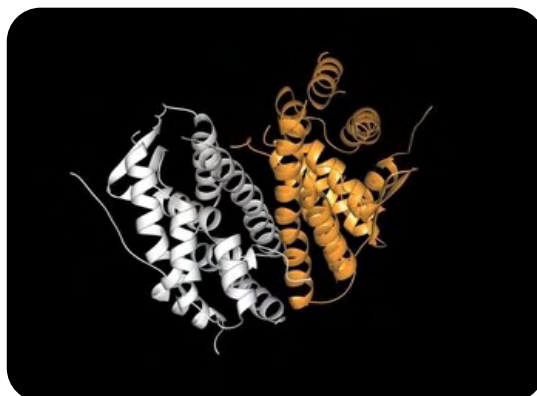


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

# Εκτίμηση της οιστρογονικής δράσης ενώσεων αργιλίου στην βήτα μορφή του υποδοχέα οιστρογόνων σε νευρικά κύτταρα



*ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ 2015*

*ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΛΙΑΚΟΥ ΕΛΕΝΗ*

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

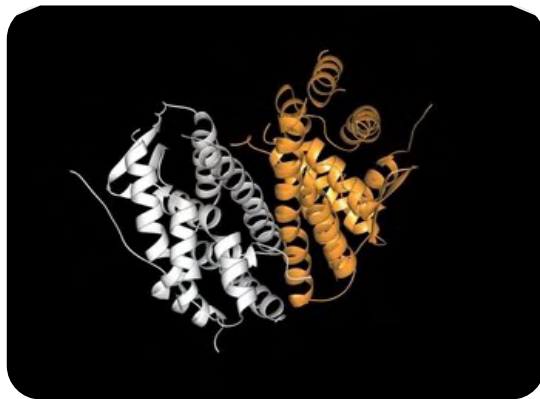
**ΛΑΡΙΣΑ 2015**

**UNIVERSITY OF THESSALY**



**DEP. OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**

# Evaluation of estrogen receptor beta mediated estrogenic activity of aluminum compounds in neuronal cells



*DIPLOMA PROJECT OF THE STUDENT: LIAKOU ELENI  
SUPERVISOR PROFESSOR: DR. ANNA- MARIA G. PSARRA*

**LARISSA 2015**

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

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

**Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

**Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.

**Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.

**Σκαμνάκη Βασιλική**, Λέκτορας Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	9
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ/ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ.....	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ.....	12
1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ.....	13
1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ-ESTROGEN RECEPTORS.....	14
1.3.1 ESTROGEN RECEPTORS-ERA ΚΑΙ ERB ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΑΥΤΩΝ.....	15
1.3.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERS.....	18
Α) ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ (GENOMIC ACTION).....	18
Β) ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ (NON-GENOMIC ACTION).....	20
Γ) ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	21
1.3.3 ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΜΕ ΤΟ ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ: ΕΝΑΣ ΝΕΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ.....	22
1.3.4 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Β-ERB.....	23
1.3.5 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ (ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ) ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	24
1.3.6 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Β (ERB) ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ.....	26
1.4 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	28
1.4.1 ΑΛΛΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	30
1.4.2 ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ ΚΑΙ SERMS.....	30
1.4.3 ΞΕΝΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ- ΜΕΤΑΛΛΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	33
1.4.4 ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	34
1.4.5 ALUMINUM ΚΑΙ ΤΑ ΑΛΑΤΑ ΤΟΥ –ΥΔΡΟΞΥ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΑΡΓΙΛΙΟ (ALUMINUM CHLORHYDRATE, ACH).....	35
1.4.6 Η ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ACH.....	36
1.5 ΤΑ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΟΥ ΑΡΓΙΛΙΟΥ.....	37

2. ΣΚΟΠΟΣ.....	38
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	40
3.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	40
3.2 ΥΛΙΚΑ.....	41
3.2.1 ΧΗΜΙΚΑ.....	41
3.2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.....	43
3.2.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	44
3.2.4 ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	47
3.2.5 ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	47
3.2.6 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	47
3.2.7 ΚΥΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	48
3.2.8 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ.....	49
3.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	50
3.3.0.Α ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	50
3.3.0.Β ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ρDNA ΑΠΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΕ ΜΕΣΑΙΑ ΚΛΙΜΑΚΑ (MIDI PREP).....	51
3.3.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	51
3.3.1.1 ΞΕΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	51
3.3.1.2 ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	52
3.3.1.3 ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	53
3.3.1.4 ΜΕΤΡΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	53
3.3.1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΟΔΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ (TRANSFECTION).....	54
3.3.1.6 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	56
3.3.1.7 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ CIS-FBS.....	58
3.3.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ.....	59
3.3.2.1.Α. ΕΝΖΥΜΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ/ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΙΔΑΣΗΣ.....	59
3.3.2.1.Β. ΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (SONICATION) ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ (ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD).....	61

3.3.2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ-ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	62
3.3.2.3 ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΙΣΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ.....	64
3.3.2.4 BLOCKING ΜΕ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΤΟ ΠΡΩΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ.....	65
3.3.2.5 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ-WESTERN BLOT.....	66
3.3.2.6 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ (IHC).....	67
3.3.2.7 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	69
3.3.2.7.A. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ PURELINK™ GENOMIC DNA MINI KIT ΤΗΣ INVITROGEN.....	69
3.3.2.7.B. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	70
3.3.2.8 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL TIME).....	72
3.3.2.8.A. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ TRIZOL.....	72
3.3.2.8.B. ΠΕΨΗ ΜΕ DNASE.....	72
3.3.2.8.Γ. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT-PCR).....	73
3.3.2.8.Δ. REAL TIME PCR.....	74
4. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	75
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	76
5.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ N <sub>2</sub> A ΚΑΙ SH-SY5YA.....	76
5.2 ΜΕΛΕΤΗ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΛΑΤΩΝ ΑΡΓΙΛΙΟΥ ΣΕ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	77
5.2.1 ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ N <sub>2</sub> A.....	77
5.2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΔΡΑΣΗΣ E <sub>2</sub> ΚΑΙ ACH ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ N <sub>2</sub> A.....	79
5.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ACH ΣΤΗΝ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ERβ ΣΕ SH-SY5YA.....	80
5.4 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ACH ΚΑΙ E <sub>2</sub> ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ N <sub>2</sub> A ΚΑΙ SHS-Y5YA.....	82
5.5 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ E <sub>2</sub> ΚΑΙ ACH ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ SH-SY5YA.....	86
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	88
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	91

## Ευχαριστίες

Έχοντας ολοκληρώσει ένα χρόνο στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, αποκόμησα εμπειρίες τόσο σε επίπεδο γνώσεων όσο και σε ανθρώπινο. Αγάπησα περισσότερο αυτό που θέλησα να σπουδάσω, μέσα από σκληρή δουλειά και προσπάθεια και τελικά η επιλογή μου επιβεβαιώθηκε.

Για την προσπάθεια αυτή, αλλά και για την τιμή που μου έκανε να συμμετέχω στο project της, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την Επ. Καθηγήτρια Ψαρρά Άννα-Μαρία, η οποία ήταν δίπλα μου σε όποια δυσκολία συνάντησα και με εμπύχωνε πάντα με χαμόγελο. Ήταν ανα πάσα στιγμή παρούσα σε ό,τι κι αν χρειάστηκα ακόμη και σε πρακτικά θέματα κάτι που εκτίμησα αφάνταστα. Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διευθυντή του εργαστηρίου, Αναπληρωτή καθηγητή Λεωνίδα Δημήτριο, για το ότι έγινα δεκτή στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, καθώς και τη Λέκτορα Σκαμνάκη Βασιλική, που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή μου.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ, στον υποψήφιο διδάκτορα Γοργογιέτα Βύρωνα, ο οποίος πέρα από το πολύ μεγάλο φόρτο εργασίας του, μου στάθηκε κάτι παραπάνω από συνεργάτης. Μου έδειξε τυφλή εμπιστοσύνη στις πειραματικές διαδικασίες και συνεχή στήριξη στις δυσκολίες που αντιμετώπισα. Θέλω, επίσης, να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας μου, την Κυλινδρή Παρούλα για την στήριξή της και τις απαντήσεις της σε κάθε απορία μου, καθώς και τις Σωτηρίου Ναταλία και Γεωργατζά Δήμητρα για τη βοήθειά τους και την όμορφη επικοινωνία που είχαμε. Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους υπόλοιπους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου: Καντσάδη Νατάσα, Κυρίτσης Θάνος, Στραβοδήμος Γεώργιος και Χατζιλεοντιάδου Δήμητρα, προσφέροντας μεγάλη στήριξη τόσο σε πρακτικά όσο και θεωρητικά θέματα, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, χωρίς να εξαιρώ κανέναν, για την ομαλή συνεργασία μας, αλλά και την όμορφη παρέα τους αυτόν τον ένα χρόνο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, που ήταν δίπλα μου όλα τα χρόνια της φοίτησής μου και με υποστήριξε σε όλες μου τις επιλογές. Χωρίς εκείνη δεν θα είχα την ευκαιρία να αποκτήσω τη γνώση, τις εμπειρίες και τους πραγματικούς φίλους που μου έδωσε η φοιτητική μου ζωή.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υποδοχείς των οιστρογόνων άλφα και βήτα, (ERα και ERβ) είναι οι δύο κύριες ισομορφές των υποδοχέων των οιστρογόνων. Η δε βήτα μορφή του υποδοχέα φαίνεται να έχει ανταγωνιστική δράση έναντι της άλφα. Δρουν κυρίως ως μεταγραφικοί παράγοντες και ρυθμίζουν την έκφραση πληθώρας γονιδίων, εξασφαλίζοντας τη σωστή και ομαλή λειτουργία του κυττάρου και ολόκληρου του οργανισμού. Ως εκ τούτου, η δράση τους είναι καίρια και για την εύρυθμη λειτουργία του νευρικού συστήματος και του εγκεφάλου, ενώ η διαταραχή της, μπορεί να συμβάλλει στη παθογένεση διάφορων διαταραχών, μεταξύ των οποίων ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Συγκεκριμένα, ο ενεργοποιημένος από την οιστραδιόλη, ERβ αλληλεπιδρά με μία σειρά από αντιοξειδωτικά και αντιαποπτωτικά μόρια, δρώντας νευροπροστατευτικά.

