



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

# ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΤΣΙΑΛΤΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ  
ΛΑΡΙΣΑ - 2017

**«Επίδραση αλάτων αργιλίου στη μιτοχονδριακή λειτουργία καρκινικών κυττάρων μαστού και νευρικών κυττάρων - Πιθανή παρέμβαση στην οιστρογονική σηματοδότηση»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΦΟΙΤΗΤΗ: ΤΣΙΑΛΤΑ ΙΩΑΝΝΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΔΡ. ANNA-MARIA Γ. ΨΑΡΡΑ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

**«Effect of Aluminum salts on mitochondrial activity in Breast and neuronal cells - Potential interference with estrogen signaling»**

**DIPLOMA THESIS OF THE STUDENT: TSIALTAS IOANNIS**

**SUPERVISOR PROFESSOR: DR. ANNA- MARIA G. PSARRA**

**LABORATORY: STRUCTURAL & FUNCTIONAL BIOCHEMISTRY**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.  
Μπαλατσός Νικόλαος, Επ. Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.  
Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού, ΤΒΒ, Π.Θ**

## Περίληψη

Ενώσεις που έχουν ως βάση το αργίλιο, όπως το υδρόξυ-χλωριούχο αργίλιο (aluminum chlorhydrate, ACH) που ανήκει στα άλατα αργιλίου, αποτελούν ενεργούς αντιδρωτικούς παράγοντες στα αποσμητικά. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η μακρόχρονη χρήση τους συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις όπως ανάπτυξη καρκίνου του μαστού και νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Το αργίλιο πιθανολογείται ότι δρα, μεταξύ άλλων μηχανισμών, ως μεταλλοοιστρογόνο, μέσω δέσμευσης του στους υποδοχείς οιστρογόνων και παρεμβολής του στην οιστρογονική σηματοδότηση. Η οιστρογονική σηματοδότηση αποτελεί μια ισορροπία μεταξύ των αντίθετων δράσεων των δύο υποδοχέων (ERα και ERβ) καθώς και των ισομορφών τους στους ιστούς στόχους. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα οιστρογόνα επηρεάζουν τις μιτοχονδριακές λειτουργίες, όπως τη μιτοχονδριακή βιογένεση, την παραγωγή ενέργειας και την επαγωγή απόπτωσης, μέσω άμεσων και έμμεσων μηχανισμών δράσης των υποδοχέων οιστρογόνων. Πρόσφατα παρατηρήθηκε ο εντοπισμός του ERβ στο μιτοχόνδριο, γεγονός που υποδηλώνει την άμεση δράση των οιστρογόνων στο συγκεκριμένο οργανίδιο. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η επίδραση του ACH στις οιστρογονικές δράσεις που σχετίζονται με το μιτοχόνδριο. Χρησιμοποιήθηκαν η θετική όσον αφορά τον εντοπισμό του ERα κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF7 και η θετική όσον αφορά τον εντοπισμό του ERβ κυτταρική σειρά ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y. Πραγματοποιώντας ανοσοαποτύπωση κατά Western σε ολικά καθώς και σε μιτοχονδριακά εκχυλίσματα παρατηρήθηκαν διαφορετικές επιδράσεις του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων (ERs). Το ACH προκάλεσε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα σε κύτταρα MCF-7 και μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ σε κύτταρα SH-SY5Y. Επίσης ο μιτοχονδριακός εντοπισμός του ERβ αυξήθηκε σε κύτταρα SH-SY5Y. Το μιτοχονδριακό μόριο Bcl-2 αυξήθηκε σε κύτταρα MCF-7 ενώ τόσο το Bcl-2 όσο και άλλες αντιαποπτωτικές και αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες μειώθηκαν σε κύτταρα SH-SY5Y. Επιπλέον παρατηρήθηκε και μειωμένη παραγωγή ATP. Τέλος, με την χρήση του ανταγωνιστή οιστρογόνων ICI 182,780 ακυρώθηκαν αρκετές απ τις παραπάνω δράσεις, υποδεικνύοντας την εμπλοκή του ACH στην οιστρογονική σηματοδότηση. Εν κατακλείδι η καθημερινή έκθεση στο αργίλιο και η πιθανή εμπλοκή του στην οιστρογονική σηματοδότηση μπορεί να προκαλέσει ανάπτυξη καρκίνου του μαστού και νευροεκφυλισμό.

**Λέξεις-κλειδιά:** υποδοχέας οιστρογόνου, αργίλιο, μιτοχόνδριο, οιστρογονική σηματοδότηση, καρκίνος του μαστού, νευροεκφυλισμός

## Abstract

Aluminum-based compounds, such as the aluminum chlorhydrate salt (ACH), are the active ingredients in antiperspirants and experimental evidence indicates that their long term use is associated with pathological conditions such as breast cancer development and neurodegenerative disorders. Aluminum is proposed to act, among other mechanisms, as metalloestrogen, via binding to cellular estrogen receptors and mimicking estrogen signaling. Estrogen signaling is a balance between opposed activities of two distinct receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and their splice variants in target tissues. Studies have shown that estrogen affect mitochondrial functions namely mitochondrial biogenesis, energy production and induction of apoptosis via direct or indirect mechanisms of actions of estrogen receptors. The recently documented mitochondrial localization of ER $\beta$ , indicates direct action of estrogens in this organelle. In this study the putative effect of aluminum chlorhydrate (ACH) on mitochondrial related estrogenic actions was assessed, in ER $\alpha$ -positive MCF-7 breast cancer cells and in the ER $\beta$ -positive neuroblastoma SH-SY5Y cells. Applying Western blot analysis in total as wells as in mitochondrial extracts from aluminum- treated cells, differential effects of ACH on ERs proteins levels was observed. ACH caused increase in ER $\alpha$  protein levels in MCF-7 cells, whereas decrease in ER $\beta$  protein level in SHSY-5Y cells. Mitochondrial localization of ER $\beta$  was increased in SH-SY5Y cells. Differential effect on Bcl2 mitochondrial protein levels was observed on two type of cells. Mitochondrial Bcl2 was increased in MCF-7 cells, whereas Bcl2 as well as other anti-apoptotic and anti-oxidant proteins were decreased in ACH-treated SH-SY5Y cells. Moreover, reduction in ATP content was detected. Reversal of several of the above actions by the estrogen antagonist ICI 182,780, was observed indicating involvement of ACH in estrogen signaling. Thus the daily exposure to aluminum and the putative interference of aluminum in estrogen signaling may induce breast cancer development and neurodegeneration.

**Key words:** estrogen receptor, aluminum, mitochondria, estrogen signaling, breast cancer, neurodegeneration

## ΠΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	10
1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς .....	10
1.2 Στεροειδείς ορμόνες και υποδοχείς στεροειδών ορμονών .....	11
1.3 Υποδοχείς οιστρογόνων: έκφραση, δομή και ισομορφές .....	11
1.4 Δράσεις υποδοχέων οιστρογόνων .....	14
1.4.1 Γενωμική δράση .....	14
1.4.2 Μη γενωμική δράση .....	16
1.4.3 Δράσεις ER απουσία προσδέτη .....	16
1.4.4 Σύγκλιση γενωμικής και μη δράσης .....	16
1.5 Μιτοχονδριακή δράση .....	17
1.5.1 Μιτοχόνδριο .....	17
1.5.2 Δράσεις ER στο μιτοχόνδριο .....	19
1.6 ER και νευρικό σύστημα .....	20
1.6.1 Μείωση οξειδωτικού στρες .....	20
1.6.2 Ρύθμιση της Φλεγμονώδους Απόκρισης .....	21
1.6.3 Ρύθμιση της Απόπτωσης .....	21
1.7 ER και καρκίνος του μαστού .....	23
1.8 Οιστρογόνα .....	24
1.9 Ξενοοιστρογόνα .....	25
1.9.1 Μεταλλοοιστρογόνα .....	26
1.9.2 Οιστρογονική δράση μεταλλοοιστρογόνων .....	26
1.10 Αργίλιο και άλατα αργιλίου .....	26
1.10.1 Αργίλιο και νευρικό σύστημα .....	27
1.10.2 Αργίλιο και καρκίνος του μαστού .....	28
1.11 Στόχοι – προσεγγίσεις .....	29
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	30
2.1 Οργανολογία .....	30
2.2 Υλικά .....	30
2.3 Κυτταρικές σειρές .....	33
2.4 Τεχνικές .....	34
2.4.1 Τεχνικές εντός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών .....	34
2.4.1.1 Απόψυξη κυττάρων .....	34
2.4.1.2 Καλλιέργεια κυττάρων .....	34
2.4.1.3 Θρυψινοποίηση .....	34

2.4.1.4 Ψύξη Κυττάρων .....	35
2.4.1.5 Καταμέτρηση και στρώσιμο κυττάρων .....	35
2.4.1.6 Προσθήκη ουσιών .....	36
2.4.1.7 Κατεργασία με ενεργό Άνθρακα για Παρασκευή cis-FBS .....	36
2.4.2 Τεχνικές εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών .....	37
2.4.2.1 Συλλογή κυττάρων .....	37
2.4.2.2 Λύση με χρήση υπερήχων (Sonication) .....	37
2.4.2.3 Χρωματογραφική μέθοδος Bradford για την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών. ...	37
2.4.2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση) .....	38
2.4.2.5 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blotting) .....	39
2.4.2.6 Μέτρηση ενδοκυττάρου ATP με αντιδραστήριο Λουσιφερίνης-Λουσιφεράσης .....	40
2.4.2.7 Μιτοχονδριακή Κλασμάτωση .....	41
2.4.2.8 Ενζυμικός προσδιορισμός δραστηριότητας λουσιφεράσης / β-γαλακτοσιδάσης .....	42
2.5 Υπολογιστική επεξεργασία .....	43
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	44
3.1.1 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα, ERβ.....	45
3.1.2 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων c-Myc και p53 .....	45
3.1.3 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα σε μιτοχονδριακά κλάσματα .....	46
3.1.4 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Bcl2, TRX-2 και p53 σε μιτοχονδριακά κλάσματα .....	47
3.1.5 Επίδραση του ACH στα ολικά κυτταρικά επίπεδα ATP της κυτταρικής σειράς MCF-7 .....	48
3.2 Πιθανή εμπλοκή του ACH στην οιστρογονική σηματοδότηση στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y .....	49
3.2.1 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ.....	49
3.2.2 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων procasp-9, procasp-3 και Bcl-2 .....	49
3.2.3 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ σε μιτοχονδριακά κλάσματα .....	51
3.2.4 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων μορίων της οικογένειας BCL-2, καθώς και των μορίων PEPCK, TRX-2 και Cyt c σε μιτοχονδριακά κλάσματα .....	51

3.2.5 Επίδραση του ACH στα ολικά κυτταρικά επίπεδα ATP των κυτταρικών σειρών SH-SY5Y και N2A .....	54
3.3 Δοκιμασία λουσιφεράσης για τον έλεγχο της επίδρασης του ACH στην δραστικότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ σε κύτταρα N2A.....	55
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	64

## ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1: Σηματοδότηση πυρηνικών υποδοχέων.....	9
Εικόνα 2: Η οργάνωση της αλληλουχίας των δύο κύριων ισομορφών των υποδοχέων οιστρογόνων, ERα και ERβ.....	12
Εικόνα 3: Οι δομές των ισομορφών των ERs .....	13
Εικόνα 4: Μηχανισμοί οιστρογονικής δράσης.....	14
Εικόνα 5: Τέσσερα διαφορετικά μονοπάτια της δράσης του ER.....	15
Εικόνα 6: Μιτοχονδριακό γονιδίωμα και πιθανές θέσεις των στοιχείων απόκρισης στις ορμόνες (HREs).....	18
Εικόνα 7: Είσοδος του ERβ στα μιτοχόνδρια μέσω δύο εναλλακτικών οδών.....	19
Εικόνα 8: Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί της E2 στον εγκέφαλο.....	21
Εικόνα 9 Επαγόμενη νευροπροστατευτική σηματοδότηση από τους υποδοχείς οιστρογόνων.....	22
Εικόνα 10 Αλληλεπιδράσεις σηματοδότησης υποδοχέα οιστρογόνου και αυξητικού παράγοντα σε ανθρώπινους όγκους.....	23
Εικόνα 11: Παραδείγματα Αλληλεπίδρασης Ξενοοιστρογόνων και Οιστρογονικής Σηματοδότησης	25
Εικόνα 12: Πιθανά σημεία εμπλοκής του αργιλίου (Al) στις μοριακές δράσεις των ERs.....	26
Εικόνα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης Al, ROS, αντιοξειδωτικών ενζύμων, και υπεροξειδωσις των λιπιδίων.....	28
Εικόνα 14 Διάγραμμα παρουσίασης επτά περιοχών του ανθρώπινου μαστού στις οποίες καταγράφεται καρκίνος ετησίως σε πολλές δυτικές χώρες.....	29
Εικόνα 15: Παρουσίαση των κυτταρικών σειρών MCF-7, SH-SY5Y και N <sub>2</sub> A .....	33
Εικόνα 16: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα και ERβ σε κύτταρα MCF-7.....	45
Εικόνα 17: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του c-Myc και p53 σε κύτταρα MCF-7.....	46
Εικόνα 18: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα σε ολικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα από κύτταρα MCF-7.....	46

Εικόνα 19: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των Bcl2, TRX-2 και p53 σε ολικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα από κύτταρα MCF-7 .....	47
Εικόνα 20: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ σε κύτταρα SH-SY5Y.....	49
Εικόνα 21: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του Bcl-2 και των προκασπασών 9 και 3 σε κύτταρα SH-SY5Y .....	50
Εικόνα 22: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ σε κυτταροπλασματικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα από κύτταρα SH-SY5Y .....	51
Εικόνα 23: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του Cyt c σε κυτταροπλασματικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα από κύτταρα SH-SY5Y .....	52
Εικόνα 24: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων TRX-2 και PEPCK σε κυτταροπλασματικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα από κύτταρα SH-SY5Y .....	52
Εικόνα 25: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων Bcl-2, BAX και Bcl-xL σε κυτταροπλασματικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα από κύτταρα SH-SY5Y.....	53

## ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Οργανολογία .....	30
Πίνακας 2: Χημικά.....	30
Πίνακας 3: Διαλύματα, τρόπος παρασκευής και αποθήκευσής τους .....	31
Πίνακας 4: Θρεπτικά υλικά.....	32
Πίνακας 5: Αντισώματα .....	32
Πίνακας 6: Αναλώσιμα .....	32



## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Διάγραμμα 1: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων ERα και ERβ σε κύτταρα MCF-7 .....	45
Διάγραμμα 2: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων c-Myc και p53 σε κύτταρα MCF-7 .....	46
Διάγραμμα 3: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών του μορίου ERα σε κύτταρα MCF-7 .....	47
Διάγραμμα 4: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων TRX-2, Bcl-2 και p53 σε κύτταρα MCF-7.....	48
Διάγραμμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης του ACH στα ολικά κυτταρικά επίπεδα του ATP σε κύτταρα MCF-7 .....	48
Διάγραμμα 6: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών του ERβ σε κύτταρα SH-SY5Y.....	49
Διάγραμμα 7: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων procasp-9 και προ-procasp-3 σε κύτταρα SH-SY5Y .....	50
Διάγραμμα 8: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών του μορίου ERβ σε κύτταρα SH-SY5Y .....	51
Διάγραμμα 9: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων PEPCK και TRX-2 σε κύτταρα SH-SY5Y.....	52
Διάγραμμα 10: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων PEPCK και TRX-2 σε κύτταρα SH-SY5Y.....	52
Διάγραμμα 11: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων Bcl-xL, Bcl-2 και BAX σε κύτταρα SH-SY5Y .....	53
Διάγραμμα 12: Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης του ACH στα ολικά κυτταρικά επίπεδα του ATP σε κύτταρα SH-SY5Y σε κύτταρα SH-SY5Y .....	54
Διάγραμμα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης του ACH στα ολικά κυτταρικά επίπεδα του ATP σε κύτταρα N2A .....	54
Διάγραμμα 14: Αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στην μεταγραφική ενεργότητα του NFκB μέσω δοκιμασίας λουσιφεράσης σε κύτταρα N2A.....	55

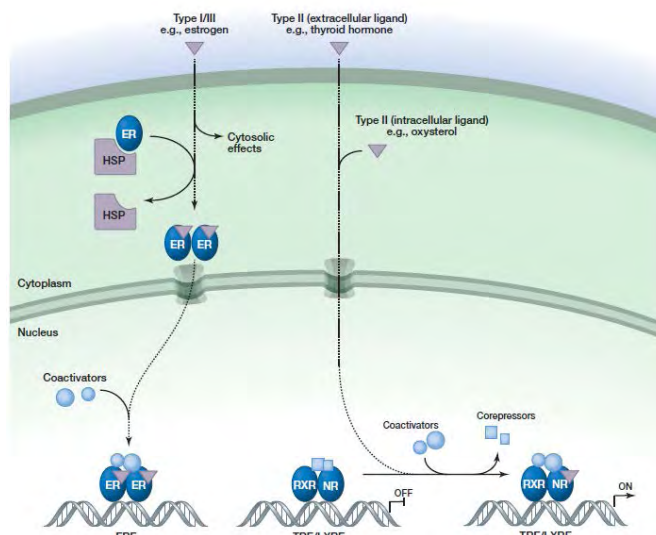
# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς

Η οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων περιλαμβάνει πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες και ομαδοποιούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: α) τους πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών (nuclear hormone receptors, NHRs), για τους οποίους έχουν ταυτοποιηθεί ορμονικοί προσδέτες και β) τους "ορφανούς πυρηνικούς υποδοχείς", για τους οποίους δεν έχουν ταυτοποιηθεί ορμονικοί προσδέτες (Olefsky, 2001). Από το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιούνται 48 πυρηνικοί υποδοχείς, αλλά λίγοι από αυτούς δρουν απουσία προσδέτη (Sever & Glass, 2013).

Οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να υπάρχουν ως μονομερή, ομοδιμερή, ή ετεροδιμερή και αναγνωρίζουν αλληλουχίες DNA που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (hormone response elements, HREs). Μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις υποτύπους βάσει της λειτουργίας τους (Εικόνα 1) (Gupta & Mayer, 2013; Sever & Glass, 2013):

- I. Οι υποδοχείς τύπου I, όπως ο υποδοχέας ανδρογόνων, οιστρογόνων, αλατοκορτικοειδών, γλυκοκορτικοειδών και προγεστερόνης, είναι αγκυροβολημένοι στο κυτταρόπλασμα και σε ανενεργή κατάσταση είναι δεσμευμένοι σε πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat-shock proteins). Η δέσμευση προσδέτη έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ, τον ομοδιμερισμό των υποδοχέων και τη μετατόπισή τους από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί δεσμεύονται στα HREs που βρίσκονται στις περιοχές του υποκινητή των γονιδίων στόχων. Στη συνέχεια στρατολογούνται άλλες πρωτεΐνες στο σύμπλεγμα DNA/υποδοχέα και αρχίζει η μεταγραφή του DNA σε mRNA.
- II. Πυρηνικοί υποδοχείς Τύπου II: Σε ανενεργή κατάσταση βρίσκονται στον πυρήνα και συνδέονται με το γενετικό υλικό ως ετεροδιμερή. Σε αυτή τη μορφή είναι συμπλοκοποιημένοι με συγκαταστολείς και αποσιωπώνται τα γονίδια-στόχοι. Η δέσμευση του προσδέτη επάγει απελευθέρωση των συγκαταστολέων, στρατολόγηση των πρωτεϊνών συνενεργοποίησης και έναρξη της γονιδιακής έκφρασης. Εδώ περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων, οι PPARs (Peroxisome Proliferator-activated Receptors), οι υποδοχείς της βιταμίνης D (VDRs) και οι αποκαλούμενοι "ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς".
- III. Πυρηνικοί υποδοχείς Τύπου III: Έχουν παρόμοια λειτουργία με τους υποδοχείς τύπου I. Διαφέρει η οργάνωση των HREs, καθώς εμφανίζουν ευθείες επαναλήψεις και όχι ανάστροφες.
- IV. Πυρηνικοί υποδοχείς Τύπου IV: Προσδένονται ως μονομερή σε μισά τμήματα (half-sites) των HREs.



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

Λόγω της ικανότητας των πυρηνικών υποδοχέων να ρυθμίζουν πολλούς μηχανισμούς ελέγχου της φυσιολογίας του οργανισμού, μια πιθανή δυσλειτουργία της σηματοδότησής τους μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται, παραδείγματος χάρη, με μεταβολισμό, ανάπτυξη ή αναπαραγωγή. Επίσης, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ενεργοποιούνται από έναν προσδέτη, μπορεί να αποτελέσουν πιθανοί φαρμακευτικοί στόχοι (Germain et al, 2006).

## 1.2 Στεροειδείς ορμόνες και υποδοχείς στεροειδών ορμονών

Οι στεροειδείς ορμόνες που εμφανίζονται στα σπονδυλωτά έχουν ομαδοποιηθεί στα στεροειδή φύλου (οιστρογόνα, προγεσταγόνα και ανδρογόνα), στα κορτικοειδή (γλυκοκορτικοειδή και μεταλλοκορτικοειδή) και σε στεροειδικές ενώσεις (βιταμίνη D και παράγωγά της, ρετινοϊκό οξύ, PPAR αγωνιστές και θυρεοειδική ορμόνη). Οι περισσότερες από τις φυσικές στεροειδείς ορμόνες συντίθενται από τη χοληστερόλη. Τα στεροειδή φύλου παράγονται κυρίως στις γονάδες και σε μικρό βαθμό στα επινεφρίδια. Η οιστρονή και η οιστραδιόλη, τα ισχυρότερα φυσικά οιστρογόνα, μπορούν επίσης να παραχθούν σε σημαντικές ποσότητες στον λιπώδη ιστό. Τα γλυκοκορτικοειδή και τα μεταλλοκορτικοειδή απ' την άλλη είναι προϊόντα του φλοιού των επινεφριδίων. Οι μετατροπές και ο καταβολισμός των στεροειδών λαμβάνουν χώρα κυρίως στο ήπαρ, αλλά και σε άλλους περιφερειακούς ιστούς. Όλα τα στεροειδή δεσμεύονται σε εξειδικευμένους υποδοχείς, οι οποίοι εμφανίζουν σημαντική ομολογία, και σχηματίζουν την οικογένεια των στεροειδών υποδοχέων (Gupta & Mayer, 2013).

Στο αίμα, οι στεροειδείς ορμόνες δεσμεύονται με ειδικές πρωτεΐνες φορείς όπως η σφαιρίνη δέσμευσης ορμόνης φύλου (sex hormone-binding globulin) (Gupta & Mayer, 2013). Οι λιπόφιλες στεροειδείς ορμόνες, σε αντίθεση με τις ορμόνες για τους επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς, μπορούν να διασχίσουν την λιπιδιακή διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, να εισέλθουν μέσω παθητικής διάχυσης στους εσωτερικούς χώρους των κυττάρων και στη συνέχεια να συνδεθούν με τους αντίστοιχους υποδοχείς στεροειδών ορμονών (Olefsky, 2001).

Οι στεροειδείς ορμόνες εμπλέκονται στην ανάπτυξη των χαρακτηριστικών φύλου, στην ικανότητα αντοχής του οργανισμού σε ασθένειες και τραυματισμούς αλλά και στον έλεγχο του μεταβολισμού, της φλεγμονής, των ανοσοποιητικών λειτουργιών και της ισορροπίας άλατος και νερού. Παρόλα αυτά όμως, όλες οι κλασικές στεροειδείς ορμόνες, ιδιαίτερα οι ορμόνες φύλου, μπορεί να εμπλακούν στην ανάπτυξη ασθενειών. Για παράδειγμα, τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα παίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού και του προστάτη, αντίστοιχα (Gupta & Mayer, 2013).

## 1.3 Υποδοχείς οιστρογόνων: έκφραση, δομή και ισομορφές

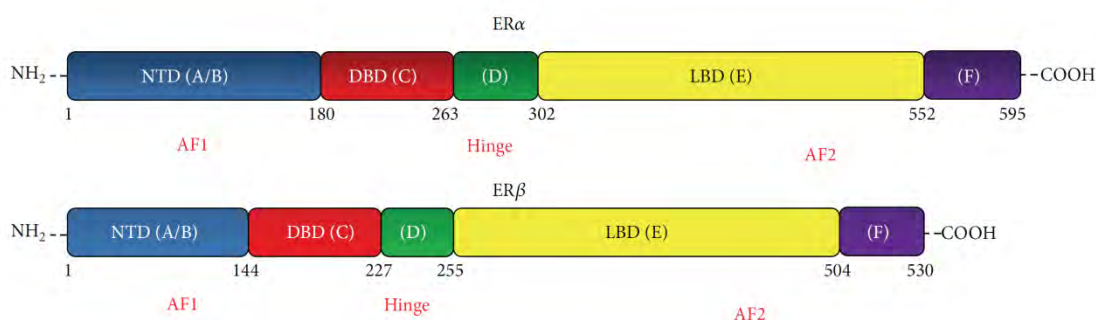
Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα ήταν αποδεκτό ότι υπάρχει μόνο ένα γονίδιο υποδοχέα οιστρογόνου (estrogen receptor, ER) που κωδικοποιούσε τον ERα (estrogen receptor alpha) (Planey et al, 2014). Η ύπαρξη του ERα αποδείχθηκε από τον Elwood Jensen το 1958 και το αντίστοιχο γονίδιο κλωνοποιήθηκε το 1985. Στα μέσα της δεκαετίας του '90 (1996) κλωνοποιήθηκε από τον προστάτη και την ωθήκη αρουραίου ο ERβ (estrogen receptor beta), προκαλώντας μια αλλαγή της προσέγγισης στην κατανόηση του συστήματος σηματοδότησης των οιστρογόνων (Jia et

al, 2015). Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε και η ύπαρξη της πρωτεΐνη υποδοχέα GPER (G protein coupled E2 receptor) (Gupte et al, 2015).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τους ERα και ERβ εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, 6q25.1 και 14q23.2, αντίστοιχα. Ο ERα εκφράζεται κυρίως σε αναπαραγωγικούς ιστούς (μήτρα, ωθήκη), καθώς και σε μαστού, νεφρού, οστού, λευκού λιπώδους ιστού και ήπατος, ενώ η έκφραση του ERβ εντοπίζεται στις ωθήκες, στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), στο καρδιαγγειακό σύστημα, στον πνεύμονα, στα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα, στον προστάτη, στο παχύ έντερο, στο νεφρό και στο ανοσοποιητικό σύστημα. Οι ERs εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα, αλλά επίσης στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια (Jia et al, 2015).

Οι ERs, όπως και άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς, διαθέτουν μια στοιχειώδη δομή που αποτελείται από τρεις κύριες λειτουργικές περιοχές που εξυπηρετούν συγκεκριμένους ρόλους (Εικόνα 2): α) την αμινοτελική περιοχή (**NH<sub>2</sub>-terminal domain, NTD**), β) την περιοχή πρόσδεσης με το DNA (**DNA-binding domain, DBD**), η οποία μέσω δύο δακτύλων ψευδαργύρου (ZincFinger) προσδένεται σε ανάστροφες εξαμερείς επαναλήψεις του DNA που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (EREs: Estrogen Response Elements) και γ) την καρβοξυτελική περιοχή δέσμησης του προσδέτη (**ligand-binding domain, LBD**). Η LBD περιέχει ένα θύλακα δέσμησης ορμονών και είναι υπεύθυνη κυρίως για λειτουργίες που επάγονται από τη δέσμηση του προσδέτη, πχ. ο διμερισμός του υποδοχέα (Jia et al, 2015; Planey et al, 2014).

Η πλήρης μεταγραφική δραστηριότητα των ERs θεωρείται ότι επιτυγχάνεται από τη συνεργασία των δύο περιοχών ενεργοποίησης (activation function, AF), των AF1 και AF2, που βρίσκονται εντός της NTD και της LBD, αντίστοιχα. Η δραστηριότητα των AFs εξαρτάται από τον εκάστοτε υποκινητή και ιστό. Η λειτουργία του AF1 είναι ανεξάρτητη από την ορμόνη-προσδέτη, ενώ η λειτουργία του AF2 απαιτεί την παρουσία του (Jia et al, 2015; Planey et al, 2014).



