(5), 3748–3759. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.5.3748>
9. Levin Ellis R., Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen, *Molecular Endocrinology*, Volume 19, Issue 8, 1 August 2005, Pages 1951–1959, <https://doi.org/10.1210/me.2004-0390>
10. Wang, J., Green, P. S., & Simpkins, J. W. (2001). Estradiol protects against ATP depletion, mitochondrial membrane potential decline and the generation of reactive oxygen species induced by 3-nitropropionic acid in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 77(3), 804–811. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00271.x>

11. Kumar, R., Zakharov, M. N., Khan, S. H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., Singh, R., Bhasin, S., & Jasuja, R. (2011). The dynamic structure of the estrogen receptor. *Journal of Amino Acids*, 2011, 1–7. <https://doi.org/10.4061/2011/812540>
12. Ng, H. W., Zhang, W., Shu, M., Luo, H., Ge, W., Perkins, R., Tong, W., & Hong, H. (2014). Competitive molecular docking approach for predicting estrogen receptor subtype α agonists and antagonists. *BMC Bioinformatics*, 15(S11). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-s11-s4>
13. Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., & Muramatsu, M. (1998). Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Research*, 26(15), 3505–3512. <https://doi.org/10.1093/nar/26.15.3505>
14. Delgado, B. J., & Lopez-Ojeda, W. (2023, June 26). *Estrogen*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538260/>
15. *ESR1 estrogen receptor 1 [Homo sapiens (human)]* - Gene - NCBI. (n.d.).
16. *ESR2 estrogen receptor 2 [Homo sapiens (human)]* - Gene - NCBI. (n.d.).
17. Mikosha, A. S., Kovzun, E. I., & Tronko, N. D. (2015). Biochemical effects of estrogens in non-reproductive organs. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 87(5), 10–23. <https://doi.org/10.15407/ubj87.05.010>
18. Luine, V. N. (2014). Estradiol and cognitive function: Past, present and future. *Hormones and Behavior*, 66(4), 602–618. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.08.011>
19. Gupta, P., Mahapatra, A., Suman, A., & Singh, R. K. (2021). Effect of endocrine disrupting chemicals on HPG axis: a reproductive endocrine homeostasis. In *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96330>
20. Protein Data Bank in Europe. (1993). *PDB 1hcq structure summary* < Protein Data Bank in Europe (PDBe) < EMBL-EBI. <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1hcq/index>
21. Sebastian, T., Sreeja, S., & Thampan, R. V. (2004). Import and export of nuclear proteins: Focus on the nucleocytoplasmic movements of two different species of mammalian estrogen receptor. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 260(1), 91–102. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000026060.81570.35>
22. Simpkins, J. W., Yang, S., Sarkar, S. N., & Pearce, V. (2008b). Estrogen actions on mitochondria—Physiological and pathological implications. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290(1–2), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.013>

23. Sabbah, M., Courilleau, D., Mester, J., & Redeuilh, G. (1999). Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: Involvement of a cAMP response-like element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11217–11222. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11217>
24. Helguero, L. A., Lindberg, K., Gardmo, C., Schwend, T., Gustafsson, J., & Haldosén, L. (2008). Different Roles of Estrogen Receptors α and β in the Regulation of E-Cadherin Protein Levels in a Mouse Mammary Epithelial Cell Line. *Cancer Research*, 68(21), 8695–8704. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-0788>
25. Hou, Y., Peng, Y., & Li, Z. (2022). Update on prognostic and predictive biomarkers of breast cancer. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 39(5), 322–332. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2022.06.015>
26. Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Scanlan, T. S., Shiau, A. K., Uht, R. M., & Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 74(5), 311–317. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(00\)00108-4](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(00)00108-4)
27. Kawiak, A., & Kostecka, A. (2022). Regulation of BCL-2 family proteins in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer and their implications in endocrine therapy. *Cancers*, 14(2), 279. <https://doi.org/10.3390/cancers14020279>
28. Stewart, M. K., Mattiske, D. M., & Pask, A. J. (2020). Estrogen suppresses SOX9 and activates markers of female development in a human testis-derived cell line. *BMC Molecular and Cell Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12860-020-00307-9>
29. Liao, T., Tzeng, C., Yu, C., Wang, Y., & Kao, S. (2015). Estrogen receptor- β in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1350(1), 52–60. <https://doi.org/10.1111/nyas.12872>
30. Murphy, E., & Steenbergen, C. (2014). Estrogen regulation of protein expression and signaling pathways in the heart. *Biology of Sex Differences*, 5(1), 6. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-5-6>
31. Mauvais-Jarvis, F. (2011). Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 22(1), 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.10.002>
32. Hewitt, S. C., & Korach, K. S. (2003). Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction*, 125(2), 143–149. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250143>
33. Noirrit-Esclassan, E., Valera, M., Tremollieres, F., Arnal, J., Lenfant, F., Fontaine, C., & Vinel, A. (2021). Critical role of estrogens on bone homeostasis in both male and female: From physiology to medical implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1568. <https://doi.org/10.3390/ijms22041568>
34. Ciocca, D. R., & Fanelli, M. A. (1997). Estrogen receptors and cell proliferation in breast cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 8(8), 313–321. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(97\)00122-7](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(97)00122-7)