Τα μεταλλοοιστρογόνα είναι μέταλλα τα οποία έχουν την ικανότητα να μιμούνται τα οιστρογόνα και να πυροδοτούν ή να καταστέλλουν τα διακυτταρικά μονοπάτια της οιστρογονικής σηματοδότησης, ή να επεμβαίνουν στη μεταγραφή και έκφραση των γονιδίων που εξαρτώνται από τα οιστρογόνα. Το υδρόξυ χλωριούχο αργίλιο (Aluminum Chlorhydrate, ACH) αποτελεί μία τέτοια ένωση, ερχόμενο μάλιστα σε καθημερινή και χρόνια επαφή με τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά των αποσμητικών και άλλων προϊόντων κοσμετολογίας. Έχει δε, ενοχοποιηθεί για τη συμμετοχή του στα γεγονότα της καρκινογένεσης ιστών, όπως ο μαστός, άλλα και εντοπίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε εγκεφάλους ατόμων με νόσο Alzheimer, γι' αυτό και οι πιθανές επιδράσεις του στον οργανισμό αποτελούν αντικείμενο συνεχούς μελέτης.

Έτσι λοιπόν, σκοπός της εργασίας αυτής, είναι η εκτίμηση της πιθανής οιστρογονικής δράσης του ACH στον υποδοχέα οιστρογόνων τύπου β, σε νευρικά κύτταρα (N<sub>2</sub>A και SH-SY5YA). Μέσω των πειραμάτων μας, μελετάται και εξακριβώνεται η πιθανή οιστρογονική δράση των ενώσεων του αργιλίου στα κύτταρα αυτά, με τη χρήση, ανοσολογικών (Western Blot) και ανοσοϊστοχημικών τεχνικών, με τη βοήθεια των οποίων παρατηρείται μετατόπιση του ERβ στα μιτοχόνδρια- και επομένως δράση παρόμοια με την οιστραδιόλη (17β-οιστραδιόλη), τον φυσικό προσδέτη των ERs. Κατόπιν, σε επόμενη φάση, παρουσία του ACH σημειώνεται μείωση των επιπέδων mRNA και πρωτεϊνών ενδογενών αντιαποπτωτικών μορίων, όπως το Bcl-2. Η δράση μάλιστα αυτή αίρεται παρουσία του ειδικού ανταγωνιστή οιστρογόνων, του ICI υποδηλώνοντας οιστρογονική δράση του ACH. Για το λόγο αυτό, απαιτείται μελλοντικά περαιτέρω έρευνα του οιστρογονικού σήματος του αργιλίου, προκειμένου να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί συμμετοχής του στην παθογένεια των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Τέλος, για την όσο το δυνατόν ορθότερη προσέγγιση, επιχειρείται επανάληψη και βελτιστοποίηση των συνθηκών διαμόλυνσης των N<sub>2</sub>A, ώστε να επιτευχθεί πιο εκτεταμένη μελέτη της επίδρασης του ACH στη δραστηριότητα των ERs.



## ABSTRACT

Estrogen Receptors alpha and beta, are the two main isoforms of the estrogen receptor family. Experimental data shows that estrogen receptor beta antagonize estrogen receptor alpha signaling. They act mostly, as transcription factors, by regulating the expression of an abundance of genes and so controlling the physiology of the cell and the whole organism. Therefore their action is vital for the nervous system and brain as well, while their disorganization can contribute to the pathogenesis of several disorders, including cancer and neurodegenerative diseases. Specifically, the activated by estradiol, ER $\beta$  interacts with a number of antioxidant and antiapoptotic molecules inducing neuroprotection.

We name some metals as metalloestrogens, because they have the ability to mimic estrogens and so to trigger or suppress the ERs signaling pathways, affecting among others the expression of the estrogen receptor target genes. Aluminum Chlorhydrate (ACH), is an example of such a substance; it is being used on a regular basis and for many years, being in a contact with the human body, as it is a main ingredient of the deodorants and other cosmetic products. It has been suggested to be involved in breast cancer carcinogenesis, and since high concentrations of aluminum are detected in the brains of patients who suffered from Alzheimer's disease, aluminum is considered as a neurodegenerative factor. For all this reasons, ACH mechanisms of actions are under investigation.

So, considering all that we have mentioned above, the goal of this project is the evaluation of estrogenic activity of aluminum compounds through the estrogen receptor beta signaling in nerve cells (cancer cell lines SH-SY5Y and N2A). Our experiments have, studied and verified the putative estrogenic action of the aluminum compounds, by using immunoblotting techniques (Western Blot) and immunohistochemistry. The use of these techniques, allow us observe the translocation of the ER $\beta$  to the mitochondria, in the presence of ACH, exhibiting an E<sub>2</sub>-like action (E<sub>2</sub>: 17 $\beta$ -estradiol, the natural ER ligand). In a next phase, we found that cells that had been cultured in the presence of ACH, exhibited reduction in the mRNA and protein level of Bcl-2, which is an antioxidant and antiapoptotic molecule and an ER $\beta$  target gene. This effect is reversed in the presence of the E<sub>2</sub> antagonist ICI, indicated an estrogenic activity of ACH. To conclude, an additional future study for aluminum's estrogenic action is required, so that the mechanisms of its contribution to the pathogenesis of neurodegenerative diseases to be clarified. Finally, the optimization of the transfection of N2A cells will give us the opportunity to extensively study the effect of ACH on ERs transcriptional activity.

A→ Amper

$\alpha.a$  ,(a.a)→ αμινοξέα

Ab→ Antibody

ACH→ Aluminum Chlorhydrate

AD→ Alzheimer disease

AF 1 → Activation Functions 1

AF 2→ Activation Functions 2

APP →Amyloid Precursor Protein

CRE→ cAMP Response Elements

DBD→DNA Binding Domain

DES→ Diethyl estrdiol

DMSO→Di-Methyl-Sulph-Oxide

E1→ οιστρόνη

E2→ 17β-οιστραδιόλη

E3→ εστριόλη

ERα→ Estrogen Receptor alpha

ERβ→ Estrogen Receptor beta

EGF→Epidermal Growth Factor

eNOS→ endothelial Nitric oxide synthase

EREs →Estrogen Response Elements

IGF-1→ Insulin-like Growth Factor-1

FBS→Fetal Bovine Serum

Gel→ πηκτή πολυακρυλαμίδης, στη συγκεκριμένη εργασία επειδή έγινε ανάλυση πρωτεϊνών τα gel που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πηκτές πολυακρυλαμίδης 10%,

GR→ Glucocorticoid Receptor

HREs→Hormone Response Elements

ICI→ICI 182,780, χημικό όνομα 7α,17β-(9-((4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl)nonyl)estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol, χρησιμοποιήθηκε ως αγωνιστής του υποδοχέα των οιστρογόνων

IHC→ Immuno-Histo-Chemistry (Ανοσοϊστοχημεία)

ΚΝΣ→ Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

LBD → Ligand Binding Domain

L.G→ L- Glutamine

MS →Multiple Sclerosis, Σκλήρυνση κατά Πλάκας

NHRs→ Nuclear Hormone Receptors

ΝΣ→Νευρικό Σύστημα

ONPG→Ορθο-Νιτροφαινυλ-γαλακτοσίδη, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης.

PPARs→ Peroxisome Proliferator-activated Receptors

PD→ Parkinson disease

R.T→Room Temperature

SERMs →Selective Estrogen Receptors Modulators

WB→ Western Blot, Ανοσοαποτύπωση Πρωτεϊνών

wo. P.R→ without Phenol Red (απουσία χρωστικής ερυθρό της φαινόλης)

w.P.R→ with Phenol Red

κ/α→ κυτταροκαλλιέργεια

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Οι πυρηνικοί υποδοχείς, Nuclear Hormone Receptors (NHRs), αντιπροσωπεύουν μία μεγάλη οικογένεια προσδετο-ενεργοποιούμενων μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι εμπλέκονται στη ρύθμιση ευρείας ποικιλίας διεργασιών, όπως αυτών της ανάπτυξης, της μεταβολικής ομοιόστασης, του ισοζυγίου του άλατος και κατ' επέκταση τη διατήρηση του ισοζυγίου του ύδατος και της οξεοβασικής ισορροπίας και φυσικά της ανάπτυξης, ωρίμανσης και ομαλής λειτουργίας το αναπαραγωγικού συστήματος. Οι NHR αλληλεπιδρούν με Hormones Response Elements (HRE), έχοντας ως αποτέλεσμα αλλαγές της δομής ή της λειτουργίας του υποδοχέα. Οι προσδέτες των πυρηνικών υποδοχέων, είναι συνήθως μικρά λιπόφιλα μόρια, όπως οι στεροειδείς ορμόνες, οι θυρεοειδείς ορμόνες και η βιταμίνη D (McEwan et al. 2009).