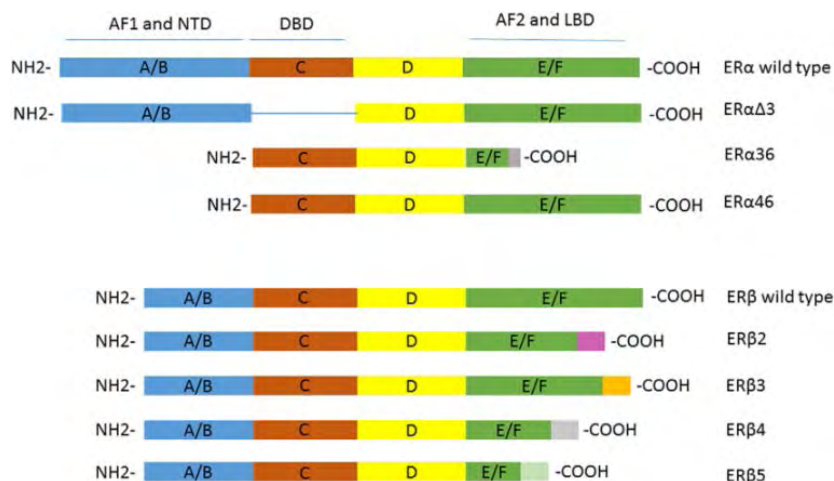
**Εικόνα 2: Δομή των δύο κύριων ισομορφών των υποδοχέων οιστρογόνων, ERα (πάνω) και ERβ (κάτω). Τα γράμματα A-F αντιπροσωπεύουν τις διαφορετικές περιοχές: amino terminal domain-NTD (A / B), DNA binding domain-DBD (C), Hinge (D), ligand binding domain-LBD (E) και F (F), αντίστοιχα. Η θέση αλληλουχίας αμινοξέων δίδεται για κάθε περιοχή. Η ακριβής θέση των AF1 και AF2, εντός των NTD και LBD αντίστοιχα, δεν ορίζεται (Gupte et al, 2015).**

Επίσης οι ERs αποτελούνται από τις "hinge and F" περιοχές (Εικόνα 2). Η βραχεία (hinge) περιοχή είναι υπεύθυνη για τον πυρηνικό εντοπισμό και συμμετέχει στο διμερισμό του υποδοχέα αλλά και στη σύνδεσή του με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Η "F" περιοχή βρίσκεται ανάμεσα του καρβοξυτελικού άκρου και της LBD και είναι ικανή να διαμορφώνει τη γονιδιακή μεταγραφή ανάλογα με το είδος του υποκινητή και του ιστού (Planey et al, 2014).

Οι δύο ισομορφές του ER παρουσιάζουν μεγάλη δομική απόκλιση. Η NTD του ERβ είναι μικρότερη από εκείνη του ERα παρουσιάζοντας μόνο 16% ομολογία. Η DBD είναι πολύ συντηρημένη μεταξύ των ERα και ERβ εμφανίζοντας 97% ομολογία. Τέλος, η LBD των ERα και ERβ εμφανίζει 59% ομολογία, παρόλο που οι θύλακες δέσμωσης προσδέτη των δύο υποτύπων δείχνουν μόνο μικρές διαφορές στη δομή. Είναι σημαντικό ότι αυτές οι μικρές δομικές διαφορές στους θύλακες δέσμωσης του προσδέτη επέτρεψαν την ανάπτυξη εκλεκτικών προσδετών ανά υπότυπο (Jia et al, 2015).

Ανάλογα με τον προσδέτη και το στοιχείο απόκρισης, οι ERs μπορούν να διαδραματίσουν διαφορετικούς ρόλους στη ρύθμιση των γονιδίων. Μελέτες έδειξαν ότι όταν ο ERα και ο ERβ συνδέονται με τη φυσική ορμόνη σε μία θέση AP1 (θέση έμμεσης σύνδεσης με το DNA, ενότητα 1.4.1.B) δρουν κατά αντίθετο τρόπο: με τον ERα να ενεργοποιεί τη μεταγραφή και τον ERβ να την αναστέλλει (Paechetal, 2016). Έχει αποδειχθεί ότι ο ERβ λειτουργεί ως ένας κυρίαρχος αναστολέας της μεταγραφικής δραστηριότητας του ERα και συνεπώς το σχετικό επίπεδο έκφρασης των δύο ισομορφών θα καθορίζει τις κυτταρικές αποκρίσεις σε αγωνιστές και ανταγωνιστές (Hall & Mcdonnell, 1999).

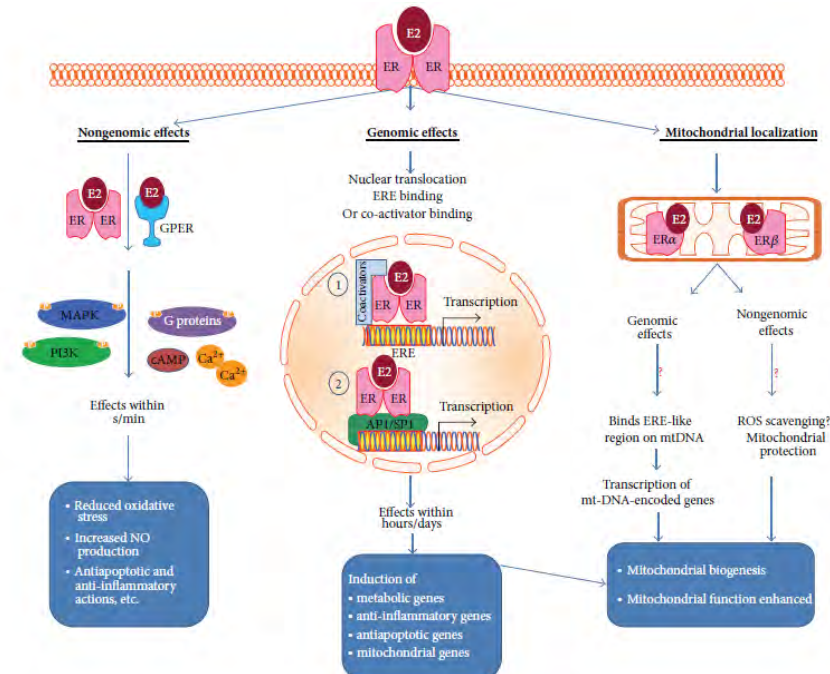
Λόγω του εναλλακτικού ματίσματος των ER-mRNAs, έχουν ταυτοποιηθεί τρεις ισομορφές του ERα (Εικόνα 3). Ο ERαΔ3 στερείται του εξωνίου 3, το οποίο κωδικοποιεί μέρος της DBD. Ο ERα36 στερείται των AF1 και AF2 περιοχών καθώς και τα τελευταία 138 αμινοξέα (aa) του αντικαθίστανται από μια μοναδική αλληλουχία 22 aa. Ο ERα46 που στερείται την περιοχή που περιλαμβάνει την περιοχή ενεργοποίησης AF1, χαρακτηρίστηκε ως ένας κυρίαρχος αναστολέας της δραστηριότητας του ERα στους οστεοβλάστες. Για τον ERβ, έχουν περιγραφεί τουλάχιστον τέσσερις ισομορφές, που αναφέρονται ως ERβ2, ERβ3, ERβ4 και ERβ5. Όλες οι παραλλαγές του ERβ έχουν νέο καρβοξυτελικό άκρο και δεν μπορούν να προσδεθούν σε αυτούς οιστρογόνα αλλά και άλλοι προσδέτες που ερευνήθηκαν (Jia et al, 2015).



**Εικόνα 3: Οι δομές των ισομορφών των ERs. Επισημαίνονται οι διαφορετικές λειτουργικές περιοχές: η αμινοτελική περιοχή (NTD) με μπλέ, η περιοχή δέσμωσης του DNA (DBD) με πορτοκαλί χρώμα και η καρβοξυτελική περιοχή δέσμωσης του προσδέτη (LBD) με πράσινο χρώμα (Jia et al, 2015).**

## 1.4 Δράσεις υποδοχέων οιστρογόνων

Οι ERs μπορεί να είναι πυρηνικοί, κυτοσολικοί ή ακόμα και δεσμευμένοι στις μεμβράνες (Gurta & Mayer, 2013) και επιτελούν τις δράσεις τους με ποικίλους σηματοδοτικούς μηχανισμούς: μέσω πυρηνικού γονιδιώματος, μέσω καταρακτών σηματοδότησης που ξεκινούν από το κυτταρόπλασμα, ακόμη και μέσω μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Μηχανισμοί οιστρογονικής δράσης: ο διμερισμός του ER μετά τη δέσμευση της οιστραδιόλης (estradiol, E2) προκαλεί μη γενωμικές, γενωμικές και μιτοχονδριακές δράσεις. Οι άμεσες μη γενωμικές δράσεις μπορεί να προκαλούνται από το σύμπλοκο E2-ER ή από την E2 που δεσμεύεται στον GPER ενεργοποιώντας μόρια σηματοδότησης όπως τα MAPK, PI3K, G-πρωτεΐνες και πολλά άλλα. Οι γενωμικές δράσεις προκαλούνται από πυρηνική μετατόπιση του συμπλόκου E2-ER και είτε (1) με άμεση δέσμευση στα ERE μαζί με συνενεργοποιητές είτε (2) με έμμεση δέσμευση με μεταγραφικούς συνενεργοποιητές επάγουν τη γονιδιακή μεταγραφή. Οι ERs μπορεί επίσης να εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια και να προκαλούν πιθανές γενωμικές και μη-γενωμικές δράσεις, οι μηχανισμοί των οποίων δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως (Gurta & Mayer, 2013).

### 1.4.1 Γενωμική δράση

#### A. Άμεση σύνδεση με το DNA

Μόλις ενεργοποιηθούν από την οιστραδιόλη (estradiol, E2) ή από μια οιστρογονική ένωση, οι ERs σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή ER $\alpha$  / ER $\beta$ , μετατοπίζονται στον πυρήνα και συνδέονται με υψηλή συγγένεια στα ERE που βρίσκονται σε υποκινητές, σε ιντρόνια ή στις 3' αμετάφραστες περιοχές των γονιδίων στόχων. Τα ERE αποτελούνται από ανάστροφες επαναλήψεις της αλληλουχίας 15 bp: 5'-GGTCAnnnTGACC-3' (n= οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο) (Klinge, 2008). (Εικόνα 4, 5a)

Αυτή η "τέλεια" ακολουθία των ERE φάνηκε να λειτουργεί με τρόπο ανεξάρτητο προσανατολισμού και απόστασης, δυο απαραίτητων ιδιοτήτων ενός ενισχυτή. Τα ανθρώπινα πλήρη ERE έχουν ένα κενό 3-bp μεταξύ των δύο μισών τμημάτων (half-sites). Αμφισβητείται ακόμη η δέσμευση του ER μέσω των μισών τμημάτων των ERE, παρόλο που υπάρχουν πολλά παραδείγματα (Marino M. et al, 2006).



Οι ενεργοποιημένοι μέσω προσδέτη ERs ασκούν τη γενωμική τους δράση αλληλεπιδρώντας με συνενεργοποιητές που στρατολογούν με τη σειρά τους σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης, αλλάζουν τη δομή των νουκλεοσωμάτων, ενισχύουν την στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων και της RNA πολυμεράσης II με αποτέλεσμα τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Ο συνολικός αριθμός των συνενεργοποιητών των πυρηνικών υποδοχέων είναι 200 και σήμερα είναι γνωστό ότι οι 60 αλληλεπιδρούν με τους ERs (Klinge, 2008).

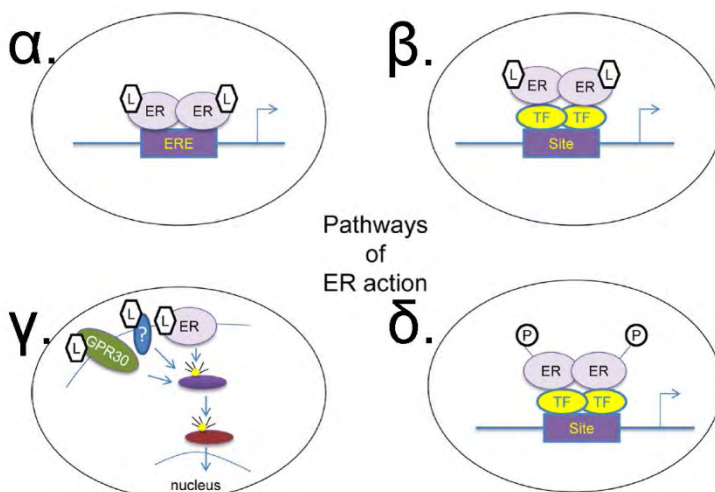
### B. Έμμεση σύνδεση με το DNA

Εκτός από την άμεση σύνδεση στα ERE, οι ERs μπορούν να ρυθμίσουν έμμεσα τη μεταγραφή αλληλεπιδρώντας με συνδεδεμένους στο DNA μεταγραφικούς παράγοντες, π.χ. Sp1 ή AP1. Αλληλεπιδρούν επίσης και με τον NF-κB για να αναστείλουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων τους (Gurte et al, 2015; Klinge, 2008). Περίπου το 35% των E2-επαγόμενων ανθρώπινων γονιδίων μεταγράφονται μέσω έμμεσης σύνδεσης του ER με το DNA (Marino M. et al, 2006). (Εικόνα 4, 5β)

Η SP-1 (Stimulating protein-1) είναι ο κυρίαρχος μεσολαβητής της έμμεσης δέσμησης του ER στο DNA και ένας αυξημένος αριθμός γονιδίων επάγεται από την E2 μέσω αυτού του μηχανισμού, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (low-density lipoprotein, LDL), της συνθάσης ενδοθηλιακού οξειδίου του αζώτου (endothelial nitric oxide synthase, eNOS), του c-fos, της κυκλίνης D1 και των γονιδίων του υποδοχέα-1α του ρετινοϊκού οξέος (Marino M. et al, 2006).

Το σύμπλοκο AP-1 (Activating protein-1) αποτελείται από διμερή πρωτεΐνης Jun ή από ετεροδιμερή Jun/Fos και παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η ενεργοποίηση του IGF-1 (insulin-like growth factor) από τον ERα λαμβάνει χώρα μέσω της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα με Fos και Jun στις θέσεις δέσμησης AP-1. Τέλος η κυκλίνη D1 αποτελεί επίσης ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα γονιδίου που ενεργοποιείται από το σύμπλεγμα ER-E2 μέσω AP-1 (Marino M. et al, 2006).

Άλλοι ενδιάμεσοι παράγοντες μέσω των οποίων ο ER μπορεί να συσχετιστεί με υποκινητές περιλαμβάνουν τους: ATF(activating transcription factor)-2/c-jun ή ATF-2/CREB(cAMP response element binding protein) για μεταγραφή του γονιδίου της κυκλίνης D1 και ATF-1/CREB για τη μεταγραφή του γονιδίου Bcl-2 (Marino M. et al, 2006).



Εικόνα 5: Τέσσερα διαφορετικά μονοπάτια της δράσης του ER: α) άμεση γενωμική δράση, β) έμμεση γενωμική δράση, γ) μη γενωμική δράση, δ) δράση ER απουσία προσδέτη όπου ο ER φωσφορυλιώνεται από ενεργοποιημένες κινάσες (Zhao et al, 2010).

### 1.4.2 Μη γενωμική δράση

Η συγκεκριμένη δράση του ER ονομάστηκε "ταχεία ή μη γενωμική". Στην πραγματικότητα ο όρος "μη γενωμική" δεν είναι επαρκής όταν αναφερόμαστε σε ταχείες αλλαγές που μπορεί επίσης να προκαλέσουν τη μεταγραφή γονιδίων (Εικόνα 4, 5γ). Διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης ενεργοποιούνται κατά την δέσμευση της E2 στον ER και μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κύριους καταρράκτες σηματοδότησης: phospholipase C / protein kinase C (PLC/PKC), Ras/Raf/MAPK, phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) / AKT και cAMP / protein kinase A (PKA) (Marino M. et al, 2006).

Επιπλέον, η E2 δρα "μη γενωμικά" μέσω του GPER, ενεργοποιώντας την απελευθέρωση ενδοκυτταρικού  $Ca^{+2}$ , την παραγωγή cAMP ή την ενεργοποίηση του c-Src με επακόλουθη ενεργοποίηση των MAPK ή των εξαρτώμενων από ασβέστιο/καλμοδουλίνη κινασών. Ο βαθμός στον οποίο η E2 ρυθμίζει την ενεργειακή ομοιόσταση μέσω αυτών των μονοπατιών σηματοδότησης του ER παραμένει ασαφής. Μελέτες έδειξαν ότι η μη γενωμική δράση του ERα παίζει ρόλο στις κυριότερες επιδράσεις της E2 στην ενεργειακή ισορροπία (Gurte et al, 2015).

Πρόσφατα, ένας ορφανός υποδοχέας GPR30 (G protein-coupled receptor) της κυτταρικής μεμβράνης αναφέρθηκε ότι παίζει ρόλο στη μη γενωμική σηματοδότηση οιστρογόνων. Μελέτες έδειξαν ότι ο GPR30 επάγει έκφραση του ERα36, ισομορφής του ERα, που ενεργεί ως εξωπυρηνικός ER επάγωντας τη μη γενωμική σηματοδότηση (Zhao et al, 2010). (Εικόνα 5γ)

### 1.4.3 Δράσεις ER απουσία προσδέτη

Οι ERs μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν από εξωκυτταρικά σήματα απουσία προσδέτη. Η σηματοδότηση αυξητικών παραγόντων ή η διέγερση άλλων μονοπατιών σηματοδότησης οδηγεί σε ενεργοποίηση κινασών που μπορούν να φωσφορυλιώσουν και έτσι να ενεργοποιήσουν τους ERs ή συνδεδεμένους σε αυτούς συνρρυθμιστές απουσία προσδέτη (Εικόνα 4, 5d). Ως παράδειγμα, τα μόρια ERK1/ERK2. Η βιολογική σημασία αυτής της σηματοδότησης του ER παραμένει ασαφής (Zhao et al, 2010).

- Οι ERs ρυθμίζονται μέσω φωσφορυλίωσης τόσο εξαρτώμενοι όσο και ανεξάρτητοι προσδέτη. Ανάλογα με το ποια σημεία του ERα φωσφορυλιώνονται, η φωσφορυλίωση μπορεί είτε να επάγει είτε να αναστείλει την δέσμευση του με το DNA, να μεταβάλει τον πυρηνικό εντοπισμό του και έτσι να μεταβάλει και τη μεταγραφή του γονιδίου στόχου (Klinge, 2008).

### 1.4.4 Σύγκλιση γενωμικής και μη δράσης

Οι ERs λόγω αυτού του πολύπλοκου τρόπου σηματοδότησης που αναφέρθηκε μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταγραφή μέσω ενός μηχανισμού "μεταγραφικής διασταυρούμενης επικοινωνίας" (transcriptional cross-talk), που περιλαμβάνει συνδυασμό γενωμικών και μη δράσεων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων πολλαπλών ρυθμιστικών δράσεων του ER είναι τα γονίδια κυκλίνη D1 και VEGF (vascular endothelial growth factor) (Marino M. et al, 2006).



Η κυκλίνη D1 αποτελεί έναν καλά καθορισμένο στόχο της E2 στον μαστικό αδένα και παίζει καθοριστικό ρόλο για την εξέλιξη των κυττάρων σε όλη τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου. Ο υποκινητής της κυκλίνης D1 είναι πολύπλοκος και περιέχει θέσεις πρόσδεσης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, αλλά δεν έχουν ταυτοποιηθεί αλληλουχίες παρόμοιες με τα ERE. Έχει προταθεί όμως ότι η ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της κυκλίνης D1 από την E2 προκύπτει από διαφορετικές δράσεις του ER, όπως άμεση αλληλεπίδραση ERα/Sp-1 ή ERα/AP-1 καθώς και εξαρτώμενες απ' τον ER μη γενωμικές δράσεις. Ο υποκινητής της περιέχει επίσης θέσεις δέσμησης για STAT5 (signal transducer and activators of transcription) και NF-κB, οι οποίες θα μπορούσαν να είναι στόχοι γενωμικών και μη δράσεων των ERs (Marino M. et al, 2006).

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από την E2 είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία που περιλαμβάνει τόσο γενωμικές όσο και μη γενωμικές δράσεις που συγκλίνουν σε ορισμένα στοιχεία απόκρισης που εντοπίζονται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων. Οι τελικές γονιδιακές αποκρίσεις, εντούτοις, θα μπορούσαν να εξαρτηθούν από έναν αριθμό συνθηκών όπως ο συνδυασμός των μεταγραφικών παραγόντων που συνδέονται με έναν υποκινητή γονιδίου, ο κυτταρικός εντοπισμός των ERs, τα επίπεδα των διαφόρων συνρρυθμιστικών πρωτεϊνών, καθώς και η φύση των εξωκυτταρικών ερεθισμάτων. Αυτές οι μεταβλητές είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένες στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Επομένως, η E2 θα μπορούσε να χρησιμοποιήσει διαφορετικές οδούς σηματοδότησης ανάλογα τόσο με τον κυτταρικό τύπο όσο και με την φυσιολογική κατάσταση του κυττάρου (Marino M. et al, 2006).

## **1.5 Μιτοχονδριακή δράση**

### **1.5.1 Μιτοχόνδριο**

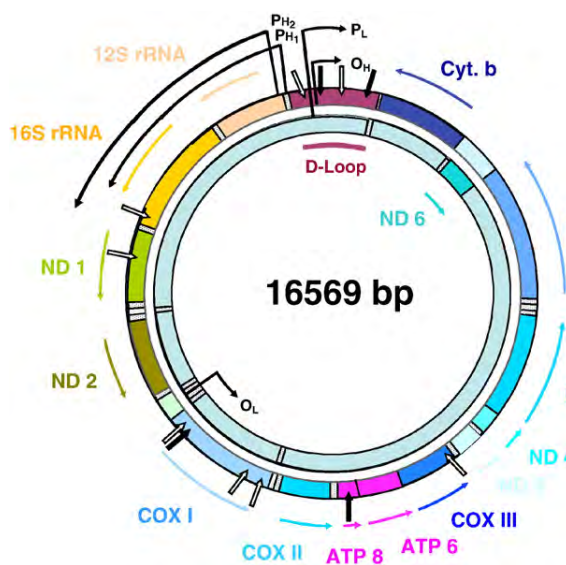
Τα μιτοχόνδρια είναι ζωτικής σημασίας οργανίδια, και συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Παρέχουν περισσότερο από το 90% της απαιτούμενης ενέργειας του κυττάρου μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην αναπνευστική αλυσίδα. Τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε πολλά στάδια ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή ουρίας, στη βιοσύνθεση αίμης και στην β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια είναι βασικά συστατικά απόκρισης στο οξειδωτικό στρες, μέσω της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), στην ανοσορρύθμιση, στη κυτταρική διαφοροποίηση και στη γήρανση. Διαταραχές των μιτοχονδριακών λειτουργιών έχουν συσχετιστεί αιτιολογικά με νευρομυϊκές εκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Πάρκινσον, η πλευρική αμυοτροφική σκλήρυνση καθώς και με καρκίνο (Psarra & Sekeris, 2008).

Η πλήρης λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων απαιτεί τη συνεργασία τους με άλλα κυτταρικά οργανίδια, και κυρίως με τον πυρήνα. Αρκετοί πυρηνικοί υποδοχείς και άλλοι παράγοντες πυρηνικής μεταγραφής, όπως οι NF-κB, AP-1, CREB και p53, εμπλέκονται σε μεταβολικές και αναπτυξιακές διεργασίες που έχουν ανιχνευθεί στα μιτοχόνδρια. Πειραματικά στοιχεία υποστηρίζουν τη δράση των μιτοχονδριακά εντοπισμένων μεταγραφικών παραγόντων στη μιτοχονδριακή μεταγραφή, στην ενεργειακή απόδοση και στην απόπτωση, επεκτείνοντας τον γνωστό πυρηνικό ρόλο αυτών των μορίων εκτός του πυρήνα. Συγκεκριμένα η παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) είναι μια διαδικασία, στην οποία είναι απαραίτητα ένζυμα

που κωδικοποιούνται τόσο από τον πυρήνα όσο και από τα μιτοχόνδρια, με τελικό σκοπό το σχηματισμό ενεργών αναπνευστικών συμπλόκων (Psarra & Sekeris, 2008).

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικοί αισθητήρες των ενεργειακών απαιτήσεων του κυττάρου (Psarra & Sekeris, 2008). Ο μοναδικός ρόλος των μιτοχονδρίων στην παροχή ATP στο κύτταρο μεταβολίζοντας το οξυγόνο στην αναπνευστική αλυσίδα οδηγεί πάντοτε στη δημιουργία ROS. Τα ROS αντιπροσωπεύουν κύριους ενδογενείς αποπτωτικούς παράγοντες και αποτελούν αντιδρώντα μόρια που προέρχονται από το οξυγόνο, συμπεριλαμβανομένου του υπεροξειδίου, του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των υδροξυλικών ριζών (Ishihara et al, 2015). Έτσι, η διακύμανση της παραγωγής ενέργειας μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας μπορεί, σε ακραίες περιπτώσεις, να έχει επιβλαβείς επιδράσεις στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τέλος τα μιτοχόνδρια λαμβάνουν και ενσωματώνουν διάφορα άλλα ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά προ- και αντι-αποπτωτικά σήματα, παίζοντας έτσι καθοριστικό ρόλο στη μοίρα του κυττάρου (Psarra & Sekeris, 2008).

Υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών, οιστρογόνων, ανδρογόνων, θυρεοειδικών ορμονών καθώς και άλλων πυρηνικών υποδοχέων έχουν εντοπιστεί σε μιτοχόνδρια λεμφοκυττάρων, ηπατικού ιστού αρουραίου, εγκεφάλου, νευρογλοιακών κυττάρων του Mueller, σπερματοκυττάρων καθώς και άλλων κυττάρων και ιστών (Psarra & Sekeris, 2008).



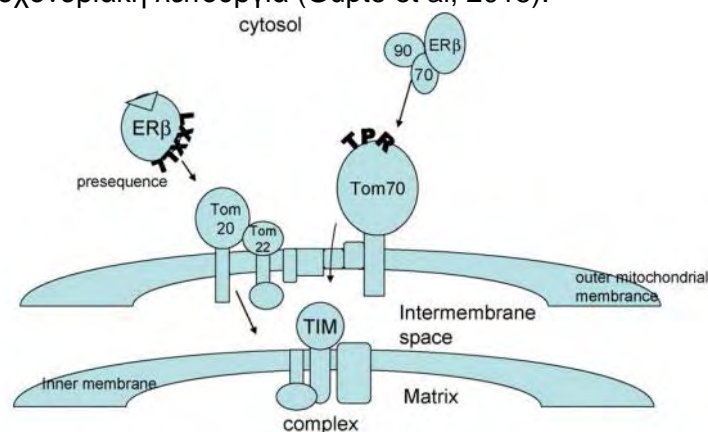
Εικόνα 6: Μιτοχονδριακό γονιδίωμα και πιθανές θέσεις των στοιχείων απόκρισης στις ορμόνες (HREs). Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο 16,569 kb, αποτελούμενο από ένα βαρύ (H) κι έναν ελαφρύ (L) κλώνο. Κωδικοποιεί 13 υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας, 2 rRNA και 22 tRNA. Ο ελαφρύς κλώνος μεταγράφεται από τον υποκινητή PL, ενώ ο βαρύς κλώνος από τους γειτονικούς PH1 και PH2. Όλοι οι υποκινητές εντοπίζονται στη ρυθμιστική περιοχή της D-loop (displacement-loop), ενώ πιθανολογείται και η παρουσία εσωτερικών HREs, που μπορεί να ρυθμίζουν τη διαδικασία της μεταγραφής σε άλλα στάδια. Η μεταγραφή από τους υποκινητές PH2 και PL, δημιουργεί μεγάλα πολυκιστρονικά προϊόντα που κωδικοποιούν ώριμα mRNAs και tRNAs. Αντίθετα, η μεταγραφή από τον PH1 υποκινητή δημιουργεί ένα μικρό σε μήκος μετάγραφο που κωδικοποιεί δύο rRNAs. Τα λευκά βέλη αντιπροσωπεύουν τα HREs των πυρηνικών υποδοχέων τάξης I, ενώ τα μαύρα βέλη τα HREs των υποδοχέων τάξης II (Psarra & Sekeris, 2008).

### 1.5.2 Δράσεις ER στο μιτοχόνδριο

Η E2 φαίνεται να ρυθμίζει διάφορες μιτοχονδριακές λειτουργίες, όπως την παραγωγή ATP, τη διατήρηση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, τη μιτοχονδριακή βιογένεση και τη ρύθμιση των συγκεντρώσεων ασβεστίου. Οι ERs μπορεί να ρυθμίζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων μέσω είτε της κλασικής γενωμικής οδού είτε μέσω των μη γενωμικών μηχανισμών. Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι οι ERs, και κυρίως ο ERβ παρουσιάζει μιτοχονδριακή εντόπιση και μέσω της άμεσης σύνδεσης με EREs στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα ελέγχει την μιτοχονδριακή μεταγραφή (Gurte et al, 2015). Είσοδος του ERβ στο μιτοχόνδριο μέσω δύο εναλλακτικών οδών απεικονίζεται στην εικόνα 7 και πιθανές θέσεις HREs απεικονίζονται στην εικόνα 6.

Ο ERα είναι απαραίτητος για την αύξηση των περισσότερων πρωτεϊνών της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας (MRC) και των αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην άμυνα κατά του οξειδωτικού στρες. Ο ERβ, ωστόσο, μπορεί να ρυθμίσει αρνητικά την έκφραση των πυρηνικά κωδικοποιημένων υπομονάδων των συμπλόκων της MRC στο αγγειακό σύστημα. Τέλος η E2 έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να επηρεάσει τη μιτοχονδριακή λειτουργία μεταβάλλοντας τον σχηματισμό μιτοχονδριακών ROS και προκαλώντας αντιοξειδωτικές αποκρίσεις (Gurte et al, 2015).