35. Lai, Y., Yu, D., Zhang, J. H., & Chen, G. (2016). Cooperation of genomic and rapid nongenomic actions of estrogens in synaptic plasticity. *Molecular Neurobiology*, 54(6), 4113–4126. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9979-y>
36. Brann, D. W., Dhandapani, K., Wakade, C., Mahesh, V. B., & Khan, M. M. (2007). Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications. *Steroids*, 72(5), 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.02.003>
37. Brinton, R. D. (2009b). Estrogen-induced plasticity from cells to circuits: predictions for cognitive function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(4), 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.12.006>
38. Varshney, M. K., Inzunza, J., Lupu, D., Ganapathy, V., Antonson, P., Rüegg, J., Nalvarte, I., & Gustafsson, J. (2017). Role of estrogen receptor beta in neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(48). <https://doi.org/10.1073/pnas.1714094114>
39. Lampada, A., & Taylor, V. (2023). Notch signaling as a master regulator of adult neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1179011>
40. Zhao, L., & Brinton, R. D. (2005). Estrogen receptor β as a therapeutic target for promoting neurogenesis and preventing neurodegeneration. *Drug Development Research*, 66(2), 103–117. <https://doi.org/10.1002/ddr.20049>
41. Azcoitia, I., Arevalo, M., De Nicola, A. F., & Garcia-Segura, L. M. (2011). Neuroprotective actions of estradiol revisited. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 22(12), 467–473. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.08.002>
42. Zhao, L., Woody, S. K., & Chhibber, A. (2015). Estrogen receptor β in Alzheimer's disease: From mechanisms to therapeutics. *Ageing Research Reviews*, 24, 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.08.001>
43. Sekeris CE. (1990 Sep-Oct). The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones. *In Vivo*. 4(5):317-20. PMID: 2133104
44. Brookes, P. S., Levonen, A., Shiva, S., Sarti, P., & Darley-USmar, V. M. (2002). Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species 1,2 1Guest Editor: Harry Ischiropoulos 2This article is part of a series of reviews on “Reactive Nitrogen Species, Tyrosine Nitration and Cell Signaling.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(6), 755–764. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00901-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00901-2)

45. Chakraborti, T., Das, S., Mondal, M., Roychoudhury, S., & Chakraborti, S. (1999). Oxidant, mitochondria and calcium. *Cellular Signalling*, 11(2), 77–85. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(98\)00025-4](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(98)00025-4)
46. Psarra, A., Solakidi, S., & Sekeris, C. (2006). The mitochondrion as a primary site of action of regulatory agents involved in neuroimmunomodulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1088(1), 12–22. <https://doi.org/10.1196/annals.1366.019>
47. Amato, I., Meurant, S., & Renard, P. (2023). The key role of mitochondria in somatic stem cell differentiation: from mitochondrial asymmetric apportioning to cell fate. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12181. <https://doi.org/10.3390/ijms241512181>
48. Chen, J., Cammarata, P. R., Baines, C. P., & Yager, J. D. (2009). Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(10), 1540–1570. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.06.001>
49. Seo, B., Yoon, S., & Do, J. (2018). Mitochondrial dynamics in stem cells and differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3893. <https://doi.org/10.3390/ijms19123893>
50. Zhao, J., Lendahl, U., & Nistér, M. (2012). Regulation of mitochondrial dynamics: convergences and divergences between yeast and vertebrates. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(6), 951–976. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1066-6>
51. The genetic basis of disease - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/The-mitochondrial-genome-Circular-and-double-stranded-with-no-introns-the-mitochondrial_fig12_329379756 [accessed 19 Sept 2024]
52. Mitochondrial DNA. (n.d.). Genome.gov. <https://www.genome.gov/geneticsglossary/Mitochondrial-DNA>
53. Tsialtas, I., Georgantopoulos, A., Karipidou, M. E., Kalousi, F. D., Karra, A. G., Leonidas, D. D., & Psarra, A. G. (2021). Anti-Apoptotic and antioxidant activities of the mitochondrial estrogen receptor beta in N2A neuroblastoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7620. <https://doi.org/10.3390/ijms22147620>
54. Psarra, A. G., Solakidi, S., & Sekeris, C. E. (2006). The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: Presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 246(1–2), 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.11.025>

55. Ruiz-Romero, G. A., & Álvarez-Delgado, C. (2024). Effects of estrogens in mitochondria: An approach to type 2 diabetes. *AIMS Molecular Science*, 11(1), 72–98. <https://doi.org/10.3934/molsci.2024006>
56. Klinge, C. M. (2020). Estrogenic control of mitochondrial function. *Redox Biology*, 31, 101435. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101435>
57. SH-SY5Y: Human Neuroblastoma Cell Line (ATCC CRL-2266). (n.d.). Memorial Sloan Kettering Cancer Center. <https://www.mskcc.org/researchadvantage/support/technology/tangible-material/human-neuroblastoma-cell-line-sh-sy5y>
58. Kaya, Z.B., Santiago-Padilla, V., Lim, M. *et al.* Optimizing SH-SY5Y cell culture: exploring the beneficial effects of an alternative media supplement on cell proliferation and viability. *Sci Rep* 14, 4775 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55516-5>
59. Brannvall, K. (2002). Estrogen-Receptor-Dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 21(3), 512–520. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1194>
60. Varea, O., Escoll, M., Diez, H., Garrido, J., & Wandosell, F. (2013). Oestradiol signalling through the Akt–mTORC1–S6K1. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(5), 1052–1064. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.12.019>
61. Tiwari-Woodruff, S., Morales, L. B. J., Lee, R., & Voskuhl, R. R. (2007). Differential neuroprotective and anti-inflammatory effects of estrogen receptor ER α and ER β ligand treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), 14813–14818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703783104>