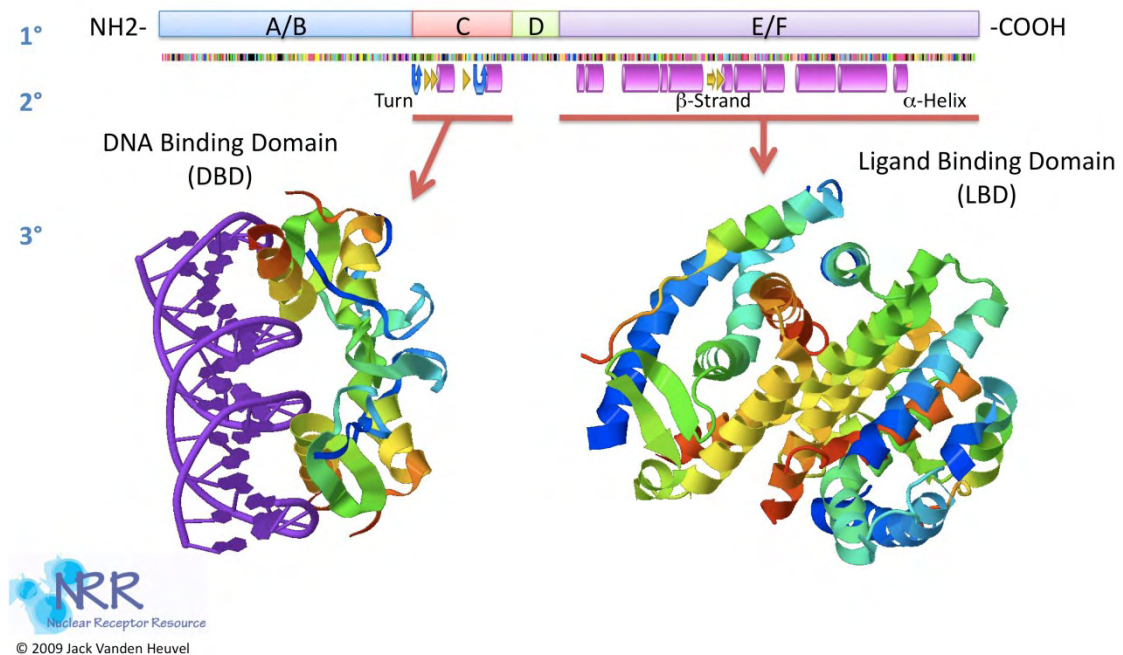
Στο σύνολό τους οι πυρηνικοί υποδοχείς παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό συντήρησης, ως εκ τούτου έχουν την ίδια βασική δομή: διαθέτουν ένα μακρύ αμινο –τελικό άκρο, ένα καρβόξυ-τελικό άκρο, υπεύθυνο για τη σύνδεση του υποδοχέα με τον προσδέτη του (LBD) και μία περιοχή σύνδεσης με το DNA (DBD, DNA Binding Domain). Η τελευταία αποτελείται από δύο χαρακτηριστικές δομές δακτύλου ψευδαργύρου (zinc finger) και είναι η πιο συντηρημένη περιοχή της δομής των NRs. (Gonzalez et al. 2014)

Φυλογενετική ανάλυση έδειξε την ύπαρξη έξι υποοικογενειών των πυρηνικών υποδοχέων (NR1-6), όμως, ο απλούστερος τρόπος κατηγοριοποίησής τους είναι η τοποθέτησή τους σε δύο ομάδες:

Οι πυρηνικοί υποδοχείς τύπου I περιλαμβάνουν τους υποδοχείς των οιστρογόνων (ERs), τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών (GRs), της προγεστερόνης, των αλατοκορτικοειδών (mineralcorticoids) και των ανδρογόνων (AR). Σε αυτού του τύπου των υποδοχέων, η ορμόνη προσδέεται στην LBD (Ligand Binding Domain) του καρβόξυ-τελικού άκρου του υποδοχέα, ο υποδοχέας ενεργοποιείται από την πρόσδεσή του με τον προσδέτη του, δημιουργεί ομοδιμερή (με άλλους όμοιους ενεργοποιημένους υποδοχείς) και μεταφέρεται στον πυρήνα όπου και προσδέεται σε ειδικές περιοχές του DNA, που φέρουν αναστροφές επαναλήψεις, προκειμένου να συμμετάσχει στη μεταγραφή των γονιδίων που έπονται των HRE. (Gonzalez et al. 2014)

Στους πυρηνικούς υποδοχείς τύπου II: ο υποδοχέας διατηρείται στον πυρήνα και συνδέεται με το γενετικό υλικό ως ετεροδιμερές. Το ετεροδιμερές αυτό, σχηματίζεται με τη σύνδεση των υποδοχέων αυτής της κατηγορίας με έναν διαφορετικό πυρηνικό υποδοχέα, τον ρετινοειδή υποδοχέα X. Η πρόσδεση του ετεροδιμερούς αυτού γίνεται σε ευθείς επαναλήψεις του DNA. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μεταξύ άλλων και οι PPARs (Peroxisome Proliferator-activated Receptors), Liver X receptors και οι υποδοχείς της βιταμίνης D (VDRs) (Gonzalez et al. 2014)

# Structure of NRs



**Η βασική δομή των πυρηνικών υποδοχέων.** Παρουσιάζεται η βασική οργάνωση των υπομονάδων των NR: το N-τελικό άκρο, η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του υποδοχέα στα REs (περιοχή C) και για τον διμερισμό του υποδοχέα (περιοχή D) και το καρβοξυ-τελικό άκρο που αποτελεί την περιοχή πρόσδεσης με τον προσδέτη (LBD).

## 1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ

Οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών αποτελούν μέλη της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων. Κυτταρικά, μπορούν να εντοπίζονται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα ή ακόμη και στη μεμβράνη. Στην απενεργοποιημένη τους μορφή βρίσκονται συνδεδεμένοι με Hsps (Heat shock proteins)- πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Η σύνδεση του προσδέτη (δηλαδή του αντίστοιχου για τον υποδοχέα στεροειδούς), οδηγεί στην ενεργοποίησή του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση του υποδοχέα από την πρωτεΐνη θερμικού σοκ, τον διμερισμό του υποδοχέα με έναν όμοιό του, προς σχηματισμό ενός ομοδιμερούς και τέλος, τη μετατόπιση του ομοδιμερούς αυτού στον πυρήνα. Εκεί, ο ενεργοποιημένος υποδοχέας, έχει ως στόχο τη σύνδεσή του με το DNA σε κατάλληλα σημεία αλληλεπίδρασης με αυτό. Τα στοιχεία αυτά είναι τα HREs (Hormone Response Elements) και βρίσκονται συνήθως στους υποκινητές των γονιδίων στόχων (Gupta et al. 2013).

Σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης τους, οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών χωρίζονται σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες. Επειδή, στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με τους

υποδοχείς των οιστρογόνων, θα αναφερθούμε μόνο στην πρώτη εκ των τεσσάρων, κατηγορία, στην οποία και ανήκουν οι ERs.

Οι στεροειδείς, λοιπόν, υποδοχείς τύπου I, συνήθως προσδένονται στα HREs, τα οποία ιδανικά αποτελούν ανάστροφες επαναλήψεις. Εκτός των ERs, η συγκεκριμένη υποκατηγορία στεροειδών υποδοχέων περιλαμβάνει και τους υποδοχείς της προγεστερόνης, των γλυκο- και άλατο-κορτικοειδών, καθώς και τους υποδοχείς των ανδρογόνων (Gupta et al. 2013).

Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των στεροειδών υποδοχέων, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους πυρηνικούς υποδοχείς, είναι ότι διαθέτουν την ικανότητα πρόκλησης και μη γενωμικής δράσης (εκτός από της κλασικής γενωμικής τους δράσης). Η μη γενωμική αυτή δράση περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών και καταρακτών αντιδράσεων, που οδηγούν σε άμεσες κυτταρικές αποκρίσεις. Οι μεμβρανικοί στεροειδείς υποδοχείς, συμπεριλαμβάνουν και κάποιους υπότυπους των ER και καθώς και υποδοχείς που είναι συνδεδεμένοι με G- πρωτεΐνες. Χαρακτηριστικά, οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών, υφίστανται προσδετο-επαγόμενη καταστολή. Αυτή, αντιπροσωπεύει έναν σημαντικό- από άποψη φυσιολογίας ανατροφοδοτικό μηχανισμό, που περιορίζει την ορμονική δράση στους ιστούς στόχους (Gupta et al. 2013).

Ειδικό προσδέτες για τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών, είναι οι στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες έχουν ως πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη. Διαχωρίζονται: α) σε στεροειδή του φύλου, που περιλαμβάνουν τα οιστρογόνα, την προγεστερόνη και την τεστοστερόνη με τα παράγωγά της, β) σε γλυκοκορτικοειδή και άλατοκορτικοειδή, που παράγονται από το φλοιό των επινεφριδίων και γ) σε όμοιες με τα στεροειδή ενώσεις, όπως είναι η βιταμίνη D και τα παράγωγά της, το ρετινοϊκό οξύ και τα PPARs. Η ανακύκλωση και ο καταβολισμός των στεροειδών ορμονών συμβαίνει κυρίως στο ήπαρ, αλλά και σε άλλους περιφερικούς ιστούς ή στους ιστούς δράσης της κάθε ορμόνης. Οι στεροειδείς ορμόνες εμπλέκονται στον έλεγχο του μεταβολισμού, σε λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, στο ισοζύγιο της αλατότητας και του νερού και την ανάπτυξη των φυλετικών χαρακτηριστικών. Παρ'όλα αυτά ιδιαίτερα οι στεροειδείς ορμόνες του φύλου φαίνεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη ασθενειών και πιο συχνά στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού και του προστάτη, όπου κεντρικό ρόλο διαδραματίζουν τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα αντίστοιχα.