Η ρύθμιση της έκφρασης των μιτοχονδριακών γονιδίων από την E2 πιστεύεται ότι προκαλείται από την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα Nrf1 μέσω ER-ERE στον πυρήνα. Ο Nrf1 ενεργοποιεί με τη σειρά του τη μεταγραφή γονιδίων από τον πυρήνα, όπως ο μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A (mitochondrial transcriptional factor A, TFAM), που ρυθμίζουν το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Ο Nrf1 έχει ένα ERE στην περιοχή του υποκινητή του, στο οποίο δεσμεύονται τόσο ο ERα όσο και ο ERβ *in vitro*. Νέα στοιχεία υποστηρίζουν ότι ο GPER επίσης ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή λειτουργία προκαλώντας άνοιγμα στον MPTP (mitochondrial permeability transition pore) μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού σηματοδότησης ERK. Η ενεργοποίηση του GPER από τον αγωνιστή του, G1, προστατεύει την καρδιά από τραυματισμό λόγω ισχαιμίας, προστατεύοντας τη μιτοχονδριακή λειτουργία (Gurte et al, 2015).



**Εικόνα 7:** Είσοδος του ERβ στα μιτοχόνδρια μέσω δύο εναλλακτικών οδών. Στην πρώτη οδό, ο ERβ που βρίσκεται χωρίς προσδέτη συνδεδεμένος με τις Hsp70 και Hsp90, αναγνωρίζεται από την Tom70. Στη δεύτερη οδό, ο ERβ που βρίσκεται συμπλοκοποιημένος με τον προσδέτη του, αναγνωρίζεται από τις Tom20/Tom22, μέσω του μοτίβου LXXLL (όπου L λευκίνη) που βρίσκεται στην περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (αμινοτελικό άκρο). Και στις δύο οδούς εισόδου αφού περάσει διαμέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης κατευθύνεται στο σύμπλοκο TIM μέσω του οποίου εισέρχεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου (James W. Simpkins, 2008).

## 1.6 ER και νευρικό σύστημα

Οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές είναι ασθένειες που χαρακτηρίζονται από προοδευτικό εκφυλισμό και συστηματική απώλεια λειτουργικών νευρικών κυττάρων (Sertbas et al, 2014). Ανάλογα με το είδος της ασθένειας εκφυλίζονται σταδιακά διαφορετικές περιοχές τόσο του κεντρικού όσο και του περιφερικού νευρικού συστήματος, οδηγώντας στην διαταραχή και πολλές φορές στη διακοπή της νευρωνικής σηματοδότησης από και προς τα σημεία εκείνα με αποτέλεσμα την εμφάνιση των διάφορων παθολογικών φαινοτύπων και τελικά των συμπτωμάτων της αντίστοιχης νόσου. Το γεγονός που καθιστά όλα τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα ανίατα και κατ' επέκταση τραυματικά για τον ίδιο τον ασθενή και τους οικείους του, είναι η ανικανότητα του ανθρώπινου οργανισμού να αναγεννήσει τους εκφυλισμένους νευρώνες, για αυτό και οποιαδήποτε περαιτέρω βλάβη, ουσιαστικά δυσχεραίνει την ήδη βεβαρημένη κατάσταση (Steward et al, 2013).

Στο σύνολό τους οι νευρολογικές και νευροψυχιατρικές διαταραχές που σχετίζονται με νευροεκφυλισμό είναι πολλές, οι πιο σημαντικές και συχνά απαντώμενες είναι οι έξης: Parkinson's Disease (PD), Alzheimer's Disease (AD), Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS), Συσχετιζόμενη με τη ηλικία Εκφύλιση Ωχρής Κηλίδας (Age-related macular degeneration, AMD), Νόσος του Χάντινγκτον (Huntingdon's Disease, HD), Σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) και εγκεφαλικά επεισόδια (Steward et al, 2013).

Τα οιστρογόνα, μέσω των υποδοχέων τους, ασκούν επιρροή στην ανάπτυξη και λειτουργία του νευρικού συστήματος, ενώ τόσο ο ERα όσο και ο ERβ, φαίνεται να έχουν νευροπροστατευτική δράση. Η πολύπλοκη φύση της λειτουργίας των ERs, επιβεβαιώνεται και από τη διαφορική κατανομή τους στον ίδιο τον εγκεφαλικό ιστό με τον ERα να εμφανίζεται σε περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με την αναπαραγωγική λειτουργία, και τον ERβ να πρωτοστατεί σε περιοχές που σχετίζονται με τη μνήμη, τη μάθηση, το στρες και την κατάθλιψη (Cui et al, 2013). Έτσι, αντίστοιχα ο ένας υπότυπος παρευρίσκεται κυρίως στον υποθάλαμο και την αμυγδαλή, ενώ ο άλλος στον ιππόκαμπο, στον πρόσθιο φλοιό, στη μέλανα και στην παρεγκεφαλίδα (Ficocchetti et al, 2012)

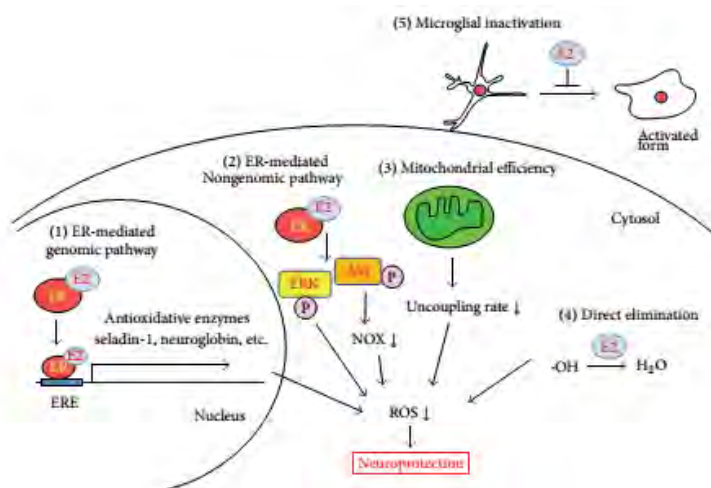
Τα οιστρογόνα, εξαρτημένα ή μη από τον υποδοχέα τους, δρουν μέσω πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών του κυττάρου ώστε να ασκήσουν τη νευροπροστατευτική τους δράση που περιλαμβάνει μείωση του οξειδωτικού στρες, καθώς και αντιφλεγμονώδεις και αντιαποπτωτικές διεργασίες. Παρακάτω αναφέρονται τα κυριότερα μόρια στόχοι τους (Strom et al, 2011).

### 1.6.1 Μείωση οξειδωτικού στρες

Η παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια προκαλεί άμεσες καταστροφικές οξειδωτικές αντιδράσεις και αποπτωτικούς καταρράκτες. Είναι αξιοσημείωτο να αναφερθεί ότι τα οιστρογόνα ασκούν τη νευροπροστατευτική τους δράση (Εικόνα 8) μόνο σε ένα μικρό εύρος συγκεντρώσεών τους, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι καθίστανται επιβλαβείς για το νευρικό ιστό σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (Strom et al, 2011).

Συγκεκριμένα μέσω γενωμικής δράσης του ER, έπειτα από υπερέκφρασή του, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση καταλάσης, μειωμένα επίπεδα της συνθάσης NO (NOS), αύξηση έκφρασης και δραστηριότητας του MnSOD (SOD 2) καθώς και αύξηση της έκφρασης του Cu/Zn SOD (SOD 1)

(Ishihara et al, 2015). Έχουν αναφερθεί επίσης έμμεσες αντιοξειδωτικές επιδράσεις των οιστρογόνων που περιλαμβάνουν της εξασθένιση της απελευθέρωσης υπεροξειδίου μικρογλοίας, την αύξηση της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης και την αύξηση της συνθετάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης, της γλουταρεδοξίνης και της γλουταθειόνης. Ακόμη έχει αναφερθεί ότι προκαλούν μείωση της παραγωγής ελεύθερων ριζών μέσω αύξησης της μιτοχονδριακής αποδοτικότητας, εξασθένιση της ενεργοποίησης της NADPH οξειδάσης και μείωση του δείκτη οξειδωτικού στρες νιτροτυροσίνη. Αυτές οι επιδράσεις έχουν βρεθεί ότι τουλάχιστον εν μέρει απορρέουν μέσω ER-σηματοδότησης η οποία έχει ως στόχο την αύξηση των αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών (Strom et al, 2011).



Εικόνα 8: Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί της E2 στον εγκέφαλο. 1) Μέσω γενωμικής σηματοδότησης ενεργοποιείται η έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων και άλλων λειτουργικών πρωτεϊνών. 2) Η μη γενωμική σηματοδότηση έχει ως αποτέλεσμα την επιβίωση του κυττάρου. 3) Η E2 επηρεάζει τα μιτοχονδριακά ένζυμα ή τα αναπνευστικά σύμπλοκα με στόχο την μείωση των επιπέδων των ROS, ενισχύοντας τη μιτοχονδριακή αποδοτικότητα. 4) Απευθείας εξάλειψη των ROS ή άλλων δραστικών ριζών από την E2. 5) Η E2 καταστέλλει την παραγωγή ROS από μικρογλοιακά κύτταρα εμποδίζοντας την ενεργοποίησή τους. E2, 17β-estradiol; ER, estrogen receptor; ERE,estrogen response element; ERK, extracellular signal-regulated kinase; NOX, NADPH oxidase; ROS, reactive oxygen species (Ishihara et al, 2015).

### 1.6.2 Ρύθμιση της Φλεγμονώδους Απόκρισης

Τα οιστρογόνα έχει αποδειχθεί ότι επάγουν ευρύ φάσμα αντιφλεγμονωδών δράσεων μέσω διαφόρων οδών (Εικόνα 9), όπως μείωση της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτοκινών, μείωση της ενεργοποίησης των μονοκυττάρων και μεταβολής του μοτίβου ενεργοποίησης μικρογλοίας. Οι κλασσικές προφλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-1, IL-6 και TNF-α έχουν έλλειψη ERE, αλλά πιστεύεται ότι επηρεάζονται από την ER-εξαρτώμενη μείωση των πυρηνικών c-Jun και JunD, οδηγώντας στη μειωμένη τους πρόσδεση στις θέσεις AP-1 (Strom et al, 2011).

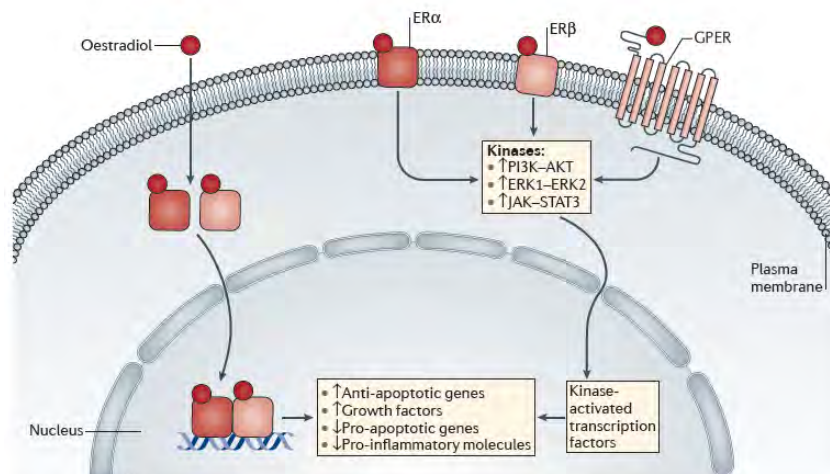
### 1.6.3 Ρύθμιση της Απόπτωσης

Ο υποκινητής του γονιδίου Bcl-2 δεν περιέχει την αλληλουχία ERE. Πάραυτα τα οιστρογόνα μπορούν να αλληλεπιδρούν έμμεσα με Sp-1 θέσεις στην περιοχή του υποκινητή του (Strom et al, 2011).

Συγκεκριμένα η ενεργοποίηση του ER έχει αποδειχθεί ότι:

- Ενεργοποιεί τα μονοπάτια σηματοδότησης ERK1-ERK2 ή PI3K έχοντας ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση του BAD (BCL-associated death promoter) και την αύξηση της έκφρασης του Bcl-2 (Arevalo et al, 2015).
- Επάγει τη μεταγραφή του αντιαποπτωτικού γονιδίου survivin, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), με τη βοήθεια του οποίου η ορμόνη δρα νευροπροστατευτικά στην εγκεφαλική ισχαιμία (Arevalo et al, 2015).
- Επάγει την έκφραση του Bcl-2 μέσω του CREB-εξαρτώμενου μονοπατιού PI3K/Akt, το οποίο με τη σειρά του πιθανόν ενεργοποιείται από τον GPR30 (ισομορφή GPER) (Strom et al, 2011).
- Ρυθμίζει ορισμένα μέλη της οικογένειας BCL-2, όπως το BCL-W και το BIM (BCL-2-interacting mediator of cell death), μέσω αναστολής της JNK (Arevalo et al, 2015).

Συμπερασματικά τα οιστρογόνα αυξάνουν τους αντιαποπτωτικούς παράγοντες σε σύγκριση με τους προαποπτωτικούς. Με αυτόν τον τρόπο επιφέρουν νευροπροστασία (Εικόνα 9), καθώς με την μη ενεργοποίηση του PTP (permeability transition pore) προστατεύουν το μιτοχόνδριο από υπερφόρτωση κυτταροπλασματικού  $Ca^{2+}$  και απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτοσόλιο (Strom et al, 2011).



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



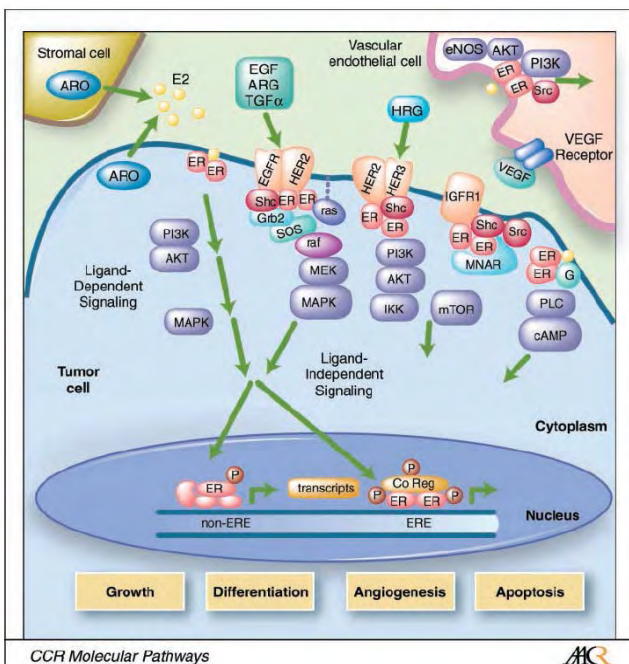
## 1.7 ER και καρκίνος του μαστού

Ο μαστός είναι ένα ευαίσθητο όργανο στην ενδοκρινική λειτουργία. Η ανάπτυξη του στήθους από την εφηβεία, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας ελέγχεται από ένα περίπλοκο ορμονικό σύστημα (Darbre, 2006b). Δεδομένα τόσο από κλινικές μελέτες όσο και από μελέτες σε ζώα δείχνουν ότι τα οιστρογόνα εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (BC) (Deo & Buensuceso, 2010). Σε ένα περιβάλλον συνεχής έκθεσης σε μια ποικιλία χημικών ουσιών που προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές, πρέπει ίσως να μην το θεωρούμε τόσο περίεργο το ότι ο καρκίνος σε αυτό το όργανο έχει γίνει ο κύριος καρκίνος των γυναικών στον δυτικό κόσμο (Darbre, 2006a).

Στα καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, η μιτογόνος δράση της οιστραδιόλης λαμβάνει χώρα όχι μόνο μέσω σύνδεσης με πυρηνικούς ERs αλλά και μέσω μεμβρανικών ERs και GPERs. Η αλληλεπίδραση E2-ER με διάφορες πρωτεΐνες επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση (Renoir et al, 2013). Ας εξετάσουμε κάποια παραδείγματα καρκινογένεσης μέσω των βασικών οδών δράσης του ER:

α) Γενωμική οδός: Σύμπλοκα E2-ERα επηρεάζουν τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στην επιβίωση και, ιδιαίτερα σχετικά με τον καρκίνο, στην μετάσταση και στην αγγειογένεση. Π.χ. ενεργοποιούν γονίδια που εμπλέκονται στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (όπως c-myc, κυκλίνες D, A και E) και μειώνουν την έκφραση άλλων γονιδίων, όπως το γονίδιο p21Waf1/Cip1, αναστολέας της CDK (cyclin-dependent kinase). Η παρουσία του ERβ αναστέλλει την επαγόμενη από ERα μεταγραφή. Συνεπώς, ο ERβ στις βλάβες του BC θεωρείται ότι σχετίζεται με καλοήθεις όγκους (Renoir et al, 2013).

β) Μη γενωμική οδός: Ο πολλαπλασιασμός και η επιβίωση του καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο είναι στενά ρυθμιζόμενοι από υποδοχείς αυξητικών παραγόντων καθώς και από τη δράση των οιστρογόνων (E2) και των υποδοχέων αυτών, ERα και ERβ. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα των καταρρακτών σηματοδότησης που προκαλούνται μέσω αυτής της οδού απεικονίζεται στην εικόνα 10 (Pietras & Marquez-Garban, 2007).



Εικόνα 10 Αλληλεπιδράσεις σηματοδότησης υποδοχέα οιστρογόνου και αυξητικού παράγοντα σε ανθρώπινους όγκους (Pietras & Marquez-Garban, 2007).

γ) Μιτοχονδριακή δράση: Στον καρκίνο, σε αντίθεση με το νευρικό ιστό, η παραγωγή ROS είναι σημαντική για την απόπτωση που προκαλείται από την ακτινοβολία, τους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες και πολλούς παράγοντες κυτταρικού στρες. Το σύμπλοκο E2-ER οδηγεί σε έκφραση μιτοχονδριακών SOD και μείωση του οξειδωτικού στρες (Pedram et al, 2006).

Επίσης η ενεργοποίηση της PI3K από τον μεμβρανικό ER συμβάλλει στην επιβίωση των κυττάρων του καρκίνου του μαστού καθώς οι PI3K και AKT καταστέλλουν τη μετατόπιση του Bax στα μιτοχόνδρια και κατ' επέκταση την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Αυτό υποδηλώνει μια διασταυρούμενη επικοινωνία από τον mbER που επηρεάζει τα μιτοχόνδρια και την κυτταρική βιωσιμότητα. Ο πυρηνικός ER συμβάλλει σημαντικά στη μακροπρόθεσμη προστασία από τον θάνατο των κυττάρων με έκφραση αντιαποπτωτικών γονιδίων όπως το Bcl-2 (Pedram et al, 2006).

Ο ERα είναι υπεύθυνος για την επαγόμενη από οιστρογόνα μιτογόνο σηματοδότηση σε επιθηλιακά κύτταρα ιστών μαστού, μήτρας και ωοθηκών, ενώ αυτό αντισταθμίζεται από την παρουσία του ERβ, ο οποίος ασκεί ένα αντιπρολαπλασιαστικό ρόλο. Και οι δύο ισομορφές του ER εκφράζονται σε παρόμοια χαμηλά επίπεδα στο κανονικό στήθος, ενώ έχει παρατηρηθεί να υπερτερεί η έκφραση του ERα σε κύτταρα BC (Paterni et al, 2014; Renoir et al, 2013).

## 1.8 Οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα είναι στεροειδείς ορμόνες γνωστές κυρίως για το ρόλο τους στην ανάπτυξη και διατήρηση των δευτερογενών φυλετικών χαρακτηριστικών καθώς και στην αναπαραγωγική ικανότητα του γυναικείου φύλου. Τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά άτομα τα οιστρογόνα κυκλοφορούν σε όλο το σώμα επιδρώντας στα περισσότερα συστήματα, συμπεριλαμβανομένων του εγκεφάλου, του μαστού, του καρδιαγγειακού συστήματος, του ανοσοποιητικού συστήματος, των αναπαραγωγικών (ωοθηκών και μήτρας), της ουροδόχου κύστης, του δέρματος και των οστών (Cui et al, 2013).

Ενδογενώς, τα οιστρογόνα παράγονται κυρίως από τα κύτταρα του κοκκιδώδους υμένα του ωοθηλακίου από το οχρωσωμάτιο, και σε μικρότερο βαθμό από το φλοιό των επινεφριδίων. Παραγωγή οιστρογόνων γίνεται στον πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, στους όρχεις σε ακόμα μικρότερο βαθμό και στο λιπώδη ιστό μετεμμηνοπαυσιακά μέσω αρωματάσεων που καταλύουν τη μετατροπή της τεστοστερόνης. Το ένζυμο που καταλύει το τελευταίο βήμα της βιοσύνθεσης των οιστρογόνων, είναι η αρωμάση, μέλος του κυτοχρώματος P450 που κωδικοποιείται από το CYP19 και η ιστοειδική της έκφραση εξαρτάται από εξειδικευμένους υποκινητές στη 5' ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου (Cui et al, 2013).

Τα σημαντικότερα φυσικά ενδογενή οιστρογόνα είναι η οιστρόνη (E1), η οιστραδιόλη (E2) και η οιστριόλη (E3). Κατά τη διάρκεια των αναπαραγωγικών ετών μιας γυναίκας, το κύριο κυκλοφορούν οιστρογόνο είναι η 17β-οιστραδιόλη (E2) όντας και η πιο ισχυρή μορφή οιστρογόνου. Τα άλλα δύο στεροειδή, αν και είναι προσδέτες υψηλής συγγένειας του ER, ασκούν ηπιότερη οιστρογονική δράση καθώς είναι πολύ ασθενέστεροι αγωνιστές (Cui et al, 2013; N. Heldring et al, 2007).

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 1.2 η μεταφορά των οιστρογόνων στην κυκλοφορία του αίματος γίνεται από τη σφαιρίνη δέσμησης φυλετικών ορμονών (SHBG), η οποία ρυθμίζει τη

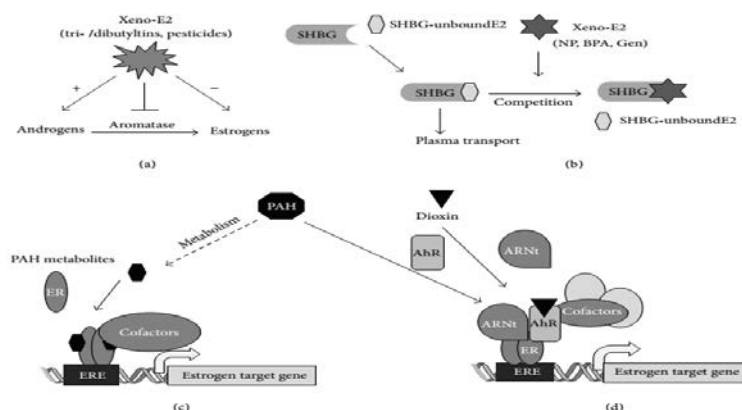


βιοδιαθεσιμότητά τους και κατ' επέκταση και τη δραστηριότητά τους (Gurte et al, 2015). Επίσης με την άφιξη τους στα κύτταρα-στόχους, ως λιπόφιλες ενώσεις, διαπερνούν τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα μέσω παθητικής διάχυσης (Cui et al, 2013). Τέλος τα οιστρογόνα μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό αν και στον εγκέφαλο υπάρχει η δυνατότητα να παραχθούν ενδογενώς οιστρογόνα από χοληστερόλη (Rettberg et al, 2014).

Κατανοώντας τη πολυπλοκότητα της οιστρογονικής σηματοδότησης και τη συμμετοχή των ERs στην παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών, αναγνωρίζεται η ανάγκη ανάπτυξης ουσιών με δυνατότητα επιλεκτικής ρύθμισης της δράσης τους. Τα SERMs (Selective estrogen receptor modulators), πχ ταμοξιφαίνη, είναι ενώσεις που δρουν ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές των οιστρογόνων στην θέση πρόσδεσής τους στον ER και παρουσιάζουν ιστοειδικότητα. Σε αντίθεση με τα SERM, τα SERDs (selective estrogen receptor degrader or downregulator), όπως το fulvestrant, είναι καθαροί ανταγωνιστές. Τα SERDs έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται στους ERs και προκαλούν την αναστολή της δράσης τους ή/και την αποικοδόμησή τους (Farzaneh & Zarghi, 2016).

## 1.9 Ξενοοιστρογόνα

Τα ξενοοιστρογόνα (xenoestrogens) είναι γενικώς γνωστά ως τεχνητά, μη στεροειδή οργανικά χημικά μόρια τα οποία έχουν απελευθερωθεί στο περιβάλλον από αγροτικούς ψεκασμούς, βιομηχανικές επεξεργασίες, τοξικά αστικά απόβλητα συμπεριλαμβανομένων οργανοχλωρικών εντομοκτόνων, πολυχλωριωμένων διφαινυλίων, αλκυλφαινολών και parabens (συστατικό πολλών προϊόντων σωματικής υγιεινής που χρησιμοποιούνται σε καθημερινή βάση). Τα περισσότερα από αυτά τα οργανικά μόρια φέρουν συχνά φαινολικούς ή άλλους δακτυλίους, οι οποίοι συμβάλλουν στην απόκτηση της οιστρογονικής ιδιότητάς τους, δια μέσου διαμοριακών αλληλεπιδράσεων με τις αμινοξικές αλυσίδες του ER (Darbre, 2006b). Η έκθεση σε ξενοοιστρογόνα κατά τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια έχει επιπτώσεις στα συστήματα που υπόκεινται σε οιστρογονική ρύθμιση (όπως το νευρικό και το αναπαραγωγικό) ενοχοποιώντας τα έτσι για την παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών. Τα ξενοοιστρογόνα μπορούν να επιδράσουν στο ενδοκρινικό σύστημα σε πολλά επίπεδα (Εικόνα 11) (Kerdivel et al, 2013).



**Εικόνα 11: Παραδείγματα Αλληλεπίδρασης Ξενοοιστρογόνων και Οιστρογονικής Σηματοδότησης. α) Αναστολή της αρωματάσης που καταλύει το μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα, δημιουργώντας ανισσοροπία στα επίπεδα οιστρογόνων/ανδρογόνων. β) Ανταγωνισμός για τις θέσεις πρόσδεσης της SHBG επηρεάζοντας τη μεταφορά των ορμονών στο πλάσμα. γ, δ) Μη φυσιολογική επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων λόγω ενεργοποίησης του ER και του υποδοχέα AhR (aryl hydrocarbon receptor) αντίστοιχα (Kerdivel et al, 2013).**

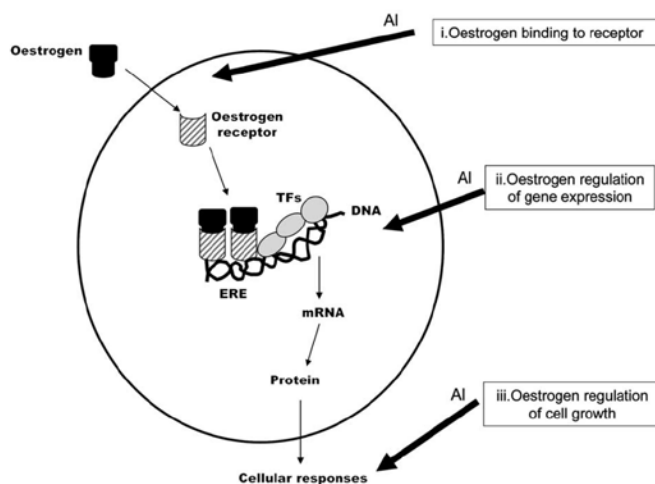
### 1.9.1 Μεταλλοιστρογόνα

Μόλις πρόσφατα αναδείχτηκε μια νέα ομάδα ξηνοιστρογόνων, τα μεταλλοιστρογόνα, που αποτελείται από μεταλλικά ιόντα που είναι επίσης ικανά να παρεμβαίνουν με δράση οιστρογόνου, να δεσμεύονται δηλαδή με ERs και να προκαλούν αποκρίσεις αγωνιστών οιστρογόνων in vitro και in vivo. Κάποια από αυτά τα μέταλλα έχουν γνωστούς φυσιολογικούς ρόλους ενώ αλλά δεν έχουν καμία γνωστή φυσιολογική λειτουργία. Το γεγονός ότι τα ανόργανα μεταλλικά ιόντα διαθέτουν επίσης οιστρογονομιμικές ιδιότητες θέτει ένα νέο μηχανισμό στις ενδοκρινικές διαταραχές (Darbre, 2006b).

Μελέτες δείχνουν ότι τα μεταλλοιστρογόνα περιλαμβάνουν το αργίλιο (aluminium), το αντιμόνιο, το αρσενικό, το βάριο, το κάδμιο, το δισθενές χρώμιο (Cr (II)), το κοβάλτιο, τον χαλκό, το μόλυβδο, τον υδράργυρο, το νικέλιο, το σελήνιο, τον κασσίτερο και το βανάδιο (Darbre, 2006b).

### 1.9.2 Οιστρογονική δράση μεταλλοιστρογόνων

Στο σημείο αυτό ας θυμηθούμε ότι η μοριακή βάση της δράσης των οιστρογόνων, αφού εισέλθουν στο κύτταρο, αρχίζει με τη σύνδεσή τους στη LBD του ER. Ο ER με τη σειρά του σχηματίζει δομή δακτύλου ψευδαργύρου (zinc finger) έτσι ώστε να προσδεθεί στο DNA και συγκεκριμένα σε ειδικές αλληλουχίες (EREs). Λαμβάνοντας υπόψη τα προηγούμενα συνεπάγεται ότι η δράση του ER στηρίζεται στη σχέση πρωτεΐνης-μετάλλου. Τα διάφορα μεταλλοιστρογόνα, π.χ.αργίλιο, μπορούν να παρέμβουν στη δράση του ER με ποικίλους τρόπους (Εικόνα 12) (Darbre, 2006b).



Εικόνα 12: Πιθανά σημεία εμπλοκής του αργιλίου (Al) στις μοριακές δράσεις των ERs. Το Al θα μπορούσε να επηρεάζει i) τη δέσμευση του ER με τους φυσικούς προσδέτες του, ii) την πρόσδεση του συμπλόκου ER-E2 στα EREs, μέσω κατάληψης και απενεργοποίησης βασικών θέσεων δέσμευσης ψευδαργύρου, iii) το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζονται από ERs για τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης (Darbre, 2005).

## 1.10 Αργίλιο και άλατα αργιλίου

Το αργίλιο (Al) είναι το πιο άφθονο μέταλλο που βρίσκεται στο φλοιό της γης. Έχει μια μακρά ιστορία χρήσης από την αρχαία Ρώμη, το Μεσαίωνα μέχρι και σήμερα. Κυρίως έχει χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό του νερού και για θεραπείες (Becaria et al, 2002).

Η κύρια πηγή πρόσληψης Al είναι η τροφή, όπου οι ενώσεις που περιέχουν Al χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα τροφίμων, συντηρητικά, μέσα χρωματισμού κ.α.. Η παρουσία Al στο πόσιμο νερό οφείλεται τόσο στις φυσικές πηγές όσο και στις διαδικασίες καθαρισμού του νερού, κατά τις οποίες

αυξάνεται η περιεκτικότητα του νερού σε διαλυτά, χαμηλού μοριακού βάρους, χημικά δραστικά και πιθανώς πιο απορροφητικά είδη Al. Μια άλλη κύρια πηγή έκθεσης αποτελούν τα αντιδρωτικά που περιέχουν άλατα Al (Becaria et al, 2002).

Το Al εισέρχεται στο οργανισμό από διάφορες οδούς (στοματικές, ενδορινικές, διαδερμικές και παρεντερικές) και απορροφάται είτε διακυτταρικά (εσωτερικοποίηση με ενδοκυττάρωση, απλή διάχυση ή διευκολυνόμενη διάχυση μέσω διαύλων ιόντων) ή παρακυτταρικά (μεταξύ γειτονικών κυττάρων) από το εξωκυττάριο περιβάλλον. Η οσφρητική οδός αποτελεί μια σημαντική οδό έκθεσης του εγκεφάλου στο Al δικαιολογώντας την αιτιολογική σύνδεση του με νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Becaria et al, 2002).

Έχοντας παρόμοια χημεία με το σίδηρο, μεταφέρεται στους ιστούς κυρίως από τη πρωτεΐνη τρανσφερίνη, που δεσμεύει το σίδηρο. Περίπου το 90% του συνολικού Al συνδέεται με αυτή την πρωτεΐνη μεταφοράς έχοντας μάλιστα την ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, μέσω ενδοκύττωσης. Η είσοδος του δια μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού στον εγκέφαλο, σηματοδοτεί και την αρχή της τοξικής του δράσης στο ΚΝΣ και τη συμμετοχή του στην παθογένεση των νευροεκφυλιστικών διαταραχών (Becaria et al, 2002).

Τα άλατα Al (Aluminium chloride, aluminium chlorhydrate and aluminium zirconium chlorhydrate glycine complexes) έχουν ενοχοποιηθεί για τη συμμετοχή τους στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού καθώς και νευροεκφυλιστικών διαταραχών (Becaria et al, 2002; Darbre, 2006b). Προστίθενται ως ενεργός αντιδρωτικός παράγοντες σε καλλυντικά (αποσμητικά), σε συγκεντρώσεις μέχρι 25% w/v, αποτελώντας μια σημαντική πηγή έκθεσης του άνθρωπο στο Al. Το άλας δρα φράσσοντας τους πόρους και αποτρέποντας έτσι τον ιδρώτα να εξέλθει. Απορροφάται από τη δερμίδα και κατόπιν δίσταται στους παρακείμενους ιστούς και στο αίμα μέσω του οποίου μεταφέρεται στα διάφορα όργανα. Λόγω της συνήθειας των δυτικών κοινωνιών να εφαρμόζεται αποσμητικό μετά το ξύρισμα, η πιθανή ύπαρξη μικροτραυματισμών ή αφαίρεσης της κεράτινης στοιβάδας της επιδερμίδας επιτρέπουν την άμεση χημική πρόσβαση. Ωστόσο, οι συνέπειες της εκτεταμένης, μακροχρόνιας και αυξανόμενης χρήσης αυτών των καλλυντικών παραμένουν άγνωστες, ειδικά σε σχέση με το στήθος, το οποίο βρίσκεται κοντά στην εφαρμογή τους (Darbre, 2006b).

### 1.10.1 Αργίλιο και νευρικό σύστημα

Το Al επιδρά με πολλούς τρόπους στην πρόκληση νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Παρακάτω αναφέρονται οι κυριότεροι απ αυτούς:

#### Al και οξειδωτικό στρες

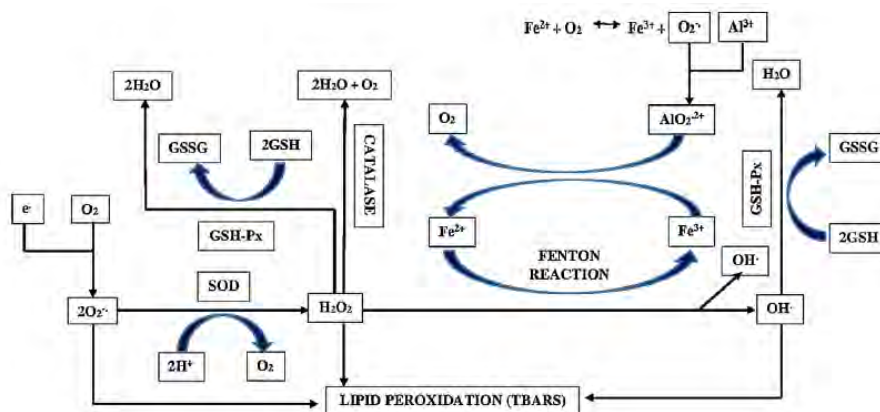
Το Al μπορεί να δεσμευτεί σε αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια του εγκεφάλου, τα οποία περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και να τα καταστήσει ευπρόσβλητα σε ROS. Το Al διεγείρει την υπεροξειδωση λιπιδίων που διαμεσολαβείται από Fe στην αντίδραση Fenton, η οποία προκαλεί παραγωγή ROS και σχηματισμό  $Fe^{3+}$ . Το υπεροξειδίο εξουδετερώνεται από το  $Al^{3+}$  σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο Al-O<sub>2</sub> που αυξάνει την οξειδωτική ικανότητα του O<sub>2</sub>. Η σχέση μεταξύ του Al, ROS, των αντιοξειδωτικών ενζύμων και της υπεροξειδωσης των λιπιδίων παρουσιάζονται διαγραμματικά στην Εικόνα 13 (Maya et al, 2016).

### AI και φλεγμονώδεις αντιδράσεις

Το AI επάγει την έκφραση των υπομονάδων του NF-κB, του προδρόμου της ιντερλευκίνης-1β και της φωσφολιπάσης A2, μορίων που εμπλέκονται σε προφλεγμονώδεις και προαποπτωτικούς μηχανισμούς σηματοδότησης (Maya et al, 2016).

### AI και απόπτωση

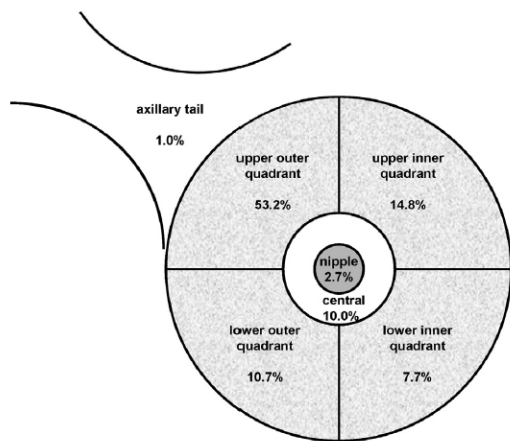
Η απόπτωση θεωρείται γενικός μηχανισμός της τοξικότητας του AI στα κύτταρα. Το AI προκαλεί απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, μείωση του Bcl-2 τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μετατόπιση του BAX στα μιτοχόνδρια, ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και κατακερματισμό του DNA. Επιπλέον, μελέτες δείχνουν ότι το AI οδηγεί σε απόπτωση και μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού μεταγωγής σήματος SAPK / JNK (stress-activated protein kinase or c-jun N-terminal kinase) (Maya et al, 2016).



Εικόνα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης AI, ROS, αντιοξειδωτικών ενζύμων, και υπεροξειδωσης των λιπιδίων. TBARS—Thiobarbituric acid reactive substances, SOD—Superoxide dismutase, GPx—Glutathione peroxidase, GSSG—Oxidized glutathione (Maya et al, 2016).

### 1.10.2 Αργίλιο και καρκίνος του μαστού

Μια από τις πιο εμφανείς ανωμαλίες της συχνότητας εμφάνισης του BC είναι ο δυσανάλογος αριθμός των όγκων που προέρχονται από το ανώτερο εξωτερικό τεταρτημόριο (upper outer quadrant, UOQ) του μαστού (Εικόνα 13). Αυτό έχει αναφερθεί από κλινικές μελέτες εδώ και δεκαετίες, αλλά η δυσαναλογία φαίνεται να αυξάνεται με το πέρασ των χρόνων από περίπου 31% σε αναφορές της δεκαετίας του 1920 έως και 61% σε αναφορές στη δεκαετία του 1990. Η περιοχή UOQ, σε δυσανάλογα με της υπόλοιπες, εμφανίζει υψηλό ποσοστό τόσο κυστίδων όσο και BC. Η μοναδική εξήγηση είναι ότι βρίσκεται κοντά στην περιοχή εφαρμογής των αποσμητικών (P. D. Darbre & Charles, 2010).



Εικόνα 14: Διάγραμμα παρουσίασης επτά περιοχών του ανθρώπινου μαστού στις οποίες καταγράφεται καρκίνος ετησίως σε πολλές δυτικές χώρες (Darbre, 2016).

Το Al παρεμβαίνει στις κυτταρικές αποκρίσεις των οιστρογόνων συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής έκφρασης που ρυθμίζεται απ' αυτά. Έρευνες υποστηρίζουν ότι η έκθεση σε άλατα Al (aluminium chloride or aluminium chlorohydrate) μπορεί να αυξήσει τις μεταναστευτικές ιδιότητες των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του μαστού. Το γενετοξικό προφίλ του Al, μαζί με τις αναφερθείσες οιστρογονικές ιδιότητές του και τις πιθανές επιπτώσεις στις βιομοριακές μεταβολές του μικροπεριβάλλοντος του μαστού (διαταραχή της ομοιόστασης του σιδήρου, επαγωγή οξειδωτικής βλάβης και ανάπτυξη φλεγμονής) θα πρέπει να είναι ένας καλός λόγος για μελλοντική έρευνα σχετικά με τη δυνητική συμμετοχή του Al στη ανάπτυξη και πρόοδο του BC στον άνθρωπο, ανοίγοντας μια νέα καινοτόμο προσέγγιση στην πρόληψη του (Darbre et al, 2013).

### 1.11 Στόχοι – προσεγγίσεις

Η αιτιολογική συσχέτιση του υδροξυ-χλωριούχου αργιλίου (aluminium chlorhydrate ACH), ως πιθανό μεταλλοοιστρογόνο, με νευροεκφυλιστικά νοσήματα και καρκίνο του μαστού, η δεδομένη συσχέτιση του μιτοχονδρίου με τις παραπάνω ασθένειες καθώς και η εμπλοκή των ERs στις μιτοχονδριακές λειτουργίες, αποτέλεσαν κίνητρο για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω διερευνήσαμε την πιθανή μιτοχονδριακή δράση του ACH μέσω του ER στο νευρικό ιστό και σε κύτταρα καρκίνου του μαστού μέσω της αξιολόγησης του μιτοχονδριακού εντοπισμού των ERs σε συνδυασμό με μόρια-στόχους της οιστρογονικής σηματοδότησης.

Η συσχέτιση του ERα με τον καρκίνο του μαστού ήταν η κινητήριος δύναμη για μελέτη της επίδρασης του ACH σε συνάρτηση με τον ERα στην θετική όσον αφορά τον εντοπισμό του ERα κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF7. Επιπρόσθετα η νευροπροστατευτική δράση (μείωση οξειδωτικού στρες, αντιφλεγμονώδεις και αντιαποπτωτικές διεργασίες) που φαίνεται να ασκούν τα οιστρογόνα και η είσοδος του ERβ στο μιτοχόνδριο αποτέλεσαν κίνητρο για τη μελέτη της επίδραση του ACH σε συνάρτηση με τον ERβ στην θετική όσον αφορά τον εντοπισμό του ERβ κυτταρική σειρά ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y.



## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Οργανολογία

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ</b>	
Incubator: New Brunswick (an Eppendorf Company) Galaxy 170S	Μηχάνημα PCR: eppendorf mastercycler gradient
Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell	Συσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot
Λουμινόμετρο: Berthold Technologies, LuBat 39508	Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss Optronic Germany
Μηχάνημα εμφάνισης W.B και gel: FluoChemE/ ProteinSimple	Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak
Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYS™	Laminar Flow Hood Tel Star AV-30/70
Φυγόκεντρος Entrofriger- BLII/ PSSelecta®	Αυτόματος πιπεταδόρος: HTC Lab solution
Φυγόκεντρος Helme Z36HK	Αναδευτήρας: Heidolph Rotamax
Φυγόκεντρος Eppendorf 5810R	Ζυγοί: KERN EW + KERN 440-47 N
Heat blocker: KISKER	Quick spin: Nippon Genetics Europe GmbH
Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S	Vortex: Bio Vortex V1
Υδατόλουτρο: P SELECTA	Επωαστήρας: SHEL LAB

### 2.2 Υλικά

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΧΗΜΙΚΑ</b>		
<b>Χημική ουσία (Εταιρεία)</b>	<b>Χημική ουσία (Εταιρεία)</b>	<b>Χημική ουσία (Εταιρεία)</b>
ACH 50% ( <i>Sigma</i> )	E2 ( <i>Sigma</i> )	ICI 182,780 ( <i>Sigma</i> )
Βιοαιθανόλη ( <i>kalochem</i> )	Αιθανόλη 100% ( <i>Sigma</i> )	Μεθανόλη ( <i>Sigma</i> )
PBS 1x ( <i>Gibco</i> )	Tween 20 ( <i>Sigma</i> )	DMSO ( <i>Sigma</i> )
Bromophenol blue ( <i>Fluca</i> )	β-μερκαπτοαιθανόλη ( <i>Riedel-de Haën</i> )	Ισοπροπανόλη ( <i>Sigma?</i> )
SDS ( <i>Sigma</i> )	Acrylamide/Bis acrylamide 40 % ( <i>Bio-Rad</i> )	Μείγμα αναστολέων πρωτεασών ( <i>Sigma</i> )
APS ( <i>Sigma</i> )	TEMED ( <i>Applichem</i> )	DTT ( <i>Serva</i> )
Triton X-100 ( <i>Applichem</i> )	Lysis Buffer x5 ( <i>Promega</i> )	Bradford protein assay ( <i>Bio-Rad</i> )
Trypsin-EDTA 5% 10x ( <i>Gibco</i> )	FBS ( <i>Invitrogen</i> )	Fixer ( <i>Carestream</i> )
L-Glutamine ( <i>Invitrogen</i> )	Πενικιλίνη-στρεπταμυκίνη ( <i>Invitrogen</i> )	Developer ( <i>Carestream</i> )
Tris ( <i>Serva</i> )	EDTA ( <i>Serva</i> )	Midori Green ( <i>Nippon Genetics</i> )
BSA ( <i>Sigma</i> )	Skimmed milk powder ( <i>Regilait</i> )	Agarose ( <i>Sigma</i> )
Pageruler™ Prestained Protein Ladder ( <i>ThermoScientific Fermentas</i> )	Taq DNA polymerase kit ( <i>Invitrogen</i> )	Glycine ( <i>Serva</i> )
TCA ( <i>Applichem</i> )	ENLITEN®ATP assay ( <i>Promega</i> )	Genomic DNA Mini Kit ( <i>Invitrogen</i> )
KCl ( <i>Merck</i> )	HCl ( <i>Merck</i> )	ECL (A & B) ( <i>Santa Cruz</i> )
NaHCO <sub>3</sub> ( <i>Merck</i> )	NaOH ( <i>Merck</i> )	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ( <i>Merck</i> )
NaCl ( <i>Panreac</i> )	Glycerol ( <i>Applichem</i> )	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ( <i>Merck</i> )

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ, ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΤΟΥΣ**

Διαλύματα	Τρόπος παρασκευής και αποθήκευσής τους
<b>PMSF 200 mM</b>	Με αραιώση 10 % σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20 mM.
<b>Lysis Buffer</b>	20 mM Tris pH 7.5, 0.5 % Triton X-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA Αποθήκευση στους 4 °C. Πριν τη χρήση του γίνεται προσθήκη 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF και κατάλληλη ποσότητα κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών από την εταιρεία Roche
<b>Διάλυμα Bradford</b>	Stock 5x. Χρήση σε Cτελ 1x, αραιωμένο σε ddH <sub>2</sub> O. Αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford, 1:1000.
<b>Sample Buffer 4x</b>	1 M Tris pH 6.8, 10 % γλυκερόλη, 10 % SDS, 5 % β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 % κυανούν της βρωμοφαινόλης. Αποθήκευση στους -20 °C
<b>Tris 20 mM pH 7.5</b>	Αραιώση stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 (4°C) σε ddH <sub>2</sub> O. Αποθήκευση σε R.T
<b>Tris-HCl 1.5M pH 8.8</b>	Διάλυση κατάλληλης ποσότητας Tris σε dH <sub>2</sub> O. Ρύθμιση pH στο 8.8 με προσθήκη HCl 12 N. Αποθήκευση στους 4 °C
<b>TEMED</b>	Χρήση χωρίς αραιώση. Αποθήκευση στους 4 °C.
<b>Υπερθειικό αμμώνιο (APS)</b>	Παρασκευή δ/τος συγκέντρωσης 10% w/v με χρήση ως διαλύτη ddH <sub>2</sub> O. Αποθήκευση στους -20 °C.
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x</b>	25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS διαλυμένων σε ddH <sub>2</sub> O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος. Διατήρηση σε R.T.
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x</b>	Παρασκευή δ/τος σε συγκέντρωση 10%v/v από RB 10x και χρήση dH <sub>2</sub> O ως διαλύτη. Προσθήκη SDS σε αναλογία 0.1 %. Αποθήκευση σε R.T.
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10x</b>	10 % Running Buffer 10x, 20 % MeOH και 0.05 % SDS. Συμπλήρωση όγκου με dH <sub>2</sub> O. Αποθήκευση στους 4 °C.
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10x</b>	91 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 17 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> και 1500 mM NaCl. Αποθήκευση σε R.T
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1x</b>	Αραιώση του stock buffer PBS 10x σε dH <sub>2</sub> O ή ddH <sub>2</sub> O. Προσθήκη Tween-20 σε αναλογία 1 %. Διατήρηση σε R.T
<b>Διαλύματα για εμφάνιση σήματος</b>	Χρήση δύο εμπορικών σκευασμάτων της Kodak, ένα δμ ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα δμ μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Παρασκευή με ανάμειξη 1 : 3,5 v/v από το αντίστοιχο δμ (fixer ή developer) σε dH <sub>2</sub> O.
<b>Loading Buffer (ρυθμιστικό διάλυμα φορτώσης νουκλεοτιδίων σε πηκτική αγαροζή)</b>	0,25% w/v μπλέ της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue), 0,25% w/v xylene cyanol, 30% v/v γλυκερόλη όπου διαλύονται σε ddH <sub>2</sub> O. Αποθηκεύεται στους 4 °C.
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης νουκλεοτιδίων-stock (TAE 50x)</b>	Για 1l: 242,2 grTris σε 600 ml ddH <sub>2</sub> O, αργή προσθήκη 57,1 ml υγρού οξικού οξέος και 100 ml EDTA 0,5 M, pH = 8. Συμπλήρωση με ddH <sub>2</sub> O μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Τελικές συγκεντρώσεις του χρησιμοποιούμενου TAE 1x: 0.04 M Tris - Acetate, 0.001 M EDTA
<b>BufferA</b>	Hepes-KOH 20mM pH 7.5, KCl 10 mM, MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 0,1 mM και σουκρόζη 250 mM.
<b>BufferB</b>	Tris 20mM pH 7.5, μαννιτόλη 0,21 mM, EDTA 2,5 mM και σουκρόζη 0,07 mM
<b>RIPA Buffer</b>	Tris/HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, NP-40 1% και Na-deoxycholate 0,25%. Αποθήκευση στους 4 °C. Πριν τη χρήση του γίνεται προσθήκη 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF και κατάλληλη ποσότητα κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών από την εταιρεία Roche

**ΠΙΝΑΚΑΣ 4: ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ**

Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco®	Glucose	L-glutamate	pyruvate	phenol red
DMEM high glucose	4,5g/mol	+	+	+
DMEM low glucose	1g/mol	+	+	+
DMEM high glucose	4,5g/mol	+	-	-
DMEM low glucose	1g/mol	+	-	-

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5: ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ**

Πρωτογενή Αντισώματα		Δευτερογενή Αντισώματα	
<b>Αντίσωμα έναντι:</b>	<b>Εταιρεία:</b>	<b>Αντίσωμα έναντι:</b>	<b>Εταιρεία:</b>
ERα (ERα G20)	SantaCruz	mouse IgG-HRP	Pierce Antibodies
ERβ (ERβH150)	SantaCruz	rabbit IgG-HRP	Pierce Antibodies
ERβ (ERβ MCA)	Serotec	goat IgG-HRP	Pierce Antibodies
β- ακτίνης	Sigma		
α-τουμπουλίνης	Sigma		
Casp 3	Abcam		
Casp 9	Cell Signalling		
Bcl 2	SantaCruz		
Bax	Cell Signalling		
Bcl-xl	Cell Signalling		
CytC	SantaCruz		
cMyc	Cell Signalling		
p53	Doka		
a-TRX2	Karolinska Institutet		
SDH	Invitrogen		
PEPCK	SantaCruz		

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6: ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ**

Σωληνάρια για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (cryovials ή cryotubes) (Sarstedt)	Ειδικές φιάλες για ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων (Flasks) (Sarstedt)
Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 mL, 50 mL) (Sarstedt)	Πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorfs (1.5 mL, 2.0 mL) (Sarstedt)
Πιπέττες ορολογικές -Serological (2, 5, 10 και 25 mL) (Sarstedt)	Ρύγχοι (0.2-10 µL, 20-200 µL και 100-1000 µL) (Sarstedt)
Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) 60mm και 150x20mm (Sarstedt)	Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) µε 6× και 24× wells (Sarstedt)
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,45µm: Amersham™ Protran™	Χαρτιά Whatman (Sigma)
Φωτογραφικά φιλμ ανίχνευσης σήματος σε μεμβράνη κατά τη διαδικασία western blot (FUJI MEDICAL)	Γυάλινα σιφώνια (Kimble)



## 2.3 Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω κυτταρικές σειρές. Οι πληροφορίες και οι εικόνες αλιεύτηκαν από την επίσημη ιστοσελίδα της εταιρείας "<http://www.lgcstandards-atcc.org>".

### 1) MCF-7

**Organism:** *Homo sapiens, human*

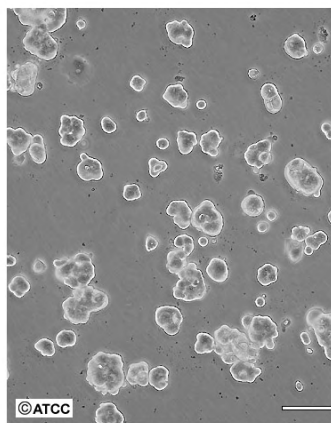
**Cell Type:** *epithelial*

**Tissue:** *mammary gland, breast; derived from metastatic site: pleural effusion*

**Disease:** *adenocarcinoma*

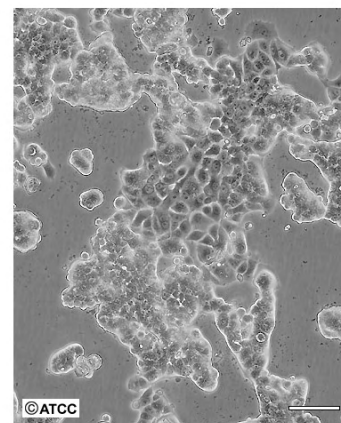
**Product Format:** *frozen*

ATCC Number: **HTB-22**  
Designation: **MCF-7**



©ATCC  
Low Density

Scale Bar = 100µm



©ATCC  
High Density

Scale Bar = 100µm

### 2) SH-SY5Y

**Organism:** *Homo sapiens, human*

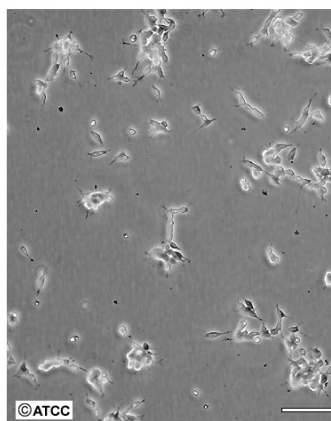
**Cell Type:** *epithelial*

**Tissue:** *bone marrow*

**Disease:** *neuroblastoma*

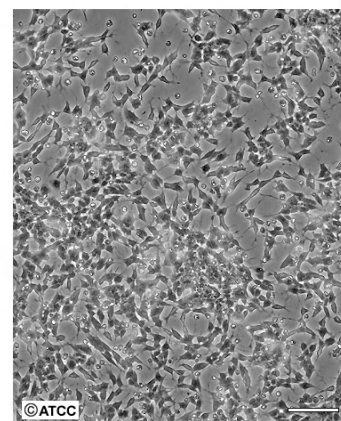
**Product Format:** *frozen*

ATCC Number: **CRL-2266**  
Designation: **SH-SY5Y**



©ATCC  
Low Density

Scale Bar = 100µm



©ATCC  
High Density

Scale Bar = 100µm

### 3) Neuro-2a (N<sub>2</sub>A)

**Organism:** *Mus musculus, mouse*

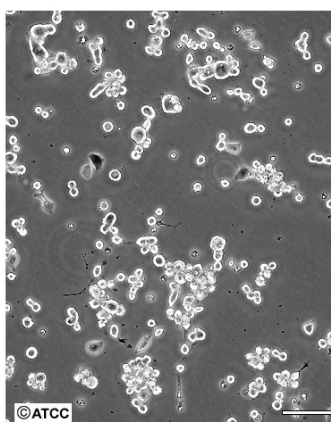
**Cell Type:** *neuroblast*

**Tissue:** *brain*

**Disease:** *neuroblastoma*

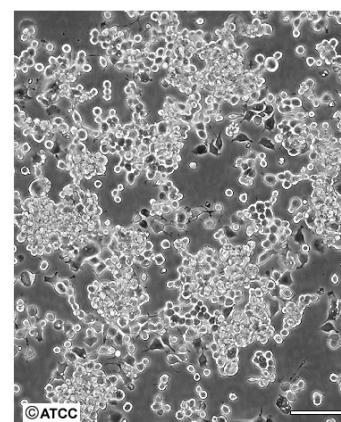
**Product Format:** *frozen*

ATCC Number: **CCL-131**  
Designation: **Neuro-2a**



©ATCC  
Low Density

Scale Bar = 100µm



©ATCC  
High Density

Scale Bar = 100µm

Εικόνα 15: Παρουσίαση των κυτταρικών σειρών MCF-7, SH-SY5Y και N<sub>2</sub>A από την επίσημη ιστοσελίδα της εταιρείας "<http://www.lgcstandards-atcc.org>".