### 1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ - Estrogen Receptors

Έχοντας ήδη κάνει μία μικρή αναφορά στους πυρηνικούς και κατόπιν στους στεροειδείς υποδοχείς, επικεντρωνόμαστε στο μείζον θέμα της παρούσης εργασίας, που είναι οι υποδοχείς των οιστρογόνων.

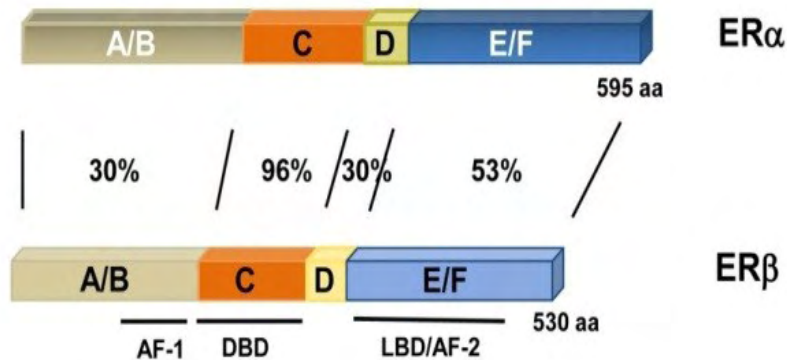
Οι υποδοχείς των οιστρογόνων, (Estrogen Receptors, ERα και ERβ), όπως προαναφέραμε, είναι πυρηνικοί υποδοχείς που έχουν δράση μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι φαίνεται ότι εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες στον ανθρώπινο οργανισμό και συνεπώς

στην παθογένεση μίας μεγάλης ποικιλίας παθολογικών καταστάσεων, όπως ο καρκίνος, μεταβολικά και καρδιαγγειακά νοσήματα, νευροεκφυλιστικές διαταραχές, φλεγμονή και οστεοπόρωση (Paterni et al. 2014). Ουσιαστικά είναι εκείνοι, οι οποίοι διαμεσολαβούν, προκειμένου να μεταβιβαστεί το μήνυμα που φέρουν τα οιστρογόνα, κατά την οιστρογονική σηματοδότηση.

### 1.3.1 Υποδοχείς Οιστρογόνων-ERα και ERβ και ισομορφές αυτών

Οι υποδοχείς των οιστρογόνων, έχουν εντοπισθεί σε δύο κύριους υπότυπους: στον υποδοχέα των οιστρογόνων τύπου α (Estrogen Receptor alpha, ERα, NR3A1) και στον υποδοχέα των οιστρογόνων β (Estrogen Receptor beta, ERβ, NR3A2). Και οι δύο τύποι των υποδοχέων, περιέχουν ορισμένες εξελικτικά συντηρημένες, δομικές και λειτουργικές περιοχές. Η κεντρική και περισσότερο συντηρημένη περιοχή είναι η DBD (DNA-binding domain), η οποία είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και πρόσδεση του υποδοχέα στο DNA. Μία εξίσου σημαντική περιοχή είναι η περιοχή LBD, η οποία και εντοπίζεται στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πρωτεΐνης και είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του προσδέτη στον υποδοχέα. Το αμινο-τελικό άκρο, δεν είναι συντηρημένο και αποτελεί το πιο πολυποίκιλο τμήμα, τόσο σε μήκος όσο και σε αμινοξική αλληλουχία. (Heldring et al. 2007). Η μεταγραφική ενεργοποίηση του υποδοχέα διευκολύνεται από δύο διακριτές περιοχές ενεργοποίησης, την AF-1 ( Activation Functions 1), η οποία βρίσκεται στο N-τελικό άκρο και είναι ιδιόσυστατα ενεργή και την AF-2, που εντοπίζεται στο LBD του C-τελικού άκρου του υποδοχέα και είναι προσδετοεξαρτώμενη. Η περιοχή AF2, περιλαμβάνει μία υψηλά συντηρημένη έλικα (H12) η οποία είναι απαραίτητη για την εξαρτώμενη από τον προσδέτη μεταγραφική ενεργότητα ολόκληρου του υποδοχέα, αλλά και την αλληλεπίδρασή του με άλλους συνενεργοποιητές που ανήκουν στην οικογένεια steroid receptor coactivator (SRC) (Hall et al. 2001). Και οι δύο AF περιοχές στρατολογούν στον υποδοχέα ένα σύνολο συνρυθμιστικών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. (Heldring et al. 2007).

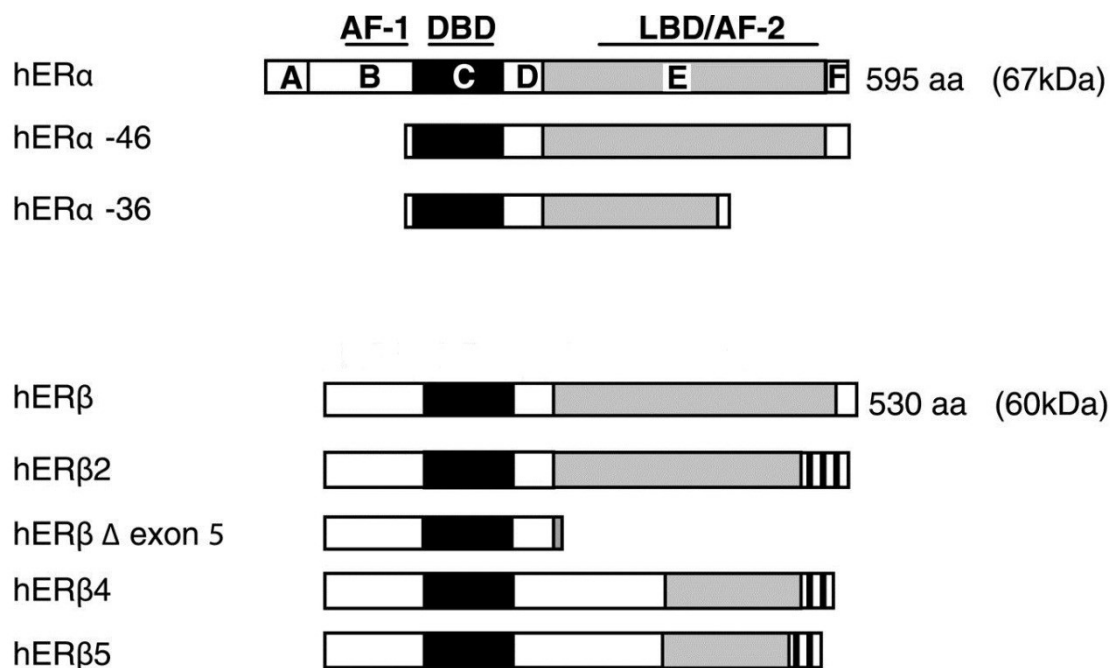
Τόσο ο ERα όσο και ο ERβ μοιράζονται υψηλό βαθμό αλληλουχικής ομοιότητας- εκτός από τις περιοχές του N-τελικού τους άκρου. Επίσης, και οι δύο υποδοχείς δεσμεύονται στα ίδια στοιχεία του γενετικού υλικού (EREs) και έχουν παρόμοια συγγένεια για την 17-β οιστραδιόλη (E2), το πιο ισχυρό οιστρογόνο που παράγεται στο ανθρώπινο σώμα.



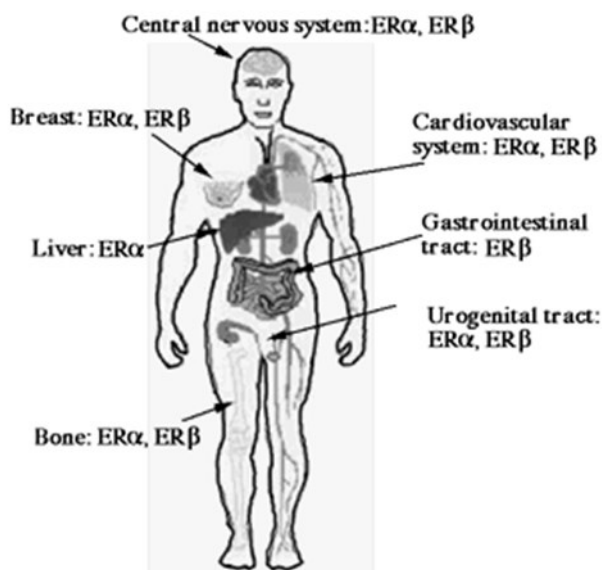
**Σχηματική αναπαράσταση της δομής των δύο τύπων των οιστρογονικών υποδοχέων.** Και οι δύο τύποι των υποδοχέων των οιστρογόνων περιλαμβάνουν τις περιοχές DBD, LBD και τις δύο περιοχές ενεργοποίησης της μεταγραφής AF-1 και AF-2. Το μήκος του ERα είναι 595 α.α., ενώ του ERβ είναι 530 α.α. Τα ποσοστά που αναγράφονται στην εικόνα εκφράζουν την επί τοις εκατό ομοιότητα των αλληλουχιών των δύο υποδοχέων.