## 2.4 Τεχνικές

### 2.4.1 Τεχνικές εντός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών

#### 2.4.1.1 Απόψυξη κυτάρων

Οι κυτταρικές σειρές φυλάσσονται σε cryovial σε βαθιά κατάψυξη: είτε σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$  είτε σε υγρό άζωτο,  $-120^{\circ}\text{C}$ . Η διαδικασία του ξεπαγώματος είναι κοινή και για τις δύο θερμοκρασίες φύλαξης και έχει ως εξής:

Εξαγωγή του cryovial από την κατάψυξη και τοποθέτησή του εντός του υδατόλουτρου ( $37^{\circ}\text{C}$ ) όπου λίγο πριν ξεπαγώσει εντελώς μεταφέρεται γρήγορα στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar flow hood). Εκεί μεταφέρεται γρήγορα όλο το περιεχόμενό του (1ml) σε δοκιμαστικό σωλήνα (falcon) που έχει ήδη προστεθεί σε αυτόν 4-5ml θρεπτικού μέσου (DMEM), έτσι ώστε να μειωθεί ο χρόνος επαφής των κυττάρων με το DMSO το οποίο υπήρχε κατά τη φύλαξή τους. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δοκιμαστικού σωλήνα για 5 λεπτά, 1000 rpm και σε θερμοκρασία  $20-25^{\circ}\text{C}$ . Με το πέρας της φυγοκέντρησης γίνεται αναρρόφηση του υπερκειμένου με γυάλινη πιπέτα Pasteur και καλή επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 5 ml θρεπτικού. Τέλος, μεταφέρεται το επαναδιαλυτοποιημένο περιεχόμενο σε φλάσκα και μετά από γρήγορη μικροσκοπική εξέταση της μορφής και ποσότητας των ξεπαγωμένων κυττάρων, τοποθετείται εντός του επωαστικού κλιβάνου, σε συνθήκες  $37^{\circ}\text{C}$  και 5%  $\text{CO}_2$ .

#### 2.4.1.2 Καλλιέργεια κυττάρων

Τα MCF-7, τα SH-SY5Y και τα  $\text{N}_2\text{A}$  καλλιιεργήθηκαν σε DMEM θρεπτικό με προσθήκη 10% FBS, 2mM L-γλουταμίνης και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Στο θρεπτικό μέσο των MCF7 προστέθηκε επίσης 1μg/ml ισουλίνη και  $10^{-10}$  E2. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν στους  $37^{\circ}\text{C}$  σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα με 5%  $\text{CO}_2$ . 48 ώρες πριν την προσθήκη ουσιών τα κύτταρα καλλιιεργόντουσαν σε DMEM χωρίς κόκκινο της φαινόλης (phenol red) και με προσθήκη 10% κατεργασμένου με ενεργό άνθρακα FBS (charcoal inactivated), 2mM L-γλουταμίνης και 1% πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης. Στο θρεπτικό μέσο των MCF-7 έγινε ακόμη προσθήκη 1μg/ml ισουλίνης, αλλά όχι E2 καθώς η προσθήκη της αποτελεί συνθήκη των πειραμάτων. Βασική διαφορά των θρεπτικών μέσων των τριών κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν είναι ότι των MCF-7 περιέχει υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (4,5g/mol) ενώ των SH-SY5Y και  $\text{N}_2\text{A}$  χαμηλή (1g/mol).

#### 2.4.1.3 Θρυψινοποίηση

Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, η θρυψίνη επιδρά πρωτεολύοντας πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων τόσο στην επιφάνεια της φλάσκας όσο και σε γειτονικά τους κύτταρα. Αυτό είναι αναγκαίο σε περιπτώσεις κορεσμού (κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας κατά 80-90%), σε περιπτώσεις ύπαρξης πολλών και μεγάλων συσσωματωμάτων αλλά και πριν από χρήση ή μεταφορά των κυττάρων. Η κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα πέρασμα (passage). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- ❖ Αφαίρεση θρεπτικού από φλάσκα και προσθήκη 1-2ml θρυψίνης.
- ❖ Κλείσιμο της φλάσκας και μέσω ήπιων κινήσεων, κάλυψη όλων των κυττάρων από τη θρυψίνη.
- ❖ Γρήγορος μικροσκοπικός έλεγχος και άμεση τοποθέτηση τη φλάσκας στον κλίβανο για 1- 2 λεπτά.
- ❖ Εξέταση της φλάσκας στο μικροσκόπιο: ιδανικά όλα τα κύτταρα (μεμονωμένα ή σε συσσωματώματα) επιπλέουν. Αν αυτό δεν συμβεί, κίνηση ελαφρώς τη φλάσκα, μικροσκοπική παρατήρηση και επανατοποθέτησή της για άλλο 1 λεπτό στον κλίβανο. Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στον χρόνο έκθεσης των κυττάρων στη θρυψίνη, γιατί η παρατεταμένη πρωτεόλυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροτοξικότητα.
- ❖ Προσθήκη θρεπτικού μέσου σε ποσότητα 4x του όγκου της θρυψίνης, για να σταματήσει η δράση της, και μεταφορά του περιεχομένου σε falcon.
- ❖ Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, σε 1000rpm και 20-25°C. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε θρεπτικό μέσο για να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω τα κύτταρα ή να επανατοποθετηθούν στη φλάσκα ανάπτυξης.

#### 2.4.1.4 Ψύξη Κυττάρων

Ύστερα από τη θρυψινοποίηση της φλάσκας και μεταφορά σε falcon της ποσότητας των κυττάρων που υπολογίσθηκε να παγώσουν, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων με FBS. Η ποσότητα των κυττάρων που ψύχεται εξαρτάται από την εκάστοτε κυτταρική σειρά (π.χ. ποσότητα που χρειάζεται για επανακαλλιέργεια) καθώς και από τη διαθεσιμότητα των κυττάρων (π.χ. ποσότητα που θα χρειαστεί για πείραμα). Το σύνηθες είναι η ψύξη δύο cryovial με προσθήκη στο καθένα 90% FBS με τα διαλυτοποιημένα κύτταρα και 10% DMSO. Λογω υψηλής κυτταροτοξικότητας του DMSO, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, πρέπει να προστεθεί τελευταίο στο vial και η μεταφορά του vial στην κατάψυξη πρέπει να γίνει όσο το γρηγορότερο δυνατό, με συνεχή ανάδευση πάνω-κάτω κατά τη μεταφορά.

#### 2.4.1.5 Καταμέτρηση και στρώσιμο κυττάρων

Για τους μετέπειτα χειρισμούς των κυττάρων (πχ. στρώσιμο σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας) απαιτείται μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού και ισόποση τοποθέτησή του στο well-plate. Ύστερα από θρυψινοποίηση και καλή επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων με θρεπτικό μέσο, μεταφέρονται 10μl εντός της καλυπτρίδας στο αιμοκυτταρόμετρο neubauer και μετράται ο αριθμός των κυττάρων στα αντίστοιχα τεταρτημόρια του neubauer στο μικροσκόπιο (Εικόνα 15).

Υπολογισμός ποσότητας κυττάρων που διαθέτουμε στη φλάσκα μας: Έστω a, b, c και d ο συνολικός αριθμός των κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο. Υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων που διαθέτουμε ανά ml μέσω του τύπου:  $N_{\text{διαθέσιμων κυτ.}} = \frac{a+b+c+d}{4} \times 10.000$

Υπολογισμός του αριθμού των επιθυμητών κυττάρων μέσω του τύπου:  $N_{\text{επιθυμητων κυτ.}} = \frac{N_{\text{κυτ.}}}{\text{well}} \times N_{\text{well}}$

Υπολογισμός του όγκου του διαλύματος που περιέχει N επιθυμητών κυτ. μέσω του τύπου:

$$V_{\text{επιθυμητό}} = \frac{N \text{ επιθυμητών κυτ.}}{N \text{ διαθέσιμων κυτ.}}$$

Μεταφορά του  $V_{\text{επιθυμητό}}$  σε νέο falcon και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, 1000rpm και σε RT.

Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε κατάλληλο V θρεπτικού ( $\frac{\text{Όγκος θρεπτικού που προτείνεται}}{\text{well}} \times N \text{ well}$ ) και ισοκατανομή του παραπάνω διαλύματος στα wells. Χρήση ως θρεπτικό μέσο το DMEM που περιέχει 10% cis-FBS (charcoal inactivated serum, 3.4.1.7) και 1% L-γλουταμίνη διαλυμένα σε DMEM χωρίς phenol red.

Τέλος, μετά την τοποθέτηση των κυτάρων εντός των πηγαδιών, το plate κλείνει και γίνεται μία περιφερική κίνηση προκειμένου να είναι ομοιόμορφη η κατανομή των κυτάρων εντός των πηγαδιών. Προσοχή, να μην γίνεται έντονη ανακίνηση, διότι λόγω στατικού ηλεκτρισμού τα κύτταρα τείνουν να συγκροτούν συσσωματώματα στο κέντρο. Πριν, τοποθετηθούν στον επωαστικό κλίβανο, εξετάζεται η εικόνα τους μικροσκοπικά.

#### 2.4.1.6 Προσθήκη ουσιών

Στην παρούσα διπλωματική εργασία ερευνήθηκε η δράση του υδροξυ-χλωριούχου αργιλίου (ACH), το οποίο όπως ειπώθηκε στην εισαγωγή φαίνεται να εμφανίζει οιστρογονική δράση. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η  $E_2$  (17β-οιστραδιόλη) και επίσης χρησιμοποιήθηκε το τεχνητό μόριο ICI182,780, το οποίο δρα ως ανταγωνιστής του υποδοχέα των οιστρογόνων. Οι παραπάνω ουσίες μελετήθηκαν στις ακόλουθες τελικές συγκεντρώσεις:  $E_2$   $10^{-9}M$ , ACH  $10^{-4}M$ , ICI  $10^{-7}M$  καθώς και σε συνδυασμό μεταξύ τους. Επειδή η  $E_2$  είναι διαλυμένη σε αιθανόλη και το ICI σε DMSO, προς αποφυγή λανθασμένης αξιολόγησης αποτελεσμάτων λόγω της πιθανής επίδρασης του διαλύτη, σε όλες τις συνθήκες κατεργασίας των κυτάρων διατηρήθηκε σταθερή η συγκέντρωση του διαλύτη, της αιθανόλης και του DMSO αντίστοιχα.

#### 2.4.1.7 Κατεργασία με ενεργό Άνθρακα για Παρασκευή cis-FBS

Για την απενεργοποίηση του FBS, δηλαδή την απομάκρυνση όλων των ενεργών βιολογικών συστατικών του, όπως είναι για παράδειγμα οι ορμόνες, προς παρασκευή charcoal inactivated FBS (cis) εφαρμόστηκε κατεργασία με ενεργό άνθρακα σύμφωνα με το πρωτόκολλο καθαρισμού (Sigma). Ο ενεργός άνθρακας έχει τη δυνατότητα να προσδένεται σε λιπόφιλα μόρια κι ως εκ τούτου να αφαιρεί ορμόνες (ή έστω να μειώνει σημαντικά τα επίπεδά τους) όπως ανδρογόνα, οιστραδιόλη, προγεστερόνη, κορτιζόλη, T3 και T4 από το FBS. Οι συγκεκριμένες λιπιδικές ορμόνες του ορού είναι απαραίτητο να αφαιρεθούν ώστε να είναι δυνατή η αντικειμενική εκτίμηση της επίδρασής τους μετά την εξωγενή τους προσθήκη, η οποία και είναι απαραίτητη για την περαιτέρω μελέτη και την πρόοδο του πειράματος.

## **2.4.2 Τεχνικές εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών**

### **2.4.2.1 Συλλογή κυττάρων**

Μετά το πέρας της επώασης των κυττάρων με τις ουσίες γίνεται συλλογή των κυττάρων (Harvesting). Κατά τη διαδικασία της συλλογής των κυττάρων από τα wells, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και γίνεται μια πλύση με PBS 1x (500μl). Έπειτα, χρησιμοποιώντας το κατάλληλο μηχάνημα scraper (ράβδος με πλαστική εύκαμπτη επιφάνεια στην άκρη) το οποίο σύρεται καθόλη την επιφάνεια του well ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα, συλλέγονται σε αποστειρωμένα erpendorfs, τα οποία βρίσκονται σε πάγο. Πραγματοποιείται και μια δεύτερη πλύση με PBS 1x (500μl) και πάλι scraping ώστε να συλλεχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα των κυττάρων. Μετά τη συλλογή των κυττάρων, τα erpendorfs φυγοκεντρούνται για 5min στα 1500rpm σε RT. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα με τα κύτταρα είτε φυλάσσεται στους -80°C είτε χρησιμοποιείται για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να αποθηκεύονται τα κύτταρα στους -80°C με το PBS ή το θρεπτικό τους γιατί υπάρχει ο κίνδυνος λύσης τους.

### **2.4.2.2 Λύση με χρήση υπερήχων (Sonication)**

Αρχικά γίνεται λύση του κυτταρικού ιζήματος με προσθήκη δ/τος λύσης κυττάρων (lysis buffer), ο όγκος του οποίου εξαρτάται από την ποσότητα του εκάστοτε ιζήματος (συνήθως 40-70μl). Ύστερα από μικρή ανάδευση των κυττάρων με την πιπέτα επωάζονται για 20-25 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία του sonication όπου επιτυγχάνεται αποτελεσματικότερη λύση των κυττάρων και κατακερματισμός του DNA. Η όλη διαδικασία του sonication εξαρτάται από την κυτταρική σειρά, όμως συνήθως γίνεται επανάληψη 4-5 κύκλων όπου τα κυτταρικά περιεχόμενα εκτίθενται για 1" στους υπερήχους που εκπέμπονται από την αντίστοιχη συσκευή (Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S). Οι κύκλοι απέχουν μεταξύ τους 45".

### **2.4.2.3 Χρωματογραφική μέθοδος Bradford για την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών.**

Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 προσδένεται στα μόρια των πρωτεϊνών και ειδικότερα στα κατάλοιπα λυσίνης παράγοντας έγχρωμο (μπλέ) προϊόν. Η ένταση του χρώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Αυτή η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα 595nm.

Το απόθεμα του αντιδραστηρίου Bradford που διατίθεται στο εργαστήριο είναι σε συγκέντρωση 5x και χρησιμοποιώντας το νόμο της αραιώσης προκύπτει το επιθυμητό 1x. Μετά την προσθήκη της σε νέους αποστειρωμένους σωλήνες τύπου erpendorf, όπου έχει ήδη προστεθεί το δείγμα σε συγκέντρωση 1/1000, ακολουθεί vortex και επώαση των δειγμάτων για 20 λεπτά στο σκοτάδι σε RT. Σε ένα σωληνάριο τύπου erpendorf προστίθεται lysis buffer 1/1000 αντί για δείγμα για τη χρήση του ως τυφλό. Η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος υπολογίζεται από την εξίσωση που προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA (3.4.2.4.b.). Ανάλυση των δεδομένων με τη βοήθεια του προγράμματος excel, παρέχουν τελικά την ακριβή σύσταση των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση.

#### 2.4.2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση)

a) Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου: Ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών, γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος, με ηλεκτροφόρηση σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, παρουσία θειικού δωδεκυλικού νατρίου (SDS). Οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά σε πήκτωμα χαμηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πήκτωμα συμπύκνωσης), ενώ ο διαχωρισμός πραγματοποιείται αφού οι πρωτεΐνες περάσουν σε πήκτωμα υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδιο (πήκτωμα διαχωρισμού). Το πήκτωμα συμπύκνωσης περιέχει 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS και 4% (w/v) ακρυλαμίδιο. Το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel), περιέχει 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS και 10 ή 12 % (w/v) ακρυλαμίδιο. Ο πολυμερισμός των πηκτωμάτων πραγματοποιείται με προσθήκη 1% (w/v) APS και 0,04% (v/v) TEMED ως καταλύτη πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου.

b) Παρασκευή δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση: Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση περιέχουν τα εξής: i) ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, ii) Tris-HCl pH 7,5, iii) Sample buffer 4x. Επειδή ο τελικός όγκος του κάθε δείγματος που φορτώνεται στα πηγαδάκια του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου ισούται με 20μl ανά ηλεκτροφόρηση και θέλουμε ισοφόρτωση δειγμάτων στα πηγαδάκια της πηκτής πολυακρυλαμιδης για σωστή αξιολόγηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης κάθε δείγματος, υπολογίζεται η συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων και η απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος αυτών ώστε να ηλεκτροφορηθούν 30-50μg πρωτεΐνης ανά διαδρομή ηλεκτροφόρησης. Ο υπολογισμός αυτός γίνεται βάσει της εξίσωσης της πρότυπη καμπύλης που προέκυψε με εφαρμογή της μέθοδο Bradford στον προσδιορισμό συγκέντρωσης διαλυμάτων γνωστής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη. Δείγματα ίδιου όγκου προκύπτουν με προσθήκη αντίστοιχης ποσότητας 20 mM Tris pH 7,5. Τέλος προστίθεται σε όλα τα δείγματα το διάλυμα «φόρτωσης» πρωτεϊνών (sample buffer) σε σταθερή τελική συγκέντρωση 1x. Καθ' όλη τη διάρκεια παρασκευής τους τα δείγματα παραμένουν στον πάγο (4°C).

c) Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση: Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα αναμειγμένα με διάλυμα «φόρτωσης» πρωτεϊνών (sample buffer), που περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη, θερμαίνονται στους 95°C, για 5 λεπτά, συνθήκες οι οποίες είναι αποδιατακτικές. Ο βρασμός παρουσία SDS έχει ως αποτέλεσμα την κατάργηση ομοιπολικών αλληλεπιδράσεων και της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών, ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη προκαλεί αναγωγή των ομοιπολικών δισουλφιδικών δεσμών και κατάργηση της τριτοταγής δομής των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες με την έκθεση τους στο αρνητικά φορτισμένο απορρυπαντικό SDS, αποκτούν αρνητικό φορτίο. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα, γίνεται ανάλυση μείγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (protein marker), που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες μοριακών μεγεθών.

d) Ηλεκτροφόρηση: Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή ένταση ηλεκτρικού ρεύματος στα 0,02 A, σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών που περιέχει 0,1 % (w/v) SDS (running buffer 1x).

#### 2.4.2.5 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blotting)

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western είναι μία αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά από το πήκτωμα σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης (μεμβράνη νιτροκυτταρίνης) και την ανίχνευσή τους με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα.

α) Εξισορρόπηση και μεταφορά πρωτεϊνών: Οι πρωτεΐνες, μετά από το διαχωρισμό τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρονται σε σταθερό μεμβρανικό υπόστρωμα νιτροκυτταρίνης με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου κάθετα προς τις δύο επιφάνειες. Το διάλυμα μεταφοράς περιέχει SDS και μεθανόλη. Το SDS αυξάνει την ικανότητα μεταφοράς αλλά μειώνει την πρόσδεση των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη. Η μεθανόλη χρησιμοποιείται γιατί ελαχιστοποιεί το φούσκωμα του πηκτώματος κατά τη διάρκεια του αποτυπώματος και αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη, αλλά δυσκολεύει την απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το πήκτωμα. Στο δ/μα ηλεκτρομεταφοράς οι πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο και μετακινούνται μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο προς το θετικό πόλο.

Συγκεκριμένα μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί η εξισορρόπηση με εμπότιση του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς, ενώ παράλληλα κόβεται ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης και τέσσερα κομμάτια απορροφητικού χαρτιού Whatman σε μέγεθος λίγο μεγαλύτερο από αυτό του πηκτώματος, τα οποία επίσης εμβαπτίζονται στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς μαζί με δύο σφουγγαράκια προκαθορισμένου και ίδιου μεγέθους. Έπειτα, στην πλευρά της κασετίνας (μαύρου χρώματος) όπου θα εφαρμοστεί ο αρνητικός πόλος του τροφοδοτικού, τοποθετούνται κατά σειρά με τη μέθοδο "sandwich": ένα σφουγγαράκι, δύο απορροφητικά χαρτιά Whatmann, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, η νιτροκυτταρίνη, δύο απορροφητικά χαρτιά Whatmann, ένα σφουγγαράκι και η αναδιπλούμενη πλευρά της συσκευής (λευκού/διαφανούς χρώματος). Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με διαβίβαση ρεύματος σταθερής έντασης 0,35 A για 70 λεπτά στους 4 °C.

Με το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, το τροφοδοτικό απενεργοποιείται και η μεμβράνη (που πλέον φέρει τις πρωτεΐνες που είχαν ηλεκτροφορηθεί), τοποθετείται εντός PBST1x προκειμένου να σημειωθεί ο δείκτης γνωστού μοριακού βάρους με μολύβι, και να μαρκαριστεί παράλληλα και η πλευρά της μεμβράνης όπου έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες.

β) Blocking: Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα PBST1x με 10% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα (3%-5% non-fat dry milk, NFDM), υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Με τη διαδικασία αυτή γίνεται δέσμευση των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος, έτσι ώστε να παρεμποδιστεί πιθανή μη ειδική πρόσδεση αντισωμάτων στις θέσεις αυτές.

γ) Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών: Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα PBST1x με 2% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα ή BSA στους 4°C υπό ανάδευση καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Το ποσοστό αραιώσής του δίνεται από την εταιρεία προμήθευσής του και είναι τέτοια ώστε να μην προσδένεται σε άλλες πρωτεΐνες που υπάρχουν στη μεμβράνη. Μετά την επώαση με το πρώτο αντίσωμα, αυτό απομακρύνεται και πραγματοποιούνται

πέντε διαδοχικές 5 λεπτες πλύσεις υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου με PBSTx1. Αυτό αποσκοπεί στην απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος έτσι ώστε να παραμείνει στη μεμβράνη μόνο ότι έχει δέσει ειδικά, δηλαδή σε συγκεκριμένους επιτόπους που αναγνωρίζει και προσδένεται το αντίσωμα.

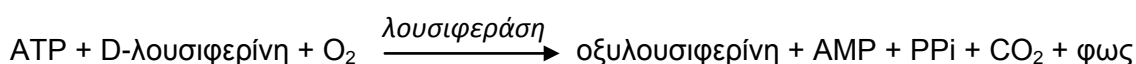
Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης για 1-1,5 ώρες, σε RT και υπό ανάδευση με το δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι ομοιολογικά συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδος (horseradish peroxidase, HRP). Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά σταθερές περιοχές επιτόπων IgG του πρωτογενούς αντισώματος και είναι ειδικό του ζώου από το οποίο έχει παραχθεί. Είναι αραιωμένο σε διάλυμα PBST1x με 2% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα και με αραιώση 1/50.000. Αφού αφαιρεθεί το δευτερογενές αντίσωμα, γίνονται εκ νέου 3 πλύσεις με PBST1X, οι δύο πρώτες διάρκειας 5λεπτών και η τελευταία 8λεπτών.

d) Εμφάνιση σήματος: Για δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με HRP, η ανίχνευση γίνεται με το σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence) που βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Η φωταύγεια είναι εκπομπή φωτός ως αποτέλεσμα της έκλυσης ενέργειας από ένα διεγερμένο υπόστρωμα. Το φως μπορεί να ανιχνευθεί καθώς «προσβάλει» φωτοευαίσθητα φιλμ αυτοραδιογραφίας ύστερα από σύντομη έκθεση. Το σήμα λαμβάνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα και παραμένει μόνιμα αποτυπωμένο στο υπό έκθεση φιλμ. Πρόκειται για χαρακτηριστικές σκουρόχρωμες ζωνώσεις που αντιστοιχούν στις ζώνες της πρωτεΐνης που αντέδρασε με το αντίσωμα.

Συγκεκριμένα με το πέρας των πλύσεων της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης από το δευτερογενές αντίσωμα, τοποθετείται σε γυάλινη επιφάνεια και επωάζεται για 3 λεπτά με μείγμα αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας ECL A και ECL B (σε αναλογία 1:1) στο σκοτάδι και σε RT. Αφού αφαιρεθούν οι περίσσειες των αντιδραστηρίων ECL τοποθετείται σε λεπτή, διάφανη μεμβράνη και σε κασέτα έκθεσης. Πάνω σε αυτήν εφαρμόζεται ένα κομμάτι X-ray φιλμ και κλείνεται η κασέτα για χρόνους έκθεσης από 10 δευτερόλεπτα έως 30 λεπτά. Ο χρόνος έκθεσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες με κυρίαρχο την ευαισθησία του πρωτογενούς αντισώματος. Στη συνέχεια, το φιλμ τοποθετείται σε διάλυμα εμφανιστή (Developer) για 1 λεπτό. Ξεπλένεται σε λεκανάκι με νερό και μονιμοποιείται σε διάλυμα fixer για 1 λεπτό. Τέλος ξεπλένεται πάλι στο λεκανάκι με το νερό και αφήνεται να στεγνώσει.

#### 2.4.2.6 Μέτρηση ενδοκυττάρου ATP με αντιδραστήριο Λουσιφερίνης-Λουσιφεράσης

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ανίχνευση του φωτός που παράγεται από την οξειδωση της λουσιφερίνης, στην παρακάτω αντίδραση χημειοφωταύγειας:



Δεδομένου ότι το αντιδραστήριο δεν περιέχει ATP, το ένζυμο χρησιμοποιεί το κυτταρικό ATP για να καταλύσει την αντίδραση, με αποτέλεσμα η ένταση του φωτός να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του. Το ολικό ενδοκυτταρικό ATP μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο luciferin - luciferase reaction kit (Enliten, Promega). Η παραγόμενη βιοφωταύγεια (φως) προσδιορίζεται μετά από μέτρηση των δειγμάτων σε λουμιόμετρο (Berthold Technologies, Lumat LB 9508) και



εκφράζεται σε μονάδες RLU. Η παρακάτω πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται στον πάγο, προς αποφυγή υδρόλυσης του ATP και έχει ως εξής:

- Λύση του κυτταρικού εκχυλίσματος με προσθήκη 50-70μl lysis buffer ανά δείγμα και επώαση για 15 λεπτά στον πάγο. Το lysis buffer που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία διαφέρει από το lysis buffer που περιγράφεται στο κεφάλαιο με τα υλικά και προέκυψε μετά από δοκιμές για βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου μέτρησης του ATP. Το συγκεκριμένο έχει ως βάση το ddH<sub>2</sub>O και γίνεται σε αυτό προσθήκη 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF και κατάλληλη ποσότητα κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών από την εταιρεία Roche.
- Μεταφορά 10μl από κάθε δείγμα σε νέα erpendorf προς προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης μέσω της μεθόδου Bradford ή οποία θα ληφθεί υπ' όψιν για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.
- Προσθήκη TCA 2% 4°C σε όγκο 1:1, ώστε η τελική συγκέντρωση του TCA σε κάθε δείγμα να είναι 1% και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στους 4°C και σε 12.000rpm.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf και προσθήκη 1M Tris pH=8 σε αναλογία 1:1, προς εξουδετέρωση του όξινου διαλύματος.
- Προετοιμασία τόσων δοκιμαστικών σωλήνων όσος ο αριθμός των δειγμάτων και επιπλέον ένας που θα χρησιμεύσει ως μάρτυρας (control).
- Προσθήκη 46μl ddH<sub>2</sub>O, 4μl δείγματος και 50μl αντιδραστήριου Enliten ώστε V<sub>τελ</sub> = 100μl.

Το control, περιέχει lysis buffer, TCA 1% και ίσο όγκο Tris pH=8 1M, κατά αναλογία με το διάλυμα διαλυτοποίησης των δειγμάτων ώστε η τιμή που θα προκύψει από τη μέτρησή του να αφαιρεθεί από τα υπόλοιπα δείγματα κατά την κανονικοποίησή τους. Το δείγμα και το αντιδραστήριο προστίθενται άμεσα, λίγο πριν την τοποθέτηση του δοκιμαστικού σωλήνα στην θύρα του λουμινόμετρου. Η προσθήκη αυτών και ο χρόνος που θα μεσολαβεί μέχρι την τοποθέτηση του σωλήνα στο λουμινόμετρο πρέπει να είναι ο ίδιος για όλα τα δείγματα προς περιορισμού του σφάλματος. Η μέτρηση των δειγμάτων στο λουμινόμετρο γίνεται με το πρόγραμμα ICE (Promega).

#### **2.4.2.7 Μιτοχονδριακή Κλασμάτωση**

Προς συλλογή ικανοποιητικής ποσότητας μιτοχονδριακού κλάσματος, οι καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε τρυβλία των 150×20 mm. Η όλη διαδικασία εκτυλίσσεται στον πάγο ως εξής:

- Μετά την αφαίρεση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας από τα τρυβλία, γίνονται μια με δύο εκπλύσεις με PBS×1(4°C) και έπειτα προστίθεται το διάλυμα ομογενοποίησης (Buffer A) εμπλουτισμένο με 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF και κατάλληλη ποσότητα κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών από την εταιρεία Roche.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με το διάλυμα αυτό με τη βοήθεια του κατάλληλου εργαλείου scraper και μεταφέρονται σε ειδικό φιαλίδιο του Potter Elvehjem ομογενοποιητή, το οποίο βρίσκεται στον πάγο.
- Ακολουθεί ομογενοποίηση στα 2000 rpm, όπου εφαρμόζονται 2 σετ των 10 φορών με μεσοδιάστημα 1λεπτού.