Οι οιστρογονικοί υποδοχείς κωδικοποιούνται από ξεχωριστά γονίδια, τα ESR1 και ESR2, για τους ERα και β αντίστοιχα, τα οποία και εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (6 και 14 αντίστοιχα) (Degeo et al. 2006). Παράλληλα, έχει περιγραφεί μία μεγάλη ποικιλία από εναλλακτικά μετάγραφα, που οδηγούν σε διαφορετικά mRNA και για τους δύο τύπους υποδοχέων, αλλά δεν είναι γνωστό το πότε εκφράζονται ως λειτουργικές πρωτεΐνες με βιολογική λειτουργία. Τα εναλλακτικά μετάγραφα του ERα οδηγούν σε μικρότερες ισομορφές του, στερούνται την περιοχή AF-1 αμινοτελικού άκρου, αλλά δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα στους ιστούς. Παρόλα αυτά, επειδή όλα αυτά τα εναλλακτικά μετάγραφα συνήθως συνεκφράζονται μαζί με τον υποδοχέα αγρίου τύπου, ο ρόλος τους στην παθοφυσιολογία βρίσκεται υπό συνεχή διερεύνηση. Αντίθετα με τον ERα, έχουν περιγραφεί ισομορφές του ERβ, οι περισσότερες των οποίων εκφράζονται στους ιστούς ως πρωτεΐνες και μπορούν να ρυθμίσουν διαφορετικά την οιστρογονική σηματοδότηση (Heldring et al. 2007).





**Σχηματική αναπαράσταση της δομής των ERα, ERβ και των ισομορφών τους.** Και οι δύο μικρότερες ισομορφές του ERα, hERα -46 και hERα -36 στερούνται την περιοχή AF-1 του αμινοτελικού άκρου. Το πολυπεπτίδιο, που αποτελείται από 530 α.α, θεωρείται ως ο αγρίου τύπου και με πλήρες μήκος, υποδοχέας ERβ. Να σημειωθεί ότι η έλλειψη του εξωνίου 5, που οδηγεί στην ισομορφή hERβ Δ exon 5, έχει ως αποτέλεσμα τον τερματισμό της πρωτεΐνης πριν την περιοχή LBD. Τέλος, τα ριγέ μοτίβα στο 3' άκρο των hERβ2, hERβ4 και hERβ5 υποδηλώνουν τα εναλλακτικά καρβοξυ-τελικά άκρα αυτών των ισομορφών.



**Κατανομή των υποδοχέων των οιστρογόνων στους ιστούς του ανθρώπινου σώματος**  
[www.bio.cmu.org](http://www.bio.cmu.org)

### 1.3.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERS

#### A) ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ (GENOMIC ACTION) :

##### 1. ΚΛΑΣΙΚΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERS, ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΕΤΗ

Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό σηματοδότησης, όταν η ορμόνη (δηλαδή ο προσδέτης) απουσιάζει από το κύτταρο, ο υποδοχέας μένει στον πυρήνα του κυττάρου ανενεργός και συνδεδεμένος με κάποιο από τα πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα απενεργοποίησης των υποδοχέων αυτών. Μόλις η ορμόνη εμφανιστεί και συνδεθεί με τον υποδοχέα, λαμβάνουν χώρα κάποιες αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του. Η ενεργοποίηση αυτή, συνεπάγεται τον ομοδιμερισμό του και τελικά, την αύξηση της συγγένειάς του με συγκεκριμένες περιοχές στο γενετικό υλικό. Οι περιοχές αυτές είναι cis- δραστικά στοιχεία και στην περίπτωση των ERs, ονομάζονται EREs (Estrogen Response Elements). Η πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα στα ρυθμιστικά αυτά στοιχεία του DNA, προκαλεί, τελικώς, τη μεταγραφή ή καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου που φέρει το ERE.

Οι ενεργοποιημένοι, από την ορμόνη, υποδοχείς που προσδέονται στα EREs, έρχονται σε επαφή με την γενική μεταγραφική συσκευή είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω πρωτεϊνών που λειτουργούν ως συμπαράγοντες, εκ των οποίων πολλές έχουν ταυτοποιηθεί, συμπεριλαμβανομένης της steroid receptor coactivator-1 (SRC – 1) , glutamate receptor interacting protein 1 (GRIP1) , Aib 1 (amplified in breast 1) ή αλλιώς nuclear receptor coactivator 3 (NCOA 3) , της CREB-binding protein (CBP) / p300, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 (PGC-1) και της P68 ελικάσης RNA. Είναι γενικά αποδεκτό, ότι οι αλληλεπιδράσεις των ERs με τους συνενεργοποιητές τους, σταθεροποιούν το σχηματισμό ενός συμπλόκου προένραξης της μεταγραφής, που διευκολύνει την απαραίτητη αποδιοργάνωση της χρωματίνης στα EREs . Ανάλογα τον κυτταρικό τύπο και τον υποκινητή, οι υποδοχείς ασκούν, είτε θετική είτε αρνητική επίδραση στην έκφραση του γονιδίου στόχου (η επίδραση συνήθως, είναι επαγωγική).

Αυτού του τύπου η μεταγραφική ενεργότητα του ER, διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση των περιοχών AF-1 και AF-2. Η λειτουργία των περιοχών AF, έχει συνεργατική δράση στους περισσότερους προσδετο-ενεργοποιούμενους μηχανισμούς, αλλά ίσως να δρα και ανεξάρτητα σε συγκεκριμένα κύτταρα ή υποδοχείς (Hall et al. 2001).

## 2. ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΑΠΟ ΕΡΕ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Εκτός από την κλασική γενωμική δράση των υποδοχέων των οιστρογόνων υπάρχουν και μία σειρά ακόμη δράσεων που σχετίζονται με τη γενωμική δράση των υποδοχέων, παρεκκλίνοντας όμως από τον κλασικό μηχανισμό. Έχει δειχθεί ότι η δράση των ERs, μπορεί να λάβει χώρα και μέσω της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης- πρωτεΐνης, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο μεταγραφικών παραγόντων, το οποίο και αλληλεπιδρά εν τέλει με το γενετικό υλικό. Με την ικανότητά τους αυτή, οι ERs μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση, ενός μεγάλου αριθμού οιστρογονο-εξαρτώμενων γονιδίων, που όμως δεν περιέχουν EREs. Αυτή η επικοινωνία των μεταγραφικών παραγόντων, αναφέρεται ως «μεταγραφικό cross talk». Παραδείγματα τέτοιου είδους «συνεργασίας» μεταξύ μεταγραφικών παραγόντων είναι: η ενεργοποίηση αρκετών γονιδίων από την E2, μέσω της αλληλεπίδρασης του ER με τους μεταγραφικούς παράγοντες c-Fos και c-Jun, μέσω του μονοπατιού AP-1. Έχουν εντοπισθεί περισσότεροι τους ενός τρόποι αλληλεπίδρασης του ER με το AP-1 μονοπάτι. Η σύνδεση, λοιπόν μπορεί να γίνεται είτε με τη συμμετοχή των περιοχών πρόσδεσης AF-1 και AF-2, είτε όχι (Kushner, et al. 2000). Σε αυτά τα γονίδια που ρυθμίζονται μεταγραφικά από αυτόν τον μηχανισμό, ανήκουν και: το γονίδιο IGF-1 (Insulin Like Growth Factor-1), τα γονίδια των κολλαγόνων και της κυκλίνης D1. Επιπλέον, μέσω της μεταγραφής που εξαρτάται από AP-1, υπάρχει και η περίπτωση κατασταλτικής δράσης, ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το γονίδιο χολιν-ακετυλο τρανσφεράσης (συμμετοχή στη βιοσύνθεση της ακετυλοχολίνης των ακετυλοχολινεργικών νευρώνων).

Εκτός του μονοπατιού AP-1, υπάρχουν και άλλα παρεμφερή μονοπάτια που σχετίζονται με αυτού του είδους. Συγκεκριμένα, τα γονίδια που έχουν περιοχές πλούσιες σε GC, μπορούν και αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα των οιστρογόνων μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Sp1.

Τέλος, σημαντική πληροφορία, αποτελεί και το γεγονός της καταστολής του γονιδίου της IL-6 από την E2, μέσω αλληλεπίδρασης του ER με δύο μεταγραφικούς παράγοντες: τους NF-κΒ και CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBPs).

## 3. ΜΗ ΠΡΟΣΔΕΤΟ-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ER, ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΕ ΤΟΝ ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Σε αντίθεση με την ενεργοποίηση του υποδοχέα από την ορμόνη, είναι επίσης πιθανό ο υποδοχέας των οιστρογόνων να ενεργοποιηθεί μέσω εξωκυτταρικών σημάτων χωρίς την ύπαρξη E<sub>2</sub>. Αυτά τα δεδομένα, στηρίζονται στο γεγονός ότι κάποιοι πεπτιδικοί αυξητικοί

παράγοντες, όπως ο EGF και ο IGF-1, όπως και το κυτταρικό ανάλογο 8-βρωμο-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, έχουν την ικανότητα να διαμεσολαβούν στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του ER και τελικά να αυξάνουν την έκφραση των γονιδίων στόχων του. Αν και όλα αυτά τα δεδομένα έχουν αποδειχτεί πειραματικά *in vivo*, ακόμη ο βιολογικός ρόλος αυτής της ικανότητας ενεργοποίησης των υποδοχέων αυτών με τέτοιο τρόπο, δεν είναι πλήρως σαφής. Ενδεχομένως, να χρησιμοποιείται για την μεταγραφή των γονιδίων αυτών στις περιπτώσεις χαμηλής συγκέντρωσης E2, όπως υπάρχει στους άνδρες (Hall et al. 2001).

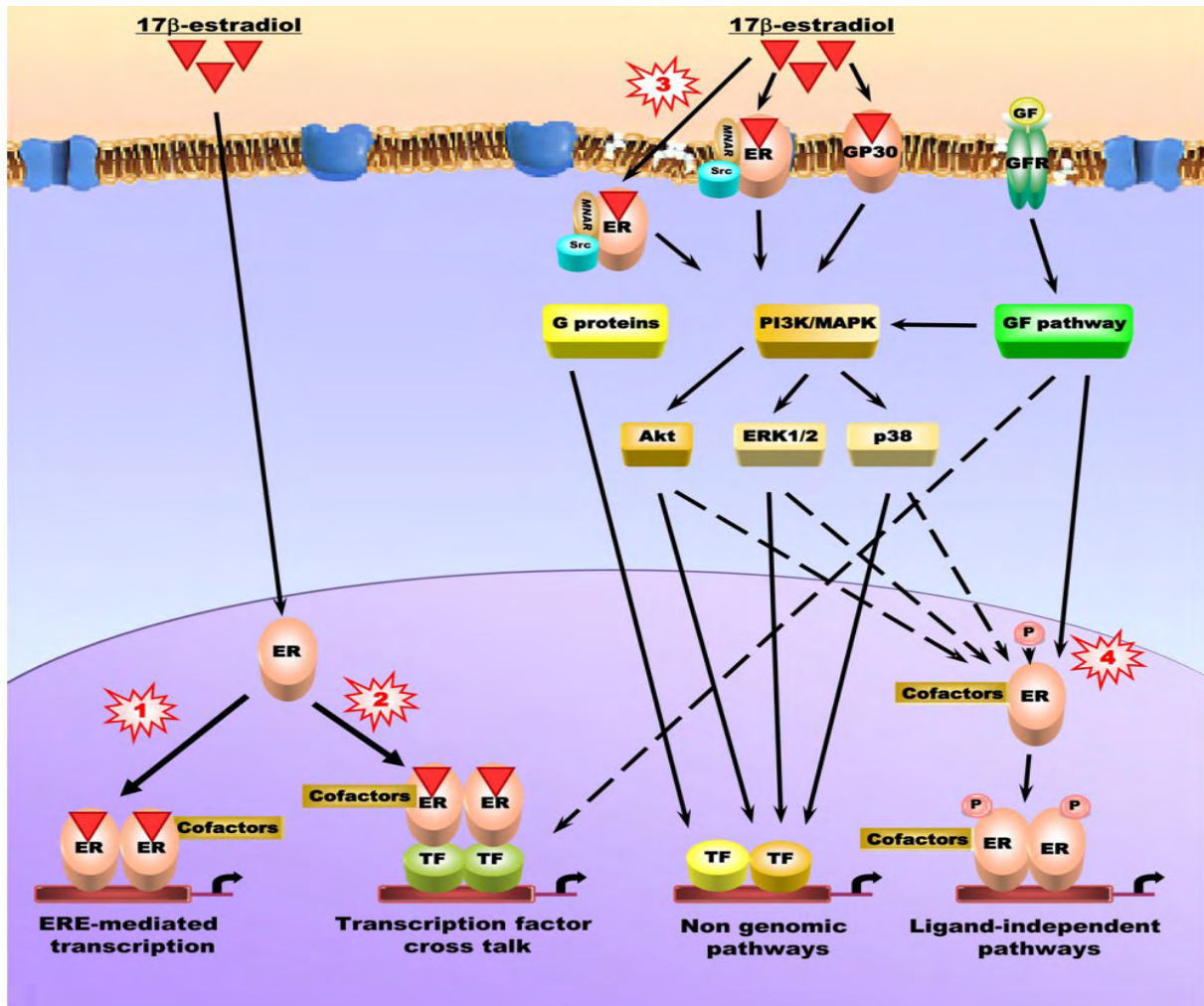
#### B) ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ (NON- GENOMIC ACTION):

Οι μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων σχετίζονται με κυτταρικές αποκρίσεις (στο οιστρογονικό σήμα), που όμως είναι πάρα πολύ γρήγορες για να έχουν προκύψει από το μονοπάτι της μεταγραφής- μετάφρασης. Τέτοιες δράσεις είναι για παράδειγμα, όλες οι γρήγορες αποκρίσεις που συμβαίνουν στα οστά, στο νευρικό σύστημα, στην αγγείωση και στους μαστούς (Hall et al. 2001). Οι μη γενωμικές δράσεις λοιπόν, είναι κοινό χαρακτηριστικό των στεροειδών ορμονών και συχνά σχετίζονται με ενεργοποίηση διάφορων μονοπατιών πρωτεϊνικών κινασών.

Η μη γενωμική δράση της E2 φαίνεται να περιλαμβάνει την κίνηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης με σκοπό την παραγωγή cAMP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, στο ενδοκυτταρικό καταρράκτη μεταγωγής του σήματος, να ενεργοποιηθεί η σηματοδότηση δια μέσου MAPK. Ένα άλλο μονοπάτι που ενεργοποιείται, είναι αυτό της PI3-κινάσης (σε ενδοθηλιακά, καρκινικά κύτταρα του μαστού και ηπατοκύτταρα). Τέλος, οι μη γενωμικές αυτές δράσεις λαμβάνουν χώρα με την ενεργοποίηση διαφορετικών ισομορφών των ERs, οι οποίοι εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη και είναι συνήθως συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (GPR30). (Bjornstrom et al. 2005)

Μερικές από τις μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων περιλαμβάνουν:

- Την αγγειοπροστατευτική δράση της E2, δια μέσω του ER και της ενεργοποίησης της διφασικής ενεργοποίησης της ενδοθηλιακής NOS (eNOS) από τα οιστρογόνα μέσω του μονοπατιού MAPK και PI3K/Akt (Jeffrey R. Bender et al.).
- Την εμπλοκή στον πολλαπλασιασμό και την αντιαποπτωτική δράση στους οστεοβλάστες και οστεοκλάστες δια μέσω και πάλι του μονοπατιού των MAP κινασών (Hall et al. 2001).



Οι διάφοροι μηχανισμοί δράσης της οιστραδιόλης και της σηματοδότησης μέσω υποδοχέων οιστρογόνων. Το βιολογικό αποτέλεσμα της οιστραδιόλης, διαμεσολαβείται από τουλάχιστον τέσσερα μονοπάτια του υποδοχέα των οιστρογόνων. Μονοπάτι 1-κλασικός τρόπος σηματοδότησης εξαρτώμενος από τον προσδέτη: Οι ενεργοποιημένοι από την  $E_2$  υποδοχείς, προσδένονται ειδικά στα EREs, στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων. Μονοπάτι 2- μη κλασικός τρόπος σηματοδότησης-ανεξάρτητος από την πρόσδεση στα EREs: Οι υποδοχείς που έχουν ενεργοποιηθεί από την  $E_2$ , αλληλεπιδρούν με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι NF- $\kappa$ B, Sp-1, (AP)-1, σχηματίζοντας σύμπλοκα που μεσολαβούν στην μεταγραφή γονιδίων, των οποίων οι υποκινητές δεν φέρουν EREs. Μονοπάτι 3- μη γενωμική δράση: Οι ERs και GP30 εντοπισμένοι κοντά ή πάνω στην κυτταρική μεμβράνη μπορούν να προκαλέσουν γρήγορη απόκριση ενεργοποιώντας τα μονοπάτια P13K/Akt ή και PKC/MAPK. Μονοπάτι 4- προσδετοανεξάρτητος τρόπος σηματοδότησης (cross talk): Οι ERs διεγείρονται από αυξητικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα ο IGF-1, μέσω φωσφορυλίωσης, με αποτέλεσμα την έκφραση γονιδίων στόχων των υποδοχέων. Roman-Blas et al. (Arthritis Research & Therapy 2009)

### Γ) ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην ομαλή λειτουργία των κυττάρων και συνεπώς ολόκληρου του οργανισμού. Αυτά τα οργανίδια, είναι γνωστό ότι διαθέτουν μία

εξαιρετική ιδιότητα: έχουν το δικό τους γενετικό υλικό (mtDNA). Το μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί για κάποιες από τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τα μιτοχόνδρια, όπως αυτές που αποτελούν τις υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας, αλλά κάποιες άλλες πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό DNA. Οι βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν περιλαμβάνουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση, το οξειδωτικό στρες και την απόπτωση. Μάλιστα, δεν είναι λίγα τα νοσήματα, τα οποία σχετίζονται με μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες, ορισμένα από τα οποία είναι και ιδιαίτερα σοβαρά, όπως διάφορες νευρομυοπάθειες, κάποιες μορφές σακχαρώδους διαβήτη συνδυαζόμενες με κώφωση, εγκεφαλοπάθειες και λοιπά. (A. Razmara et al. 2008)

Η σηματοδότηση μέσω οιστρογόνων, φαίνεται πως διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην έκφραση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, από το DNA του πυρήνα (Pedram et al.2006). Είναι γνωστό, ότι οι υποδοχείς των οιστρογόνων εντοπίζονται και εντός των μιτοχονδρίων, μετατοπιζόμενοι σε αυτά ύστερα από μία σειρά ερεθισμάτων. Για παράδειγμα, τόσο ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) όσο και υποδοχέας των οιστρογόνων (ER) μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια και ρυθμίζουν την επαναπρόσληψη του  $Ca^{2+}$  και την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS). Αναλογιζόμενοι δε, το αποτέλεσμα της μη ελεγχόμενης παραγωγής τόσο του ασβεστίου όσο και των ROS, αντιλαμβανόμαστε τη δυνητική δράση των υποδοχέων αυτών στα γεγονότα της απόπτωσης και στην προστασία από το οξειδωτικό στρες. Αν και ακόμη δεν γνωρίζουμε επακριβώς τους μηχανισμούς μέσω των οποίων όλα αυτά πραγματοποιούνται, εντούτοις φαίνεται πως η οιστραδιόλη αποτελεί έναν ακόμα σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα για την ομαλή λειτουργία των μιτοχονδρίων. Η  $E_2$  προσδέεται στους υποδοχείς οιστρογόνων (ιδιαίτερα στον ERβ), που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια και έτσι επιτυγχάνεται η απευθείας ρύθμιση της μεταγραφής του μιτοχονδριακού DNA, με μηχανισμούς όμοιους με αυτούς των πυρηνικών υποδοχέων καθώς επίσης ενδεικτική είναι και η κατασταλτική τους δράση έναντι της παραγωγής ROS. (Picard et al.2014).