- Συλλογή του κυτταρικού εναιωρήματος και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 2500 rpm, στους 4°C, προς απομάκρυνση πυρήνων, κυτταρικών μεμβρανών και άσπαστων κυττάρων.
- Φυγοκέντρηση του υπερκείμενου για 20 λεπτά, 12000 rpm και στους 4°C. Στο ίζημα βρίσκονται μιτοχόνδρια, λυσοσώματα κι ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ στο υπερκείμενο έχουν απομείνει χαμηλότερου μοριακού βάρους οργανίδια.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα στο οποίο βρίσκονται τα μιτοχόνδρια σε Buffer B. Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές και τέλος το ίζημα που απομένει αποτελεί το μιτοχονδριακό κλάσμα (MITO) που φυλάσσεται στους -80 °C

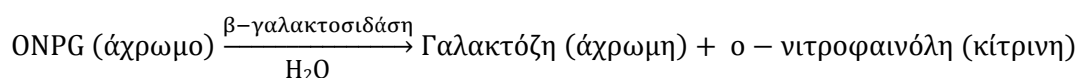
Το υπερκείμενο της δεύτερης φυγοκέντρησης (12000 rpm) αποτελεί το μετα-μιτοχονδριακό κλάσμα (post-mitochondrial, PM) και περιλαμβάνει κυτταροπλασματικά συστατικά, μικροσωμάτια και θραύσματα της πλασματικής μεμβράνης. Ό,τι απομένει στο φιαλίδιο της ομογενοποίησης, αποτελεί το ολικό κυτταρικό εκχύλισμα (total extract, TE) που περιέχει κυτταρικά οργανίδια, κυτταρόπλασμα, μεμβράνες και άσπαστα κύτταρα.

#### 2.4.2.8 Ενζυμικός προσδιορισμός δραστηριότητας λουσιφεράσης / β-γαλακτοσιδάσης

Πριν τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση (Chen, 2011; Psarra et al, 2009) των κυττάρων με τα εξής πλασμίδια: β-γαλακτοσιδάση, NF-κB-λουσιφεράση και πλασμίδιο υπερέκφρασης για τον ERβ.

##### ❖ Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης:

Με τη διεξαγωγή αυτής της διαδικασίας γίνεται έλεγχος αποτελεσματικότητας της παροδικής διαμόλυνσης και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας λουσιφεράσης. Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης προσδιορίζεται με μελέτη της υδρόλυσης του χρωμογόνου υποστρώματος 2-Nitrophenyl b-D-galactopyranoside (ONPG), όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση.

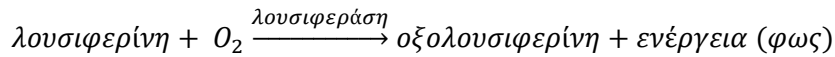


Το διάλυμα της αντίδρασης αποτελείται από διάλυμα ιόντων  $\text{Mg}^{2+}$  (31.5 % v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 10 % v/v  $\text{MgCl}_2$  και 58.5 % v/v ddH<sub>2</sub>O) και το υπόστρωμα της αντίδρασης, ONPG. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C μέχρι την ανάπτυξη επαρκούς έντασης κίτρινου χρώματος και η αντίδραση σταμάτησε με προσθήκη διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M. Μετά το τέλος της αντίδρασης, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 420 nm.

##### ❖ Δοκιμασία λουσιφεράσης

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τη λουσιφεράση υπόκειται στον μεταγραφικό έλεγχο του NF-κB. Χρησιμοποιείται, έτσι, ως γονίδιο αναφοράς, δίνοντας πληροφορίες που αφορούν στη μεταγραφική ενεργότητα των κυττάρων που έχουν υποστεί διαμόλυνση (transfection).

Η μέθοδος αυτή, στηρίζεται στην ανίχνευση του φωτός που παράγεται από την οξειδωση της χρωστικής λουσιφερίνη, σύμφωνα με την αντίδραση χημειοφωταύγειας:



Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο λουσιφεράση παρουσία συμπαραγόντων όπως το ATP ή τα  $\text{Ca}^{2+}$ . Το διάλυμα υποστρώματος λουσιφεράσης είναι φωτοευαίσθητο και συνίσταται από: 470  $\mu\text{M}$  λουσιφερίνη, 530  $\mu\text{M}$  ATP, 270  $\mu\text{M}$  συνενζύμου A, 20 mM Tris pH 8.0, 2.67 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τη συμπλήρωση του απαιτούμενου όγκου. Η ενεργότητά της προσδιορίζεται με μέτρηση του παραγόμενου φωτός σε λουμινόμετρο (Berthold Technologies, LuBat 39508) και εκφράζεται σε μονάδες RLU. Οι τιμές της δρασικότητας της λουσιφεράσης προς τις τιμές της δρασικότητας της γαλακτοσιδάσης αποτελούν τη κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

## 2.5 Υπολογιστική επεξεργασία

Για τα περισσότερα από τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν παρακάτω, κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, απαιτήθηκε υπολογιστική επεξεργασία. Ο υπολογισμός της ποσότητας πρωτεϊνών, με τη χρήση της μεθόδου Bradford, ο υπολογισμός της μετέπειτα σύστασης των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση καθώς και οι κανονικοποιήσεις όλων των πειραματικών διαδικασιών πραγματοποιήθηκαν στο Microsoft Office Excel. Για τη την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων του ανοσοαποτύπωματος πρωτεϊνών (Western Blotting) χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ και για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western το Adobe Photoshop CS. Τέλος για την μέτρηση ενδοκυττάριου ATP στο λουμινόμετρο χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ICE.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η επίδραση του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ERs καθώς και σε άλλα σηματοδοτικά μόρια των οιστρογόνων εξετάστηκε μέσω ηλεκτροφόρησης και στη συνέχεια ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western blot analysis) των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα MCF-7 και SH-SY5Y που επωάστηκαν με  $10^{-9}$  M E2,  $10^{-4}$  M ACH και  $10^{-7}$  ICI ή και με συνδυασμό αυτών για 3 ημέρες. Η β-ακτίνη και η α-τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκαν για την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό εξέταση μορίων.

Λαμβάνοντας υπόψη τον παρατηρούμενο περιπυρηνικό εντοπισμό των μιτοχονδρίων σε πολλά είδη κυττάρων και την παρατηρούμενη, από προηγούμενες μελέτες (ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του Βύρωνα Γοργογιέτα), αύξηση του περιπυρηνικού εντοπισμού των υποδοχέων οιστρογόνων παρουσία ACH, επιχειρήσαμε να αξιολογήσουμε την επίδραση του ACH σε απομονωμένα υποκυτταρικά κλάσματα ως προς τον μιτοχονδριακό εντοπισμό των ERs καθώς και ορισμένων ρυθμιστικών μορίων που απαντώνται στη δράση των οιστρογόνων. Η αξιολόγηση αυτή πραγματοποιήθηκε με μιτοχονδριακή κλασμάτωση με την μέθοδο της διαφορικής φυγοκέντρησης και με ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών των μιτοχονδριακών και ολικών ή κυτταροπλασματικών κλασμάτων από κύτταρα MCF-7 και SH-SY5Y που επωάστηκαν με  $10^{-9}$  M E2 και  $10^{-4}$  M ACH για 3 ημέρες. Ως μόρια κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκαν η α-τουμπουλίνη και η ηλεκτρική αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος (succinate dehydrogenase, SDH). Η α-τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της μιτοχονδριακής καθαρότητας και για την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των ολικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SDH, ενός ενζύμου του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων και επίσης πρωτεϊνικό συστατικό της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, αναλύθηκαν για την κανονικοποίηση των επιπέδων των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών.

Επίσης αξιολογήθηκε η επίδραση του ACH στην παραγωγή ATP με μέτρηση ενδοκυττάρου ATP στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα και των δύο κυτταρικών σειρών αλλά και της κυτταρικής σειράς νευροβλαστώματος ποντικού N<sub>2</sub>A, αφού πρώτα επωάστηκαν για 12 ώρες με  $10^{-9}$  M E2,  $10^{-4}$  M ACH και συνδυασμό αυτών.

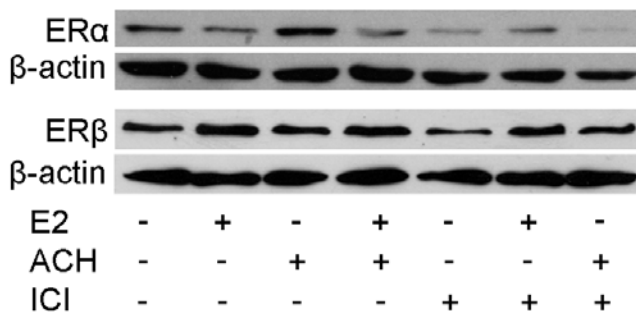
Τέλος πραγματοποιήθηκε δοκιμασία λουσιφεράσης για τον έλεγχο της επίδρασης του ACH στην δραστικότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB σε κύτταρα N<sub>2</sub>A, αφού πρώτα επωάστηκαν με  $10^{-9}$  M E2,  $10^{-4}$  M ACH και συνδυασμό αυτών για 20 ώρες.

### 3.1 Πιθανή εμπλοκή του ACH στην οιστρογονική σηματοδότηση στην κυτταρική σειρά MCF-7

#### 3.1.1 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα, ERβ

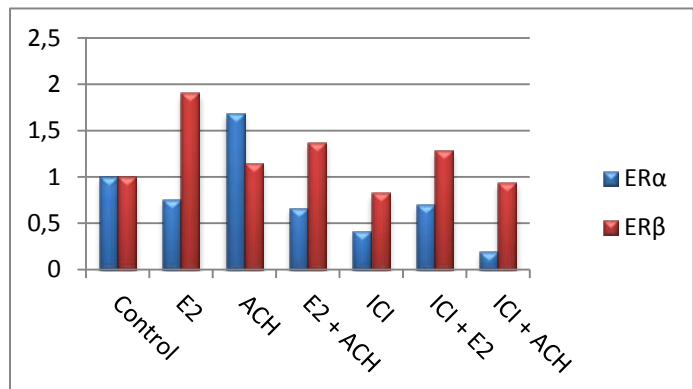
Στις παρακάτω εικόνες 16 και 17 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων τα οποία έχουν επωαστεί για 3 ημέρες με  $10^{-9}$  M E2,  $10^{-4}$  M ACH,  $10^{-7}$  M ICI, και συνδυασμούς αυτών.

Στην εικόνα 16 παρατηρούμε παρουσία ACH αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα, ενώ η E2 προκαλεί μέτρια μείωσή τους. Παρουσία ICI, μόνο του ή σε συνδυασμό με E2 ή με ACH, μειώθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ παρουσία ACH σε αντίθεση με την E2 που σχεδόν διπλασιάστηκαν. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αναστολή της E2-επαγόμενης αύξησης των επιπέδων του ERβ παρουσία ACH.



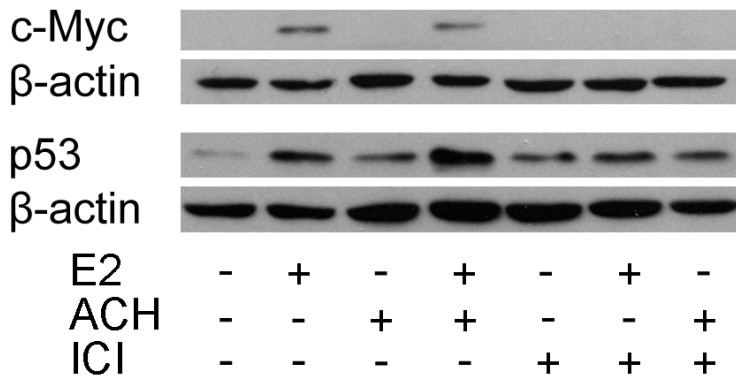
Εικόνα 16: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα και ERβ σε κύτταρα MCF-7

Διάγραμμα 1: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων ERα και ERβ ως προς την πυκνότητα της πρωτεϊνικής ζώνης της β-ακτίνης, με χρήση κατάλληλου προγράμματος Image J

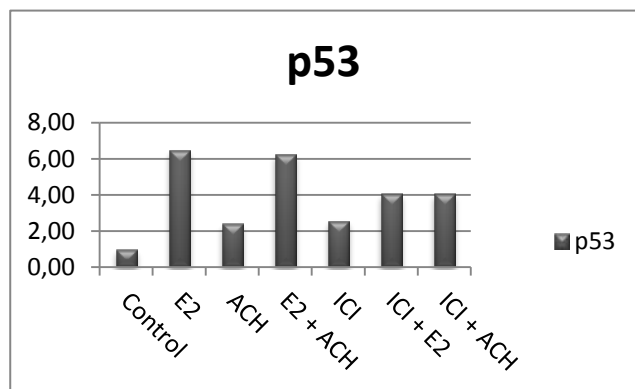
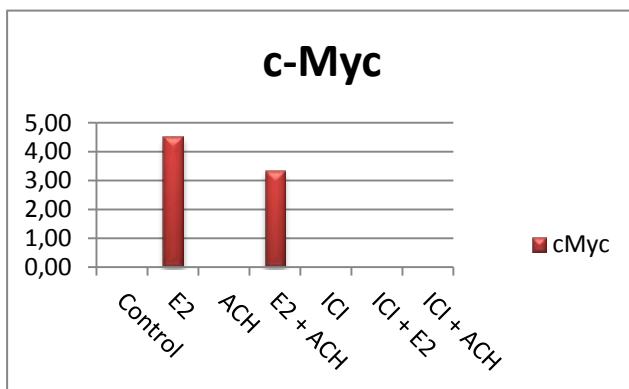


#### 3.1.2 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων c-Myc και p53

Σε αντιστοιχία με την ενότητα 3.1.1 διεξήχθη μελέτη επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των c-Myc και p53, γονιδίων στόχων των οιστρογόνων, σε κύτταρα MCF-7. Στην εικόνα 17 παρατηρούμε ότι η E2 προκάλεσε αύξηση των πρωτεϊνών p53 και c-Myc σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες, ενώ παρουσία ICI, η επαγόμενη από E2 αύξηση των p53 και ειδικότερα του c-Myc εξαλείφθηκε, επαληθεύοντας την εμπλοκή του υποδοχέα οιστρογόνου σε αυτή τη διαδικασία. Το ACH προκάλεσε μέτρια αύξηση της πρωτεϊνικής σύνθεσης του p53, ενώ δεν είχε επίδραση στη σύνθεση της πρωτεΐνης c-Myc, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες.



Εικόνα 17: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του c-Myc και p53 σε κύτταρα MCF-7

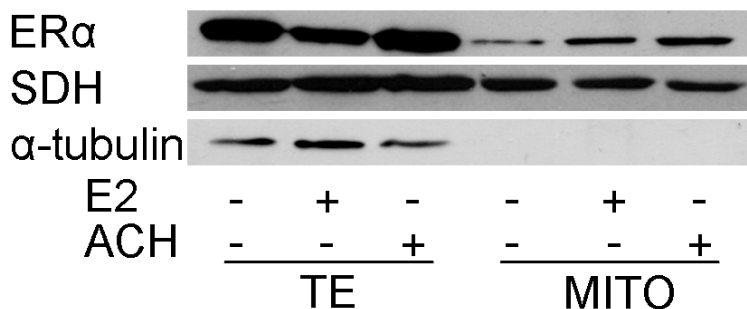


Διάγραμμα 2: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων c-Myc και p53 ως προς την πυκνότητα της πρωτεϊνικής ζώνης της β-ακτίνης, με χρήση κατάλληλου προγράμματος Image J

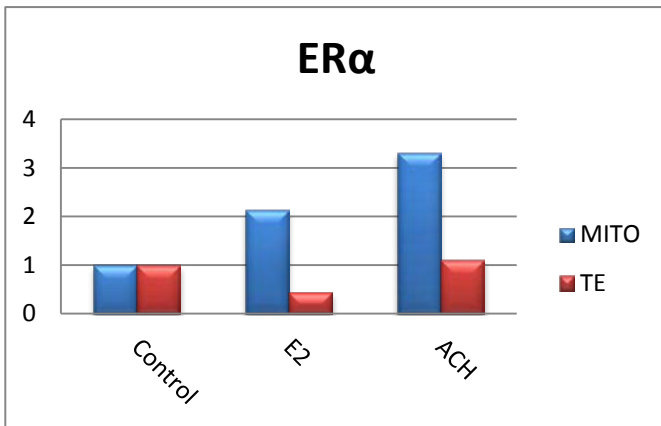
### 3.1.3 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα σε μιτοχondριακά κλάσματα

Στις παρακάτω εικόνες 18 και 19 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western μιτοχondριακών και ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων, ύστερα από πραγματοποίηση μιτοχondριακής κλασμάτωσης. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 3 ημέρες με  $10^{-9}$  M E2,  $10^{-4}$  M ACH,  $10^{-7}$  M ICI, καθώς και συνδυασμούς αυτών. Η εμφάνιση της α-τουμπουλίνης αποκλειστικά στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα και όχι στα μιτοχondριακά κλάσματα επιβεβαιώνει την καθαρότητά τους.

Όπως παρατηρούμε στην εικόνα 18 το ACH και σε λιγότερο βαθμό η E2 φαίνεται να επάγουν αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα στο μιτοχόνδριο ενισχύοντας την άποψη περί μιτοχondριακού εντοπισμού του ERα. Στο ολικό κυτταρικό εκχύλισμα η E2 φαίνεται να μειώνει παραπάνω απ' το μισό τα επίπεδα του ERα σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες, ενώ το ACH φαίνεται να τα αφήνει ανεπηρέαστα.



Εικόνα 18: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ολικά και μιτοχondριακά εκχυλίσματα από κύτταρα MCF-7

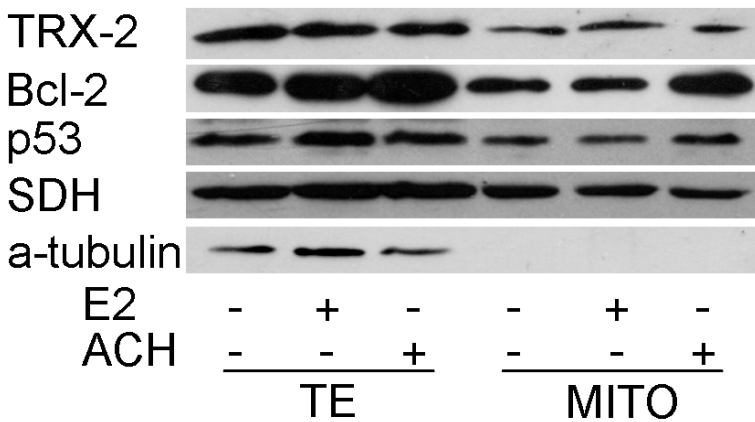


Διάγραμμα 3: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών του μορίου ERα ως προς την πυκνότητα της πρωτεϊνικής ζώνης της α-τουμπουλίνης στα ολικά κυτταρικά κλάσματα και της SDH στα μιτοχονδριακά κλάσματα, με χρήση κατάλληλου προγράμματος Image J

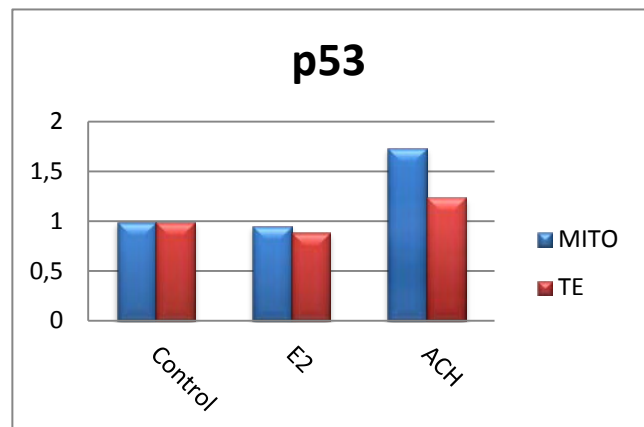
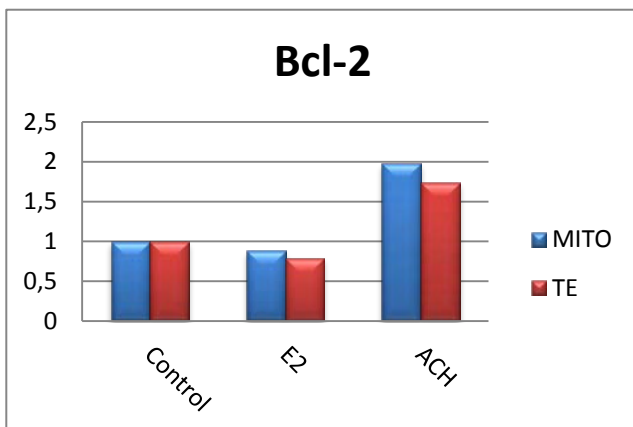
### 3.1.4 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Bcl2, TRX-2 και p53 σε μιτοχονδριακά κλάσματα

Σε αντιστοιχία με την ενότητα 3.1.3 διεξήχθη μελέτη επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των Bcl2 και p53, γονιδίων στόχων των οιστρογόνων, σε μιτοχονδριακά και ολικά εκχυλίσματα κυττάρων MCF-7.

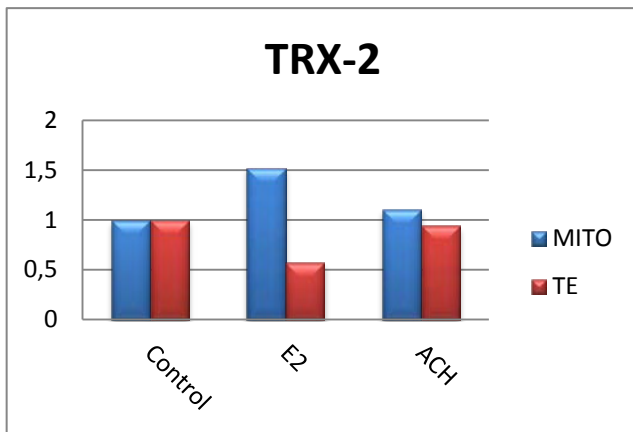
Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 19 τα πρωτεϊνικά επίπεδα των Bcl2 και p53 φαίνεται να αυξήθηκαν παρουσία ACH στα μιτοχονδριακά καθώς και στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, ενώ η θυρεοδοξίνη (TRX-2) φαίνεται σχεδόν ανεπηρέαστη. Η E2 προκαλεί ελάχιστη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των Bcl2 και p53, αλλά φαίνεται να αυξάνει τα μιτοχονδριακά πρωτεϊνικά επίπεδα της TRX-2.



Εικόνα 19: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των Bcl2, TRX-2 και p53, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ολικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα από κύτταρα MCF-7





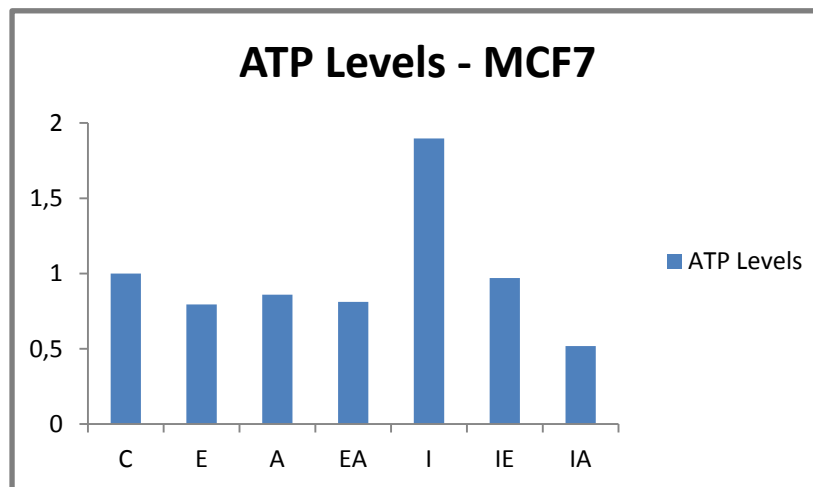


Διάγραμμα 4: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων TRX-2, Bcl-2 και p53 ως προς την πυκνότητα της πρωτεϊνικής ζώνης της α-τουμπουλίνης στα ολικά κυτταρικά κλάσματα και της SDH στα μιτοχονδριακά κλάσματα, με χρήση κατάλληλου προγράμματος Image J

### 3.1.5 Επίδραση του ACH στα ολικά κυτταρικά επίπεδα ATP της κυτταρικής σειράς MCF-7

Τέλος διεξήχθη αξιολόγηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ATP σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα MCF-7, ύστερα από επώαση για 12 ώρες με  $10^{-9}$  M E2,  $10^{-4}$  M ACH,  $10^{-7}$  M ICI, καθώς και συνδυασμούς αυτών.

Στο διάγραμμα 5 παρατηρούμε μια μικρή μείωση των επιπέδων του ATP παρουσία E2 και ACH, σε σύγκριση με το δείγμα μάρτυρα. Επιπλέον ύστερα από χορήγηση ACH σε συνδυασμό με ICI παρατηρείται υψηλή μείωση του ATP σε σύγκριση τόσο με το δείγμα που χορηγήθηκε μόνος του ο E2 ανταγωνιστής ICI, όσο και με το δείγμα μάρτυρα.



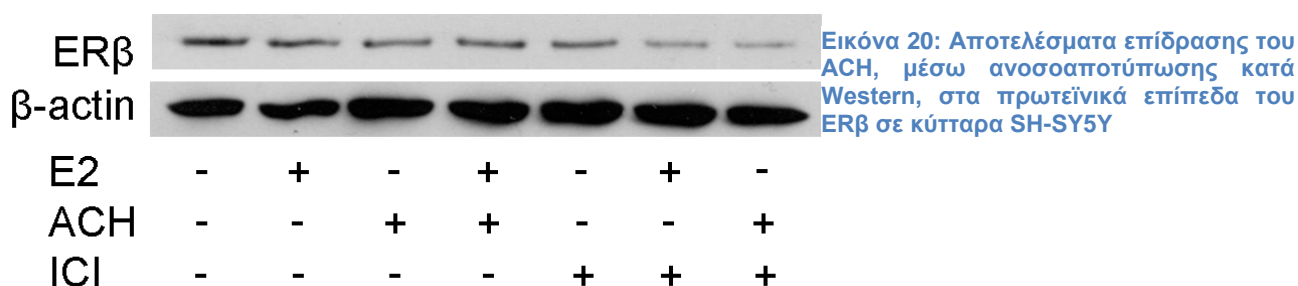
Διάγραμμα 5: Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης του ACH στα ολικά κυτταρικά επίπεδα του ATP σε κύτταρα MCF-7. C: control, E: E2, A: ACH, EA: E2 + ACH, I: ICI, IE: ICI + E2, IA: ICI + ACH

## 3.2 Πιθανή εμπλοκή του ACH στην οιστρογονική σηματοδότηση στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y

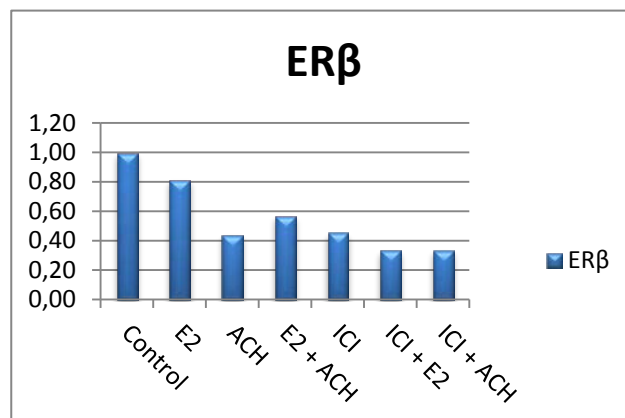
### 3.2.1 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ

Στις παρακάτω εικόνες 20 και 21 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων τα οποία έχουν επωαστεί για 3 ημέρες με  $10^{-9}$  M E2,  $10^{-4}$  M ACH,  $10^{-7}$  M ICI, και συνδυασμούς αυτών.

Στην εικόνα 20 παρατηρούμε ότι το ACH προκαλεί μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Ακόμη, παρατηρήθηκε αναστολή της E2-επαγόμενης αύξησης των επιπέδων του ERβ παρουσία ACH.