Τέλος, ένα ιδιαίτερα σημαντικό μιτοχονδριακό ένζυμο που εμπλέκεται στην σηματοδότηση των οιστρογόνων και στην επίδρασή τους, είναι η μιτοχονδριακή μαγγανική δισμουτάση σουπεροξειδίου, MnSOD, η οποία έχει εμφανιστεί να αυξάνεται με τη χρόνια επίδραση των οιστρογόνων, εξηγώντας έτσι την επίδραση των οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια και την αντιοξειδωτική τους δράση, σε μοριακό επίπεδο (Pedram et al.2006).

### 1.3.3 ΣΥΝΔΕΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΜΕ ΤΟ ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ: ΕΝΑΣ ΝΕΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος έχουν τη δυνατότητα να συνδέουν τις μη γενωμικές με τις γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων. Η δράση πολλών μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλιώσεων, που πραγματοποιούνται από κινάσες. Σημαντικοί μεταγραφικοί

παράγοντες, που ρυθμίζονται μέσω φωσφορυλίωσης από τις MAPK είναι ο Elk-1, C/EBP και ο CREB, μία πρωτεΐνη που προσδένεται στα στοιχεία CRE (cAMP response elements). Σε αυτό το μονοπάτι μεταγωγής σήματος, λαμβάνουν χώρα δύο πολύ βασικές διαδικασίες: 1) η φωσφορυλίωση της Elk-1, η οποία εξαρτάται από την οιστραδιόλη και 2) η ενεργοποίηση των στοιχείων SRE (serum response elements), από έναν μηχανισμό που εξαρτάται από τους ERs και περιλαμβάνουν την δράση των MAPK. Ουσιαστικά, οι μεταγραφικοί παράγοντες C/EBP και CREB φωσφορυλιώνονται από μία MAPK, η οποία προηγουμένως έχει ενεργοποιηθεί από την οιστραδιόλη και οδηγούν στην μεταγραφή γονιδίων που έχουν CREs. Φυσιολογικά, εκτός από τις διαμεσολαβούμενες από τις MAPKs φωσφορυλίώσεις, ο CREB είναι στόχος φωσφορυλίωσης της cAMP/ πρωτεϊνικής κινάσης A, γνωστή και ως PKA. Παρά όλα αυτά, ο μεταγραφικός αυτός παράγοντας ενδεχομένως να ενεργοποιείται και από την οιστραδιόλη μέσω της επαγόμενης παραγωγής cAMP (Bjornstrom and Sjoberg, 2005).

Συμπερασματικά, λοιπόν, σε αυτού του τύπου cross-talk των μηχανισμών δράσης των υποδοχέων των οιστρογόνων, αντιλαμβανόμαστε την μεγάλη επίδραση της σηματοδότησης της οιστραδιόλης σε μία μεγάλη ποικιλία γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων, πλέον, και των γονιδίων που έχουν CREs.

#### 1.3.4 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Β- ERB

Ο ERβ κωδικοποιείται από το γονίδιο ESR2, το οποίο εντοπίζεται στη χρωμοσωμική θέση 14q22-24 (Koutsilieris et al. 2014). Η ισομορφή αυτή του υποδοχέα των οιστρογόνων, ανακαλύφθηκε το 1996 και έκτοτε προξενεί μεγάλο ενδιαφέρον για τους ρόλους και τη δράση του (Deroo and Buensuceso, 2010). Από άποψη δράσης, οι δύο ισομορφές των οιστρογονικών υποδοχέων, μπορούν να δημιουργήσουν ετεροδιμερή, όταν συνεκφράζονται. Αυτό που όμως είναι σημαντικό, είναι η ικανότητα που έχει ο ERβ να τροποποιεί την μεταγραφική ενεργότητα του ERα. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί, ότι ο ERβ καταστέλλει τη δράση του ERα, στους υποδοχείς των γονιδίων εκείνων, που περιέχουν περιοχές AP-1 και CRE. Ένα τέτοιο γονίδιο είναι και αυτό της κυκλίνης D1. Τοπολογικά, μέσα στο κύτταρο, ομοίως με τον ERα, εντοπίζεται στην πυρηνική του μορφή, αλλά και στη μεμβρανική. Τέλος, ο ERβ εντοπίζεται και στα μιτοχόνδρια, λόγω μετατόπισης του πυρηνικού ή μεμβρανικού υποδοχέα. (Hodges-Gallagher et al. 2008)

Γενικά, ο ERβ έχει παρόμοιο μηχανισμό δράσης με τον ERα. Παράλληλα, έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, (cross talk), έχοντας επίδραση στη μεταγραφή διάφορων γονιδίων. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας αλληλεπίδρασης, είναι η επίδραση που έχει ο ERβ, στη σηματοδότηση του NFκ-B. Ουσιαστικά, ο ERβ, έχει αρνητική επίδραση ως προς τη μεταγραφική ενεργότητα του NFκ-B, αποτρέποντας τη δράση του. Η αρνητική αυτή επιρροή του ERβ είναι προσδετοεξαρτώμενη. Παράλληλα δε, η σχέση αυτή μεταξύ ERβ και NFκ-B, είναι αμφίπλευρη, εφόσον έχει αποδειχθεί, πως και ο NFκ-B μπορεί να περιορίσει- αποτρέψει τη δράση του ERβ (Deroo and Buensuceso, 2010).

Αγωνιστές του ERβ, μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση του mRNA του γονιδίου της υδροξυλάσης 1 της τρυπτοφάνης (βιοσύνθεση και μεταβολισμός της σεροτονίνης) στα κύτταρα των πυρήνων της ραφής (αρχή σεροτονεργικών νευρώνων), αυξάνοντας ουσιαστικά την σεροτονεργική δραστηριότητα και έχοντας κατ' επέκταση αντικαταθλιπτικά αποτελέσματα. Επιπλέον οι υποδοχείς της σεροτονίνης ρυθμίζονται από τα οιστρογόνα με ένα τρόπο άμεσα εξαρτώμενο από τον ERβ (Prasenjtit Dey, et al. 2013).

Από φαρμακολογικής άποψης, έχει δειχθεί ότι ο ERβ ενισχύει την αντιοιστρογονική δράση ευρέως χορηγούμενων αντιοιστρογόνων (ταμοξιφένη, ραλοξιφένη), ελέγχοντας αποπτωτικούς μηχανισμούς και τον κυτταρικό κύκλο (Hodges-Gallagher et al. 2008). Συγκεκριμένα, όσον αφορά το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, ο ERβ, αποτελεί έναν σημαντικό διαμεσολαβητή της οιστρογονικής δραστηριότητας, αποτελώντας έναν πολλά υποσχόμενο φαρμακευτικό στόχο για την καλύτερη αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών και νευρολογικών παθήσεων όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS), η νόσος Πάρκινσον (PD), η νόσος Αλτςχάιμερ (AD) και κάποιες διατροφικές διαταραχές (Dey, et al. 2013).

Οι ERs εμπλέκονται στην αιτιολογία ή/και στην εξέλιξη καρκίνων σε διάφορους ιστούς, όπως είναι ο καρκίνος του μαστού, των πνευμόνων, των ωοθηκών και του προστάτη. Σε τέτοιου είδους περιπτώσεις, ο ERβ, συνήθως έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο σε αντίθεση με τον ERα που ο ρόλος του είναι ογκογενετικός. Πιο συγκεκριμένα, ο ERβ, ρυθμίζει γονίδια σε κάποια μονοπάτια-κλειδιά, τα οποία εμπλέκονται στην καταστολή των όγκων (p53, PTEN), στον μεταβολισμό (PI3K), στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (cMyc, cyclin E) και στην προστασία από τις δραστικές ενώσεις οξυγόνου ROS. (Prasenjtit Dey, et al. 2013).

Από κλινικής άποψης, ο ERβ αποτελεί προγνωστικό δείκτη για τις πρότυπες ενδοκρινικές θεραπείες που εφαρμόζονται σε ορμονοεξαρτώμενους -συνήθως γυναικολογικούς καρκίνους, όπως είναι η ταμοξιφένη. Επιπλέον, ο υποδοχέας αυτός, θεωρείται ότι έχει «αντι-πολλαπλασιαστικά» αποτελέσματα σε ένα μεγάλο εύρος καρκινικών μοντέλων, μεταξύ των οποίων και το γλοίωμα (Manente et al. 2013). Ακόμη, αποτελεί έναν δυνητικό στόχο για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις και στρατηγικές για την καταπολέμηση της ενδοκρινικής αντίστασης που εμφανίζεται έπειτα από συνεχόμενη χορήγηση ταμοξιφένης (Hodges-Gallagher et al. 2008).