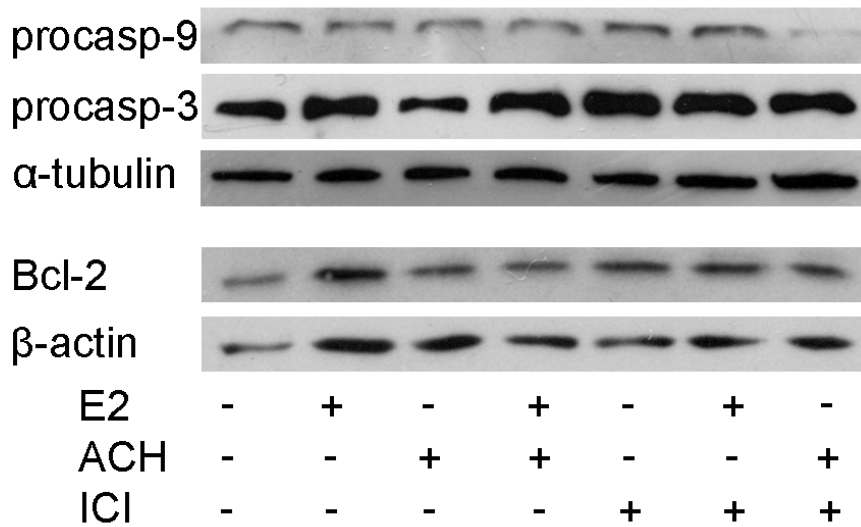
Διάγραμμα 6: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών του ERβ ως προς την πυκνότητα της πρωτεϊνικής ζώνης της β-ακτίνης, με χρήση κατάλληλου προγράμματος Image J



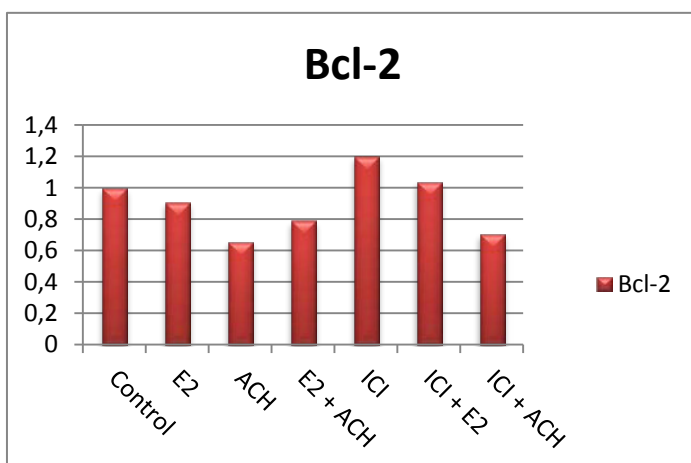
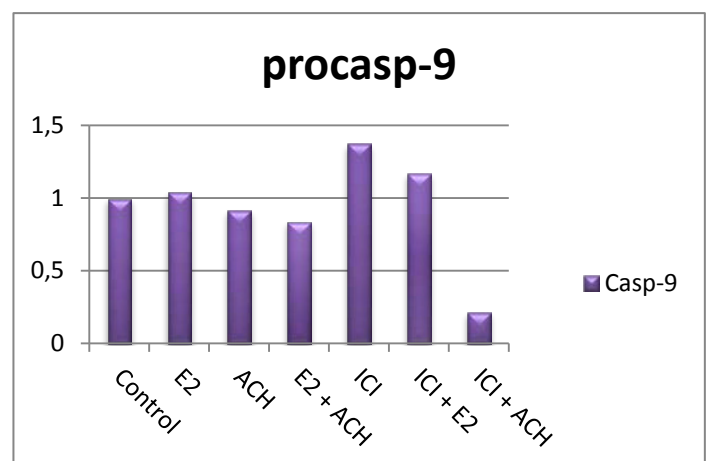
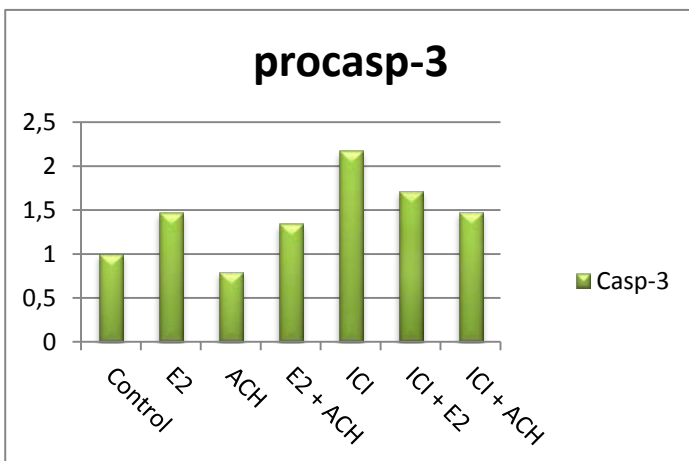
### 3.2.2 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων procasp-9, procasp-3 και Bcl-2

Σε αντιστοιχία με την ενότητα 3.2.1 διεξήχθη μελέτη επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των προκασπασών 9 και 3 και Bcl-2, γονιδίων στόχων των οιστρογόνων, σε κύτταρα SH-SY5Y.

Όπως απεικονίζεται στην εικόνα 21 το ACH, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες, φαίνεται να προκαλεί μείωση του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2 καθώς και της προκασπάσης-3. Η E2 εμφανίζει μια αύξηση της τάξης του 50% στην προκασπάση-3 ενώ δεν επηρεάζει τα επίπεδα της προκασπάσης-9. Τα επίπεδα της προκασπάσης-9 φαίνεται να παρουσιάζουν μια πολύ μικρή μείωση με προσθήκη του ACH. Πρακτικά όμως παραμένουν αμετάβλητα.



Εικόνα 21: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, στα πρωτεϊνικά επίπεδα του Bcl-2 και των προκασπασών 9 και 3 σε κύτταρα SH-SY5Y

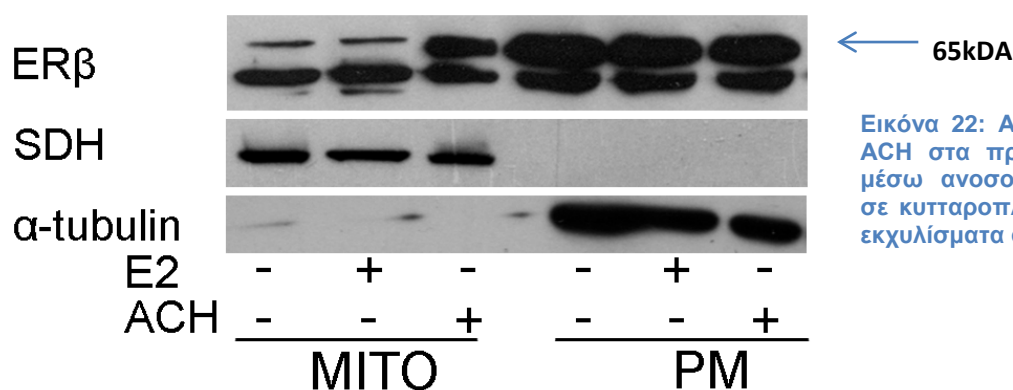


Διάγραμμα 7: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων procasp-9 και proprocasp-3 ως προς την πυκνότητα της πρωτεϊνικής ζώνης της α-τουμπουλίνης και του Bcl-2 ως προς της β-ακτίνης, με χρήση κατάλληλου προγράμματος Image J

### 3.2.3 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ σε μιτοχονδριακά κλάσματα

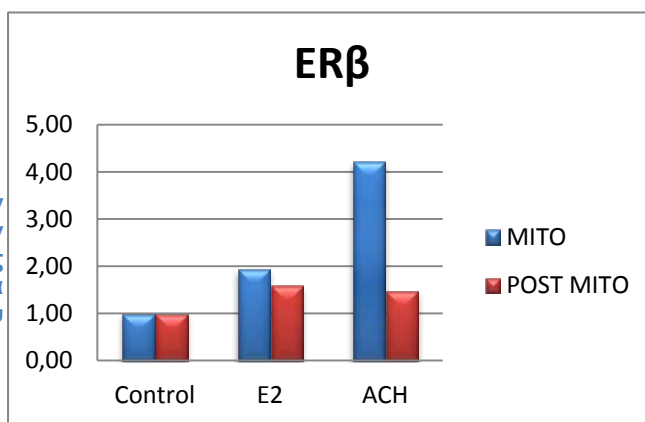
Στις παρακάτω εικόνες 22, 23, 24 και 25 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων κυτάρων, ύστερα από πραγματοποίηση μιτοχονδριακής κλασμάτωσης. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 3 ημέρες με  $10^{-9}$  M E2,  $10^{-4}$  M ACH,  $10^{-7}$  M ICI, καθώς και συνδυασμούς αυτών. Η εμφάνιση της α-τουμπουλίνης μόνο στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα επιβεβαιώνει την καθαρότητά τους.

Στην παρακάτω εικόνα 22 παρατηρούμε ότι η E2 φάνηκε να επάγει ελάχιστη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ στο μιτοχόνδριο, σε αντίθεση με το ACH που οδηγεί στη μιτοχονδριακή του μετατόπιση.



Εικόνα 22: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε κυτταροπλασματικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα από κύτταρα SH-SY5Y

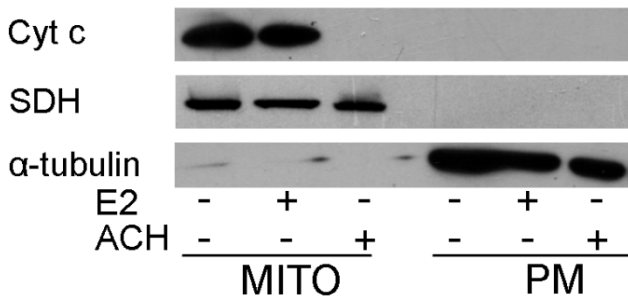
Διάγραμμα 8: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών του μορίου ERβ ως προς την πυκνότητα της πρωτεϊνικής ζώνης της α-τουμπουλίνης στα κυτταροπλασματικά κλάσματα και της SDH στα μιτοχονδριακά κλάσματα, με χρήση κατάλληλου προγράμματος Image J



### 3.2.4 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων μορίων της οικογένειας BCL-2, καθώς και των μορίων PEPCK, TRX-2 και Cyt c σε μιτοχονδριακά κλάσματα

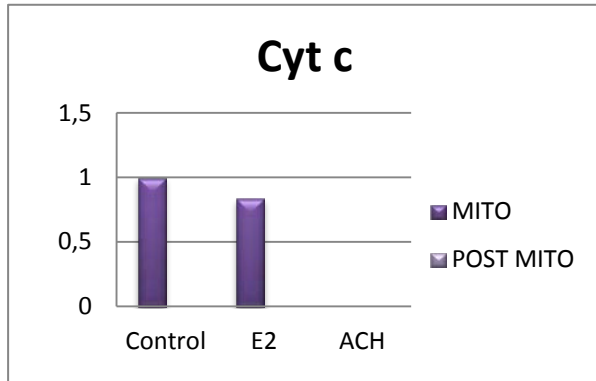
Σε αντιστοιχία με την ενότητα 3.2.3 διεξήχθη μελέτη επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων της οικογένειας BCL-2, καθώς και των μορίων PEPCK, TRX-2 και Cyt c, γονιδίων στόχων των οιστρογόνων, σε μιτοχονδριακά και κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα κυτάρων SH-SY5Y.

Στην εικόνα 23 παρατηρούμε την εξάλειψη του Cyt c στα μιτοχονδριακά κλάσματα παρουσία ACH, γεγονός που υποδηλώνει επαγωγή απόπτωσης από άλατα αργιλίου και επιβεβαιώνει δεδομένα από προηγούμενες μελέτες.

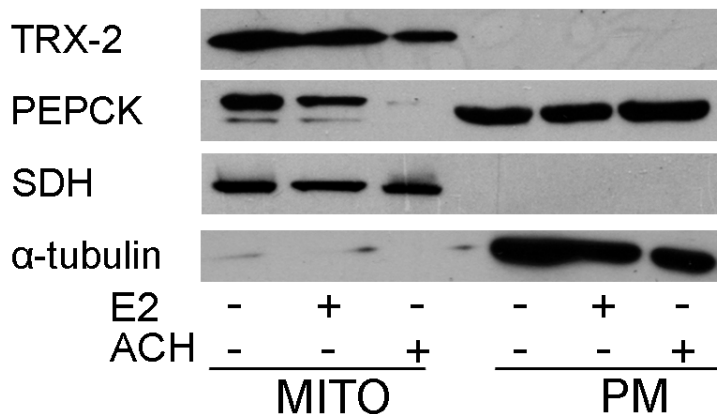


Εικόνα 23: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του Cyt c, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε κυτταροπλασματικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα από κύτταρα SH-SY5Y

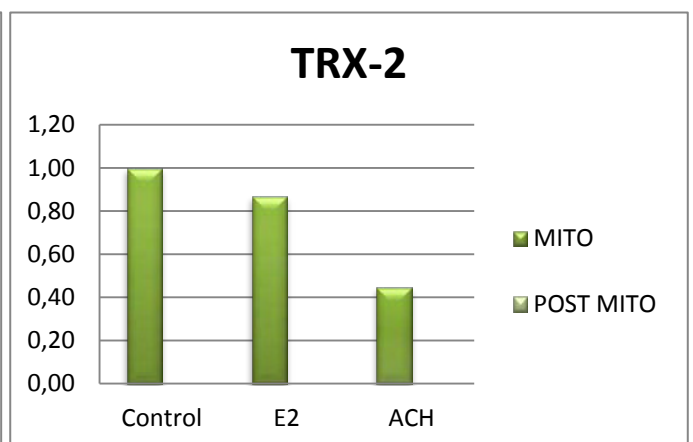
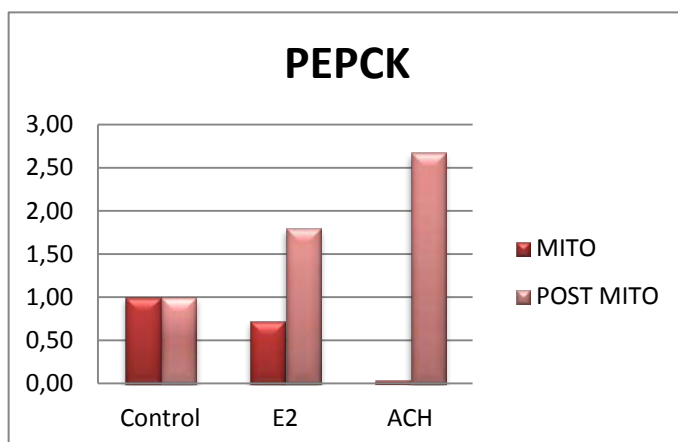
Διάγραμμα 9: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων PEPCK και TRX-2 ως προς την πυκνότητα της πρωτεϊνικής ζώνης της α-τουμπουλίνης στα κυτταροπλασματικά κλάσματα και της SDH στα μιτοχονδριακά κλάσματα, με χρήση κατάλληλου προγράμματος Image J



Αξιολόγηση της επίδρασης του ACH σε μιτοχονδριακό εντοπισμό του αντοξειδωτικού μορίου TRX-2 και της PEPCK εμφάνισε σημαντική μείωση της TRX-2 και εξάλειψη της PEPCK σε μιτοχονδριακά εκχυλίσματα (Εικόνα 24). Η E2 αλλά κυρίως το ACH έδειξαν αύξηση της PEPCK σε κυτταροπλασματικά εκχυλίσματα

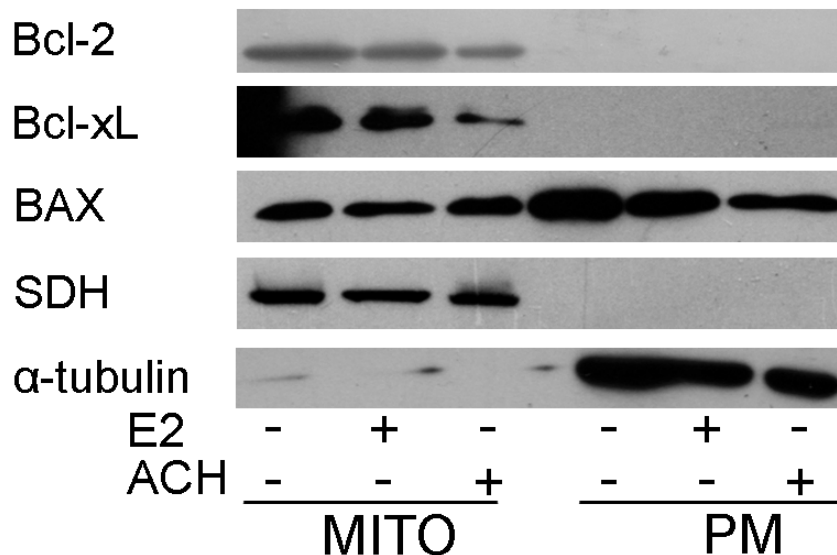


Εικόνα 24: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων TRX-2 και PEPCK, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε κυτταροπλασματικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα από κύτταρα SH-SY5Y

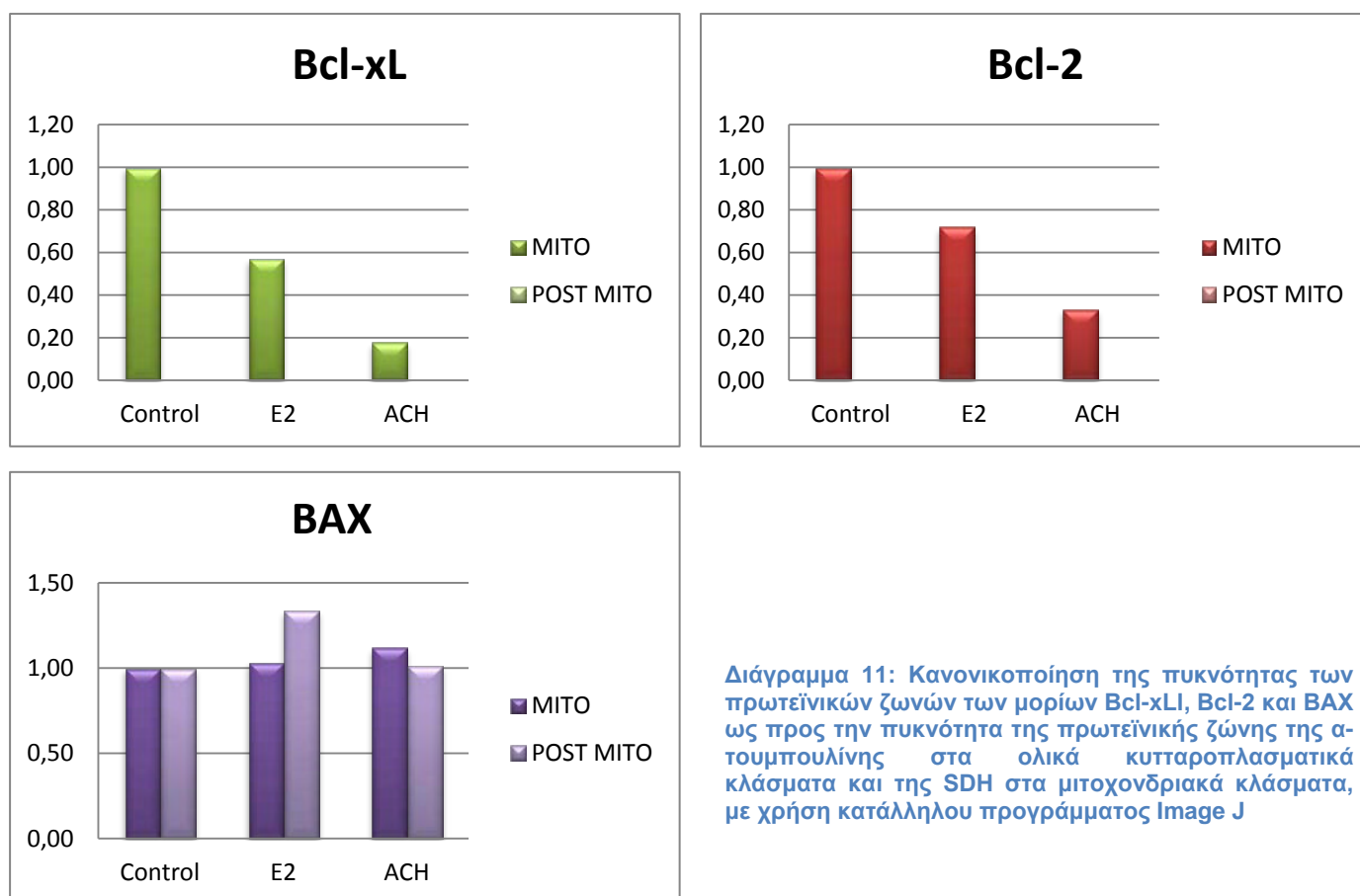


Διάγραμμα 10: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων PEPCK και TRX-2 ως προς την πυκνότητα της πρωτεϊνικής ζώνης της α-τουμπουλίνης στα κυτταροπλασματικά κλάσματα και της SDH στα μιτοχονδριακά κλάσματα, με χρήση κατάλληλου προγράμματος Image J

Διερεύνηση μορίων της οικογένειας BCL-2, που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης, είχε ως αποτέλεσμα την υψηλότερη του 60% μείωση των αντιαποπτωτικών μορίων Bcl-2 και Bcl-xL στα μιτοχόνδρια παρουσία του ACH, όπως φαίνεται στην εικόνα 25. Το προαποπτωτικό μόριο BAX δεν εμφάνισε αισθητές αυξομειώσεις εκτός της αμελητέας αύξησης του στα μιτοχονδρικά εκχυλίσματα κατά την παρουσία ACH.



Εικόνα 25: Αποτελέσματα επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων Bcl-2, BAX και Bcl-xL μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε κυτταροπλασματικά και μιτοχονδριακά εκχυλίσματα από κύτταρα SH-SY5Y

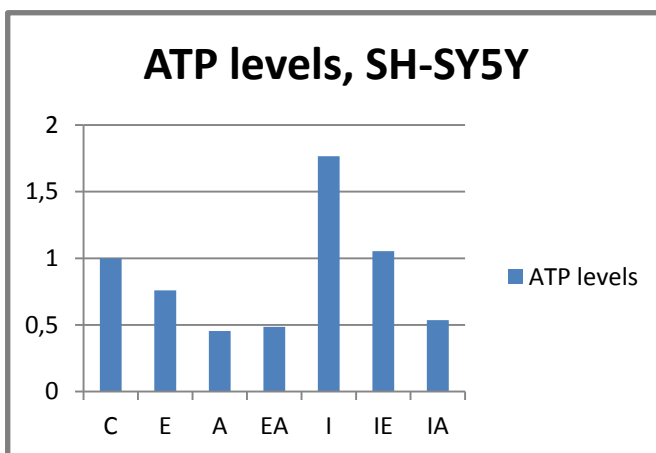
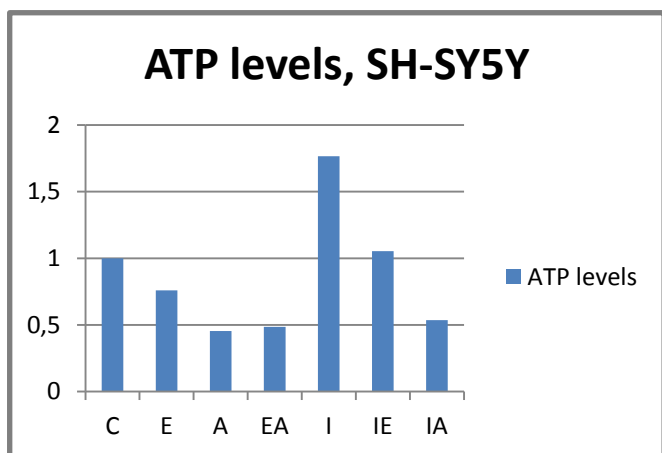


Διάγραμμα 11: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων Bcl-xL, Bcl-2 και BAX ως προς την πυκνότητα της πρωτεϊνικής ζώνης της α-τουμπουλίνης στα ολικά κυτταροπλασματικά κλάσματα και της SDH στα μιτοχονδριακά κλάσματα, με χρήση κατάλληλου προγράμματος Image J

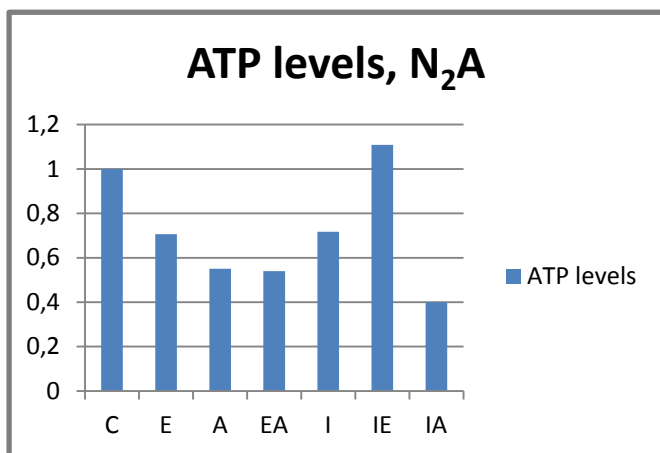
### 3.2.5 Επίδραση του ACH στα ολικά κυτταρικά επίπεδα ATP των κυτταρικών σειρών SH-SY5Y και N<sub>2</sub>A

Στη συνέχεια διεξήχθη αξιολόγηση των επιπέδων του ενδοκυττάρου ATP σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα SH-SY5Y και N<sub>2</sub>A, ύστερα από επώαση για 12 ώρες με 10<sup>-9</sup> M E2, 10<sup>-4</sup> M ACH, 10<sup>-7</sup> M ICI, καθώς και συνδυασμούς αυτών. Στα κύτταρα SH-SY5Y πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις της πειραματικής διαδικασίας και έπειτα ακολούθησε η αξιολόγηση και στην δεύτερη κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος N<sub>2</sub>A.

Στα παρακάτω διαγράμματα 12 και 13 παρατηρείται μια μείωση των επιπέδων του ATP παρουσία E2 και ACH, με την επίδραση του ACH να μειώνει τα επίπεδα του ATP σχεδόν στο μισό σε σύγκριση με τα δείγματα μάρτυρες. Ύστερα από χορήγηση ICI σε συνδυασμό με ACH παρατηρείται μιας ίδιας κλίμακας μείωση σε σύγκριση με το δείγμα που χορηγήθηκε μόνος του ο E2 ανταγωνιστής ICI. Τέλος παρατηρήθηκε αναστολή της E2-επαγόμενης δράσης στα επίπεδα του ATP παρουσία ICI.



Διάγραμμα 12: Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης του ACH στα ολικά κυτταρικά επίπεδα του ATP σε κύτταρα SH-SY5Y. C: control, E: E2, A: ACH, EA: E2 + ACH, I: ICI, IE: ICI + E2, IA: ICI + ACH



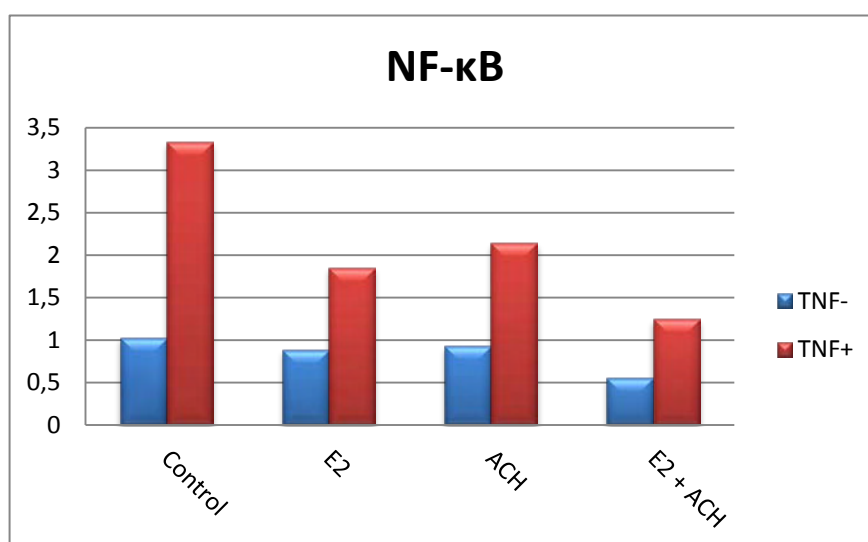
Διάγραμμα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης του ACH στα ολικά κυτταρικά επίπεδα του ATP σε κύτταρα N<sub>2</sub>A. C: control, E: E2, A: ACH, EA: E2 + ACH, I: ICI, IE: ICI + E2, IA: ICI + ACH



### 3.3 Δοκιμασία λουσιφεράσης για τον έλεγχο της επίδρασης του ACH στην δραστικότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB σε κύτταρα N<sub>2</sub>A

Η δοκιμασία λουσιφεράσης πραγματοποιήθηκε μετά την παροδική διαμόλυνση κυττάρων N<sub>2</sub>A με κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς που κωδικοποιούν την έκφραση των γονιδίων της β-γαλακτοσιδάσης, της NF-κB-λουσιφεράσης και του ERβ. Επίσης το πείραμα διεξήχθη κάτω από συνθήκες παρουσίας και απουσίας του παράγοντα φλεγμονής TNFα (tumor necrosis factor).

Τα κύτταρα επώαστηκαν για 20 ώρες με 10<sup>-9</sup> M E2, 10<sup>-4</sup> M ACH, καθώς και συνδυασμό αυτών. Ακολούθησε λύση των κυττάρων και προσδιορισμός δραστικότητας λουσιφεράσης και γαλακτοσιδάσης. Παρατηρούμε στο διάγραμμα 14 αναστολή της μεταγραφικής δραστικότητας του NF-κB παρουσία E2 σε συνθήκες φλεγμονής. Όμοια δράση παρατηρούμε και παρουσία ACH, ενώ με προσθήκη και των δύο ουσιών, E2 και ACH, παρατηρείται μια αθροιστική-συνεργατική δράση. Απουσία του παράγοντα φλεγμονής δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή στην μεταγραφική δραστικότητα του NF-κB σε καμία συνθήκη.



Διάγραμμα 14: Αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στην μεταγραφική ενεργότητα του NFκB μέσω δοκιμασίας λουσιφεράσης. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με τα αντίστοιχα της γαλακτοσιδάσης.

## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα οιστρογόνα είναι στεροειδείς ορμόνες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη φυσιολογία του ανθρώπινου αναπαραγωγικού συστήματος. Επίσης διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε πολλά συστήματα, όπως νευρικό, σκελετικό, ανοσοποιητικό και καρδιαγγειακό, όπου δρουν μέσω γενωμικών και μη μηχανισμών (Bjornstrom & Sjoberg, 2005; N. Heldring et al, 2007). Η σηματοδότηση των οιστρογόνων αποτελείται από μια ισορροπία μεταξύ αντίθετων δράσεων των δύο κύριων υποδοχέων τους (ERα και ERβ) και των διάφορων ισομορφών τους στους ιστούς στόχους (Planey et al, 2014). Πολλαπλές μελέτες έδειξαν διαφορετικές επιδράσεις των οιστρογόνων στα κύτταρα του μαστού, διεγείροντας ταυτόχρονα αναστολή και επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω του ERβ και ERα αντίστοιχα. Αντιαποπτωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις μέσω των ERs έχουν επίσης παρατηρηθεί στο νευρικό σύστημα (Arenal et al, 2015).

Τα μιτοχόνδρια είναι ζωτικής σημασίας οργανίδια, παίζοντας ένα κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες, μέσω της παραγωγής ROS. Διαταραχές των μιτοχονδριακών λειτουργιών έχουν συσχετιστεί αιτιολογικά με νευροεκφυλιστικές ασθένειες και με καρκίνο. Η E2 φαίνεται να ρυθμίζει διάφορες πτυχές της μιτοχονδριακής λειτουργίας, ενισχύοντας τη μιτοχονδριακή βιογένεση και διατηρώντας την ικανότητα παραγωγής ενέργειας, ωστόσο, η κατανόηση αυτών των μηχανισμών είναι ελλιπής. Οι ERs, και συγκεκριμένα ο ERβ, έχει παρατηρηθεί ότι παρουσιάζει μιτοχονδριακή εντόπιση και ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (James W. Simpkins, 2008; Psarra & Sekeris, 2008).

Το αργίλιο (Al) είναι το πιο άφθονο μέταλλο στη φύση και ο ανθρώπινος πληθυσμός εκτίθεται καθημερινά σε αυτό κυρίως μέσω της διατροφής και της εφαρμογής αντιιδρωτικών (Darbre, 2016). Ο ακριβής μηχανισμός της τοξικότητάς του δεν είναι πλήρως γνωστός, αλλά δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας υποδηλώνουν ότι το αργίλιο μπορεί να ενισχύσει οξειδωτικά και φλεγμονώδη συμβάντα, οδηγώντας τελικά σε βλάβη ιστών (Becaria et al, 2002). Επίσης έχει προταθεί ότι το Al μπορεί να δράσει ως μεταλλοοιστρογόνο. Τα άλατα Al, όπως το ACH που χρησιμοποιείται ως ενεργός αντιιδρωτικός παράγοντας στα αποσμητικά, αποτελούν μια σημαντική πηγή έκθεσης του ανθρώπου στο Al. Το Al, ως πιθανό μεταλλοοιστρογόνο, εμφανίζει οιστρογονικές ιδιότητες αλληλεπιδρώντας με τη λειτουργία των ER τόσο μέσω της πρόσδεσής του στους υποδοχείς όσο και μέσω της ρύθμισης της μεταγραφικής τους δραστηριότητας (Darbre, 2005). Πολλές μελέτες το έχουν ενοχοποιήσει για τη συμμετοχή του στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού και στην παθογένεση νευροεκφυλιστικών διαταραχών (Darbre, 2016; Darbre et al, 2013; Maya et al, 2016).

Στόχος της παρούσας διπλωματικής διατριβής είναι η διερεύνηση της επίδρασης αλάτων αργιλίου, και συγκεκριμένα του ACH, στη μιτοχονδριακή λειτουργία καρκινικών κυττάρων μαστού και νευρικών κυττάρων και ειδικότερα η αξιολόγηση της επίδρασης του ACH σε μιτοχονδριακά σχετιζόμενες δράσεις των ERs. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση αργιλίου στον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης μορίων όπως ERα, ERβ, και μορίων στόχων αυτών όπως Bcl-2, TRX-2, p53, κ.α. και η πιθανή συνέπεια των επιδράσεων αυτών στην παραγωγή - διατήρηση των αποθεμάτων ενέργειας καθώς και στον έλεγχο της δραστηριότητας του παράγοντα φλεγμονής NF-κΒ.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές, η θετική όσον αφορά τον εντοπισμό του ERα κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF7 και η θετική όσον αφορά τον εντοπισμό του ERβ κυτταρική σειρά ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y. Στις κυτταρικές αυτές σειρές μελετήθηκε η δράση του ACH στα επίπεδα έκφρασης και στην υποκυτταρική κατανομή των ERα και ERβ αντίστοιχα, αλλά και στον έλεγχο των επιπέδων μορίων των οποίων η έκφραση υπόκεινται σε οιστρογονική ρύθμιση και ελέγχουν βιοχημικές διεργασίες όπως απόπτωση, φλεγμονή και ρύθμιση του οξειδωτικού στρες. Τέλος χρησιμοποιήθηκε η θετική στον ERβ κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού N2A για επανάληψη πειραματικών διαδικασιών και για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από τα SH-SY5Y κύτταρα.

Είναι γνωστός ο ρόλος του ERα στην επαγωγή κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς και ο ρόλος του στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (Jia et al, 2015). Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών από εκχυλίσματα κυττάρων MCF-7, που επώαστηκαν με άλατα αργιλίου παρουσία ή απουσία οιστρογόνων ή αντιοιστρογόνων δείχνουν ότι το ACH προκαλεί αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Miguel Saceda, 1988) παρατηρήθηκε μικρή μείωση των επιπέδων ERα υπό την επίδραση E2, πιθανόν λόγω άμεσης δέσμευσης του συμπλόκου ERα-E2 στα στοιχεία απόκρισης οιστρογόνου (ERE). Επίσης, παρουσιάζει ενδιαφέρον η μερική αναίρεση της δράσης της οιστραδιόλης παρουσία του ACH όταν οι δύο ουσίες προστίθενται μαζί, υποδεικνύοντας μια παρεμβολή του ACH στην οιστρογονική σηματοδότηση. Ο μοριακός μηχανισμός της επαγόμενης από το ACH αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα μπορεί να αποδοθεί, τουλάχιστον εν μέρει, στην οιστρογονική δραστηριότητα του AI, εφόσον αυτή η επίδραση καταργείται παρουσία του ανταγωνιστή των ER ICI 182,780. Ο ICI δεσμεύεται στους ERs, αναστέλλει τη δράση τους ή/και προκαλεί την αποικοδόμησή τους (N. Heldring et al, 2007).

Το p53, ως ένα γονίδιο στόχος του ERα (Berger et al, 2012) αυξήθηκε σημαντικά παρουσία E2. Όμοια δράση σε χαμηλότερο ποσοστό παρατηρείται παρουσία ACH. Η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των ER μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του p53, αλλά και στην καταστολή της αντικαρκινικής του δραστηριότητας. Η υπόθεση αυτή βασίζεται σε παρατηρήσεις που δείχνουν την άμεση αλληλεπίδραση του ERα με το p53, η οποία οδηγεί σε εξαρτώμενη από ERα καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του p53, και συνεπώς καταστολή των αντιπολλαπλασιαστικών αποκρίσεων και της έκφρασης αποπτωτικών γονιδίων επαγόμενων από το p53 (Liu et al, 2006).

Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση του ACH στην έκφραση του γονιδίου c-Myc. Αντιθέτως παρουσία E2 και όπως αναμενόταν, σύμφωνα με προηγούμενες παρατηρήσεις (Sana & Malik, 2015), επάχθηκε η έκφρασή του.

Μετά από πραγματοποίηση μιτοχονδριακής κλασμάτωσης παρατηρήσαμε ότι παρουσία ACH αυξάνονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ERα και p53 σε μιτοχονδριακά εκχυλίσματα MCF-7 κυττάρων. Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα παρατηρείται όμοια δράση και παρουσία E2, γεγονός που επιβεβαιώνει δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας (Feltz & Roy, 2005). Η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2 παρουσία ACH σε μιτοχονδριακά εκχυλίσματα, έχει ως επακόλουθο τη μιτοχονδριακή βιωσιμότητα οδηγώντας είτε στην εξασφάλιση

των ενεργειακών αναγκών του καρκινικού κυττάρου είτε στην επαγόμενη από το ACH κυτταρική γήρανση, όπως επίσης έχει προταθεί (Raffetto et al, 2001).

Η θυρεοδοξίνη (TRX-2) είναι ένας βασικός μιτοχονδριακός αντιοξειδωτικός παράγοντα που ελαττώνει την επαγόμενη από το στρες προαποπτωτική σηματοδότηση. Ο μιτοχονδριακός εντοπισμός του αυξάνεται παρουσία E2, όπως αναφέρεται και από την βιβλιογραφία προκαλώντας μείωση της οξειδωτικής βλάβης και καταστολή της απόπτωσης (Silva-Adaya et al, 2014). Το ACH δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδά του σε σύγκριση με το δείγμα μάρτυρα.

Αξιολογώντας την δράση του ACH στον ERβ είναι αξιοσημείωτο να θυμίσουμε το νευροπροστατευτικό ρόλο των οιστρογόνων μέσω αυτού του υποδοχέα (Arenalto et al, 2015). Κατά τη διάρκεια της μελέτη στη κυτταρική σειρά ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του ERβ παρουσία ACH. Ακόμη παρατηρήθηκε μια παρεμβολή του ACH στην οιστρογονική σηματοδότηση όταν προστέθηκε μαζί με την E2, σε αναλογία με την παρατήρηση στα MCF7, όσο αφορά την ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης του ERα. Η μείωση του ERβ επιβεβαιώθηκε και σε επίπεδο mRNA, μέσω της πραγματοποίησης real-time PCR μετά από απομόνωση ολικού RNA κυττάρων SH-SY5Y στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του Βύρωνα Γοργογιέτα. Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία τα κύτταρα επωάστηκαν για 3 ώρες με E2  $10^{-9}$  και ACH  $10^{-4}$ . Η μείωση του ERβ παρουσία ACH και κατά συνέπεια ο περιορισμός των νευροπροστατευτικών δράσεων αυτού, πιθανόν να είναι, εν μέρει τουλάχιστον, υπεύθυνη για την παρατηρούμενη νευροεκφυλιστική δράση του AI.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τον εντοπισμό του ERβ στο μιτοχόνδριο και τον ρόλο του στην έκφραση μιτοχονδριακών γονιδίων που παίζουν ρόλο στη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες και της απόπτωσης σε συνδυασμό με την διατύπωση της θεωρίας της πιθανής οιστρογονικής δράσης του αργιλίου θελήσαμε να διερευνήσουμε κατά πόσο η παρουσία αργιλίου επηρεάζει την μιτοχονδριακή εντόπιση του ERβ και τα επίπεδα μορίων που εμπλέκονται σε μιτοχονδριακές λειτουργίες. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μιτοχονδριακή κλασμάτωση στην κυτταρική σειρά ανθρώπινου νευροβλαστώματος SH-SY5Y και έλεγχος αρχικά των επιπέδων ERβ. Παρατηρήθηκε μετατόπιση του ERβ στο μιτοχόνδριο παρουσία τόσο E2, επιβεβαιώνοντας δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας (Feltz & Roy, 2005; James W. Simpkins, 2008), όσο και ACH, αποτέλεσμα που επιβεβαιώθηκε και από την πραγματοποίηση ανοσοϊστοχημείας που έλαβε χώρα στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του Βύρωνα Γοργογιέτα.

Το ACH φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην πρόκληση απόπτωσης σε νευρικά κύτταρα δεδομένου ότι παρουσία του παρατηρείται μείωση της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 και της προκασπάσης-3. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προκασπάσης-9 δεν φαίνεται να επηρεάζονται παρουσία ACH. Γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν λαμβάνει χώρα μιτοχονδριακά επαγόμενη απόπτωση (Kuida, 2000).

Η αναίρεση των παραπάνω δράσεων μέσω της επίδρασης του ανταγωνιστή οιστρογόνων ICI182,780, η οποία θα επιβεβαίωνε την οιστρογονική δράση του ACH, δεν κατέστη δυνατή υποδηλώνοντας ότι η δράση αυτή του AI μεσολαβείτε μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων από την

γενωμική δράση των οιστρογόνων ή/και μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων από την οιστρογονική σηματοδότηση.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν και τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western απομονωμένων μιτοχονδριακών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων SH-SY5Y κυττάρων. Παρουσία ACH παρατηρείται μείωση των μιτοχονδριακών αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών, Bcl-2 και Bcl-xL, της αντιοξειδωτικής πρωτεΐνης TRX-2 και της καρβοξυκινάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού οξέος, PEPCK, ένζυμο με καίριο ρόλο στην ρύθμιση της γλυκονεογένεσης. Τα προηγούμενα σε συνδυασμό με την εξάλειψη των επιπέδων του μιτοχονδριακού Cyt-c, παρουσία ACH, μας οδηγούν στο συμπέρασμα μιας πιθανής επαγωγής απόπτωσης και οξειδωτικού στρες από το ACH και κατ' επέκταση πρόκλησης νευροεκφυλισμού. Οι παρατηρούμενες μειώσεις των αντιαποπτωτικών παραγόντων σε σύγκριση με τους προαποπτωτικούς παράγοντες (σταθερό BAX), που προέκυψαν παρουσία ACH, πιθανόν να οδηγούν στην ενεργοποίηση του PTP (permeability transition pore) και στην υπερφόρτωση του μιτοχονδρίου με κυτταροπλασματικό  $Ca^{2+}$ , έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα την παρατηρούμενη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτοσόλιο, και την επαγωγή της απόπτωσης (Strom et al, 2011). Η διαφορετική δράση του ACH όσο αφορά τη ρύθμιση των επιπέδων της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης Bcl2 στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, σε σχέση με αυτά του νευρικού ιστού, πιθανόν να υποδηλώνει μια ιστοειδική δράση αυτού η οποία πιθανόν να σχετίζεται με την παρουσία διαφορετικών συμπαραγόντων σε κάθε περίπτωση καθώς και με την παρατηρούμενη διαφορετική δράση του αργιλίου στα επίπεδα έκφρασης των δύο ισομορφών των υποδοχέων ERα και ERβ στους δύο τύπους κυττάρων.

Αρκετές από τις παραπάνω επιδράσεις του AI αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία όπως το ότι προκαλεί απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια, μείωση του Bcl-2 τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στο κυτταρόπλασμα, ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και κατακερματισμό του DNA (Maya et al, 2016).

Η παραγωγή ATP εξαρτάται κατά κύρια βάση από τη λειτουργία του μιτοχονδρίου και τις ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου. Η E2 διαδραματίζει ένα καίριο ρόλο στην παραγωγή ATP καθώς ρυθμίζει αρκετά ένζυμα «κλειδιά» που εμπλέκονται στη μετατροπή ενέργειας του μιτοχονδρίου, όπως αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού (pyruvate dehydrogenase, PDH), του ακετογλουταρικού (alpha ketoglutarate dehydrogenase, αKGDH) και του ηλεκτρικού οξέος (succinate dehydrogenase, SDH), εξοκινάση (hexokinase, HK), καθώς και άλλα ένζυμα (Rettberg et al, 2014). Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι, παρόλο που τα οιστρογόνα έχουν μικρή επίδραση στην παραγωγή μιτοχονδριακού ATP υπό βασικές συνθήκες, είναι ισχυροί σταθεροποιητές της παραγωγής του κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες. Συχνή παρατήρηση αποτελεί η επαγόμενη αύξηση της παραγωγής ATP από την E2 (Cai et al, 2013; James W. Simpkins, 2008). Αντίθετα, το AI φαίνεται, βάσει βιβλιογραφίας (Maya et al, 2016), να επάγει τη μείωσή του.

Αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας μέτρησης ενδοκυττάρου ATP εμφάνισαν ένα παρόμοιο μοτίβο στα κύτταρα SH-SY5Y και MCF7, αλλά και στην κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού N<sub>2</sub>A που επαναλήφθηκε η πειραματική διαδικασία. Το μοτίβο υποδηλώνει μια σημαντική τάση μείωσης του ATP παρουσία ACH, ενώ παρουσία E2, η τάση αυτή μείωσης είναι πολύ μικρή. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η E2 προσπαθώντας να αναιρέσει

αποπτωτικές διαδικασίες, με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις, προκαλεί ελάχιστη μείωση των επιπέδων ATP (Tsujiimoto, 1997; Zamaraeva et al, 2005). Αντίθετα η σημαντική μείωση των επιπέδων ATP παρουσία ACH μπορεί να σχετίζεται με την επαγωγή απόπτωσης και να προκαλέσει νευροεκφυλισμό και κυτταρικό θάνατο. Παρόλα αυτά απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης του ACH στα επίπεδα ATP σε συνδυασμό τόσο με την E2 όσο και με το ICI182,780.

Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ αποτελεί στόχο της φωσφορυλίωσης της Akt κινάσης και η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3k/Akt από την E2 οδηγεί στην έκφραση γονιδίων στόχων του NF-κΒ (Bjornstrom & Sjoberg, 2005). Με σκοπό τον έλεγχο της επίδρασης του ACH στην δραστικότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, παρουσία ή απουσία του παράγοντα φλεγμονής TNFα, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία λουσιφεράσης με χρήση κατάλληλων πλασμιδιακών φορέων. Σε κύτταρα HEK293 που περιέχουν χαμηλά επίπεδα ERs δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση του ACH στην ρύθμιση της μεταγραφικής δραστικότητας του NF-κΒ. Αντίθετα σε κύτταρα N2A που διαμολύνθηκαν κατάλληλα ώστε να υπερεκφράζουν παροδικά τον ERβ παρατηρήθηκε σε συμφωνία και με τη διεθνή βιβλιογραφία (Deroo & Buensuceso, 2010) αναστολή της μεταγραφικής δραστικότητας του NF-κΒ παρουσία E2 σε συνθήκες φλεγμονής. Παρουσία ACH παρατηρήθηκε πάλι μείωση του NF-κΒ ενώ με προσθήκη E2 και ACH παρατηρείται συνεργατική/αθροιστική δράση. Συνεπώς το ACH φαίνεται να επιδρά στον ERβ και να ενεργοποιεί την επαγόμενη από τον ERβ καταστολή της δραστικότητας του NF-κΒ. Δεδομένου ότι ο NF-κΒ επάγει την έκφραση του μιτοχονδριακού αντιοξειδωτικού ενζύμου MnSOD, η μείωση της δραστικότητάς του από το ACH θα συνεπάγεται και μείωση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού .

Οι αλλαγές της διαμόρφωσης των ERα και ERβ και/ή οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επάγονται από το ACH μπορεί να εξυπηρετούν διαφορετικά τη δέσμευση και τη στρατολόγηση ορισμένων μελών του πολυδύναμου πρωτεϊνικού μεταγραφικού συμπλόκου, με αποτέλεσμα τη διαφορική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στόχων των ER. Αυτό ενισχύεται και από την ιστοειδική δράση τόσο των ERs όσο και του ACH.

Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι οι δράσεις του AI στα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων και ο υποκυτταρικός εντοπισμός τους μπορεί να οδηγήσουν σε ρύθμιση των δράσεων τους και συνεπώς στην παρεμβολή του AI στην οιστρογονική σηματοδότηση. Η υποθετική μέτρια οιστρογονική δραστικότητα του AI σε σχέση με την καθημερινή έκθεση σε αυτό εγείρει ανησυχίες για την ασφάλεια της χρήσης του.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Arevalo MA, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2015) The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nature reviews Neuroscience* 16: 17-29
2. Becaria A, Campbell A, Bondy SC (2002) Aluminum as a toxicant. *Toxicology and industrial health* 18: 309-320
3. Berger CE, Qian Y, Liu G, Chen H, Chen X (2012) p53, a target of estrogen receptor (ER) alpha, modulates DNA damage-induced growth suppression in ER-positive breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 287: 30117-30127
4. Bjornstrom L, Sjoberg M (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19: 833-842
5. Cai Q, Lin T, Kamarajugadda S, Lu J (2013) Regulation of glycolysis and the Warburg effect by estrogen-related receptors. *Oncogene* 32: 2079-2086
6. Chen Y (2011) Calcium Phosphate Transfection of Eukaryotic Cells. *bio-protocol* 1
7. Cui J, Shen Y, Li R (2013) Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine* 19: 197-209
8. Darbre PD (2005) Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *Journal of inorganic biochemistry* 99: 1912-1919
9. Darbre PD (2006a) Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 20: 121-143
10. Darbre PD (2006b) Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. *Journal of applied toxicology : JAT* 26: 191-197
11. Darbre PD (2016) Aluminium and the human breast. *Morphologie : bulletin de l'Association des anatomistes* 100: 65-74
12. Darbre PD, Mannello F, Exley C (2013) Aluminium and breast cancer: Sources of exposure, tissue measurements and mechanisms of toxicological actions on breast biology. *Journal of inorganic biochemistry* 128: 257-261
13. Deroo BJ, Buensuceso AV (2010) Minireview: Estrogen receptor-beta: mechanistic insights from recent studies. *Mol Endocrinol* 24: 1703-1714
14. Farzaneh S, Zarghi A (2016) Estrogen Receptor Ligands: A Review (2013-2015). *Scientia pharmaceutica* 84: 409-427
15. Felty Q, Roy D (2005) Estrogen, mitochondria, and growth of cancer and non-cancer cells. *Journal of carcinogenesis* 4: 1
16. Fiocchetti M, Ascenzi P, Marino M (2012) Neuroprotective effects of 17beta-estradiol rely on estrogen receptor membrane initiated signals. *Frontiers in physiology* 3: 73
17. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological reviews* 58: 685-704
18. Gupta N, Mayer D (2013) Interaction of JAK with steroid receptor function. *Jak-Stat* 2: e24911
19. Gupte AA, Pownall HJ, Hamilton DJ (2015) Estrogen: an emerging regulator of insulin action and mitochondrial function. *Journal of diabetes research* 2015: 916585



20. Hall JM, McDonnell DP (1999) The Estrogen Receptor  $\beta$ -Isoform (ER $\beta$ ) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER $\alpha$  Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens. *Endocrinology* 140: 5566–5578
21. Ishihara Y, Takemoto T, Ishida A, Yamazaki T (2015) Protective actions of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone on oxidative neuronal injury induced by organometallic compounds. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015: 343706
22. James W. Simpkins SY, Saumyendra N. Sarkar, and Virginia Pearce (2008) Estrogen Actions on Mitochondria-Physiological and Pathological Implications. *Molecular and cellular endocrinology* 13: 51–59
23. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA (2015) Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism* 29: 557-568
24. Kerdivel G, Habauzit D, Pakdel F (2013) Assessment and molecular actions of endocrine-disrupting chemicals that interfere with estrogen receptor pathways. *International journal of endocrinology* 2013: 501851
25. Klinge CM (2008) Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 105: 1342-1351
26. Kuida K (2000) Caspase-9. *The international journal of biochemistry & cell biology* 32: 121-124
27. Liu W, Konduri SD, Bansal S, Nayak BK, Rajasekaran SA, Karuppayil SM, Rajasekaran AK, Das GM (2006) Estrogen receptor- $\alpha$  binds p53 tumor suppressor protein directly and represses its function. *The Journal of biological chemistry* 281: 9837-9840
28. Marino M., Galluzzo P., P. A (2006) Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. *Current Genomics* 7: 497-508
29. Maya S, Prakash T, Madhu KD, Goli D (2016) Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 83: 746-754
30. Miguel Saceda MEL, Pierre Chambon, Ralph L. Lindsey, Mathurose Ponglikitmongkol, Montserrat Puente, and Mary Beth Martin (1988) <Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol.pdf>. *Mol Endocrinol* 2 1157-1162
31. N. Heldring, A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Strom, E. Treuter, M. Warner, Gustafsson J (2007) Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol Rev* 87: 905–931
32. Olefsky JM (2001) Nuclear receptor minireview series. *The Journal of biological chemistry* 276: 36863-36864
33. P. D. Darbre, Charles AK (2010) Environmental Oestrogens and Breast Cancer: Evidence for Combined Involvement of Dietary, Household and Cosmetic Xenoestrogens. *Anticancer Research*: 815-828
34. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F (2014) Estrogen receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ): subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids* 90: 13-29
35. Pedram A, Razandi M, Wallace DC, Levin ER (2006) Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. *Molecular biology of the cell* 17: 2125-2137

36. Pietras RJ, Marquez-Garban DC (2007) Membrane-associated estrogen receptor signaling pathways in human cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13: 4672-4676
37. Planey SL, Kumar R, Arnott JA (2014) Estrogen receptors (ERalpha versus ERbeta): friends or foes in human biology? *Journal of receptor and signal transduction research* 34: 1-5
38. Psarra AM, Hermann S, Panayotou G, Spyrou G (2009) Interaction of mitochondrial thioredoxin with glucocorticoid receptor and NF-kappaB modulates glucocorticoid receptor and NF-kappaB signalling in HEK-293 cells. *The Biochemical journal* 422: 521-531
39. Psarra AM, Sekeris CE (2008) Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochimica et biophysica acta* 1783: 1-11
40. Raffetto JD, Leverkus M, Park HY, Menzoian JO (2001) Synopsis on cellular senescence and apoptosis. *Journal of vascular surgery* 34: 173-177
41. Renoir JM, Marsaud V, Lazennec G (2013) Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochemical pharmacology* 85: 449-465
42. Rettberg JR, Yao J, Brinton RD (2014) Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. *Frontiers in neuroendocrinology* 35: 8-30
43. Sana M, Malik HJ (2015) Current and emerging breast cancer biomarkers. *Journal of cancer research and therapeutics* 11: 508-513
44. Sertbas M, Ulgen K, Cakir T (2014) Systematic analysis of transcription-level effects of neurodegenerative diseases on human brain metabolism by a newly reconstructed brain-specific metabolic network. *FEBS open bio* 4: 542-553
45. Sever R, Glass CK (2013) Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5: a016709
46. Silva-Adaya D, Gonsebatt ME, Guevara J (2014) Thioredoxin system regulation in the central nervous system: experimental models and clinical evidence. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014: 590808
47. Steward MM, Sridhar A, Meyer JS (2013) Neural regeneration. *Current topics in microbiology and immunology* 367: 163-191
48. Strom JO, Theodorsson A, Theodorsson E (2011) Mechanisms of estrogens' dose-dependent neuroprotective and neurodamaging effects in experimental models of cerebral ischemia. *International journal of molecular sciences* 12: 1533-1562
49. Tsujimoto Y (1997) Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death and Differentiation* 4: 429 - 434
50. Zamaraeva MV, Sabirov RZ, Maeno E, Ando-Akatsuka Y, Bessonova SV, Okada Y (2005) Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Differ* 12: 1390-1397
51. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA (2010) Estrogen signaling via estrogen receptor {beta}. *The Journal of biological chemistry* 285: 39575-39579

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτιστα θεωρώ καθήκον μου να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας Δρ. Αννα-Μαρία Ψαρρά, Επ. Καθηγήτρια ΤΒΒ, για την ευκαιρία που μου πρόσφερε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να συμμετέχω στην ομάδα της και την εν λόγω ερευνητική μελέτη. Την ευχαριστώ για την ενεργή παρουσία της, την καθοδήγηση, την υποστήριξη και την υπομονή της καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Επ. Καθηγητή ΤΒΒ Δρ. Νικόλαο Μπαλατσό και την Λέκτορα ΤΒΒ Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη, αλλά και τον διευθυντή του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας Καθηγητή ΤΒΒ Δημήτρη Λεωνίδα για την έμπρακτη παρουσία τους στον καθημερινό μας αγώνα.

Κάποια πράγματα δεν μπορούν να ειπωθούν με λόγια οπότε θα αρκεστώ σε ένα τεράστιο ευχαριστώ στον υπ. Διδάκτορα, και πάνω από όλα φίλο, Βύρωνα Γοργογιέτα. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω καθένα από τα μέλη της ερευνητικής ομάδας της Δρ. Ψαρρά, καθώς και του εργαστηρίου ΔΛΒ, και ειδικότερα την υπ. Διδάκτορα Κατερίνα Καρρά, μέλος της ερευνητικής ομάδας της Δρ. Ψαρρά, για την ανιδιοτελή της βοήθεια και στήριξη, και την άριστη συνεργασία που είχαμε τον τελευταίο ενάμιση χρόνο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη συνεχή τους καθημερινή στήριξη, τους φίλους μου για την υπομονή τους, και ειδικότερα τον φίλο μου Γιώργο Πίσσα για την υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.