### 1.3.5 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Γενικά οι υποδοχείς των οιστρογόνων, τόσο ο α- όσο και ο β- φαίνεται να επηρεάζουν τον εγκέφαλο με διάφορους τρόπους. Αυτό που έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όμως, είναι ότι και οι δύο τύποι υποδοχέων, **εμφανίζονται να έχουν νευροπροστατευτική δράση.** (Raval et al. 2013).

Στον παρακάτω πίνακα, φαίνεται η κατανομή των υποδοχέων των οιστρογόνων α- και β- στον εγκέφαλο, καθώς και του ορφανού υποδοχέα GPR30, ενός μεμβρανικού υποδοχέα συνδεδεμένου με G πρωτεΐνες, οποίος προκαλεί γρήγορη οιστρογονική, μη -γενωμική δράση ανεξάρτητα από τους κλασικούς υποδοχείς των οιστρογόνων α και β. Επιπλέον, παρουσιάζεται



και ο ER-X, μία κατά κύριο λόγο εμβρυική μορφή του ER που είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη στους ενήλικες (Cui et al. 2013).

ER subtypes	Distribution in the brain (b)			
	intense	moderate	Weak	absent
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Amygdala, bed nucleus of the stria terminals. Periaqueductal grey, preoptic area	Allocortex, hypothalamus. Locus coeruleus, spinal trigeminal nucleus	Hippocampus, raphe nuclei, zona incerta	Anterior tegmental nucleus, cerebellum, globus pallidus, inferior olive nucleus, isocortex, pontine nuclei, thalamus, substantial nigra, superior olive nucleus, ventral tegmental area
<b>ER<math>\beta</math></b>	Amygdala, bed nucleus of the stria terminals, raphe nuclei, substantial nigra	Allocortex, globus pallidus, hippocampus. Locus coeruleus, preoptic area, ventral tegmental area	Anterior tegmental nucleus, hypothalamus, inferior olive nucleus, isocortex, periaqueductal gray, pontine nuclei, spinal trigeminal nucleus, superior olive nucleus, thalamus	Cerebellum, zona incerta
<b>GPR30</b>	Allocortex, anterior, tegmental nucleus, cerebellum, hippocampus, hypothalamus, isocortex, locus coeruleus, pontine nuclei, preoptic area, spinal trigeminal nucleus, superior olive nucleus	Periaqueductal gray	Amygdala, bed nucleus of the stria terminals, raphe nuclei, substantial nigra (reticular)	Ventral tegmental area
<b>ER-X</b>	Enriched in the fetal baboon brain and the neocortex of the postnatal rodent, almost undetectable in the normal adult			

### 1.3.6 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Β (ERβ ) ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

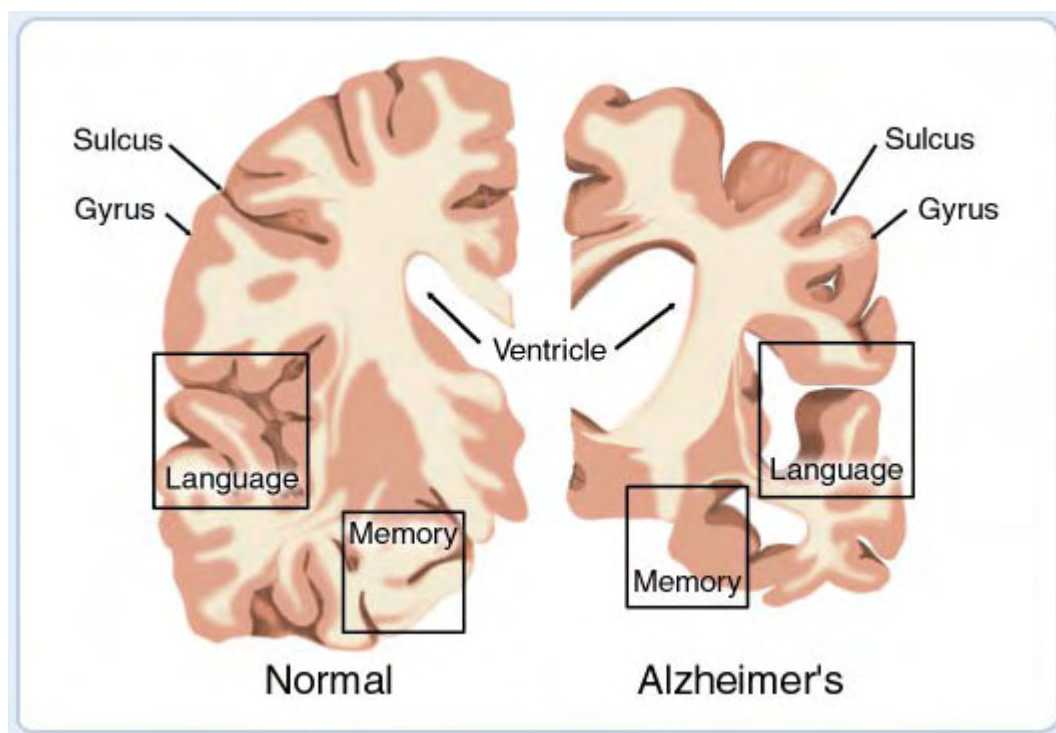
Όπως ήδη προαναφέρθηκε, οι υποδοχείς των οιστρογόνων παίζουν έναν αρκετά σημαντικό ρόλο στη σωστή λειτουργία του εγκεφάλου, του νευρικού συστήματος αλλά και ολόκληρου του οργανισμού. Συνεπώς, οποιαδήποτε διαταραχή στη συγκέντρωσή τους, ή παντελή έλλειψή τους, θα παίζει καίριο ρόλο στην εμφάνιση ασθενειών. Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία ασχοληθήκαμε κυρίως με τη δράση των οιστρογόνων και τις διακυμάνσεις διάφορων μορίων σε σχέση με την παρουσία ή όχι οιστρογόνων, και μορίων με πιθανή οιστρογονική δράση σε νευρικά κύτταρα, επομένως το ενδιαφέρον μας επικεντρώνεται στη συμμετοχή του ERβ (κυρίως) σε επαγωγή νευροεκφυλισμού.

Στις νευροεκφυλιστικές διαταραχές, ένας από τους μηχανισμούς προόδου και βλάβης των υγιών νευρώνων, σε μία περιοχή όπου υπάρχουν ήδη αλλοιώσεις, είναι η υπερενεργητικότητα της μικρογλοίας. Τα κύτταρα της μικρογλοίας είναι υπεύθυνα για τον εντοπισμό και τη θανάτωση ασθενικών ή ξένων κυττάρων, εκκρίνοντας κυτοκίνες. Κατά τη διαδικασία αυτή είναι πολύ πιθανό να βλαφτούν και υγιή κύτταρα. Σημαντικό είναι δε, να αναφερθεί ότι ο ERβ και όχι ο ERα εκφράζεται στη μικρογλοία και οι ειδικοί για τον ERβ προσδέτες μπορούν να αποτρέψουν την ενεργοποίηση των μικρογλοϊκών κυττάρων, την έκκριση κυτοκινών και κατ' επέκταση την φλεγμονή και ενδεχόμενη καταστροφή του νευρικού ιστού (Dey et al. 2013).

Η νόσος Alzheimer (AD), είναι μία νευροεκφυλιστική διαταραχή, η οποία αποτελεί τη Νο1 αιτία άνοιας παγκοσμίως. Η παθογένειά της αφορά πρωτίστως την πρόδρομη πρωτεΐνη του β-αμυλοειδούς (APP), η οποία πρωτεολύεται παράγοντας πεπτίδια με νευροτροφική και νευροπροστατευτική δράση. Όμως, από την πρωτεόλυση της πρωτεΐνης εντός του ενδοπλασματικού δικτύου, ή του cis-Golgi, παράγεται από το καρβοξυτελικό της άκρο ένα πεπτίδιο μήκους 42 ή 43 αμινοξέων (**Aβ<sub>42/43</sub>**). Το πεπτίδιο αυτό δημιουργεί συσσωμάτια και είναι νευροτοξικό in vitro πιθανώς και in vivo. Οι ασθενείς με νόσο Alzheimer εμφανίζουν στον εγκέφαλό τους σημαντική αύξηση συσσωματωμάτων του πεπτιδίου Aβ<sub>42/43</sub>. Μια άλλη πρωτεΐνη, της οποίας η συμμετοχή στην παθογένεια της νόσου έχει επιβεβαιωθεί, είναι η **APOE**, όμως ο μηχανισμός που τα συνδέει δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Στα νευροπαθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου περιλαμβάνονται η δημιουργία των εξωκυττάρων νευριτικών (αμυλοειδών) πλακών, τα ενδοκυττάρια νευροϊνιδιακά δεμάτια (NFT) και οι εναποθέσεις αμυλοειδούς στα τοιχώματα των

εγκεφαλικών αρτηριών. Οι αμυλοειδείς πλάκες περιέχουν πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες, εκ των οποίων οι σημαντικότερες είναι το πεπτίδιο Αβ<sub>42/43</sub> και η απολιποπρωτεΐνη Ε (ΑΡΟΕ). Τα νευροϊνιδιακά δεμάτια συντίθενται κυρίως από υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau, η οποία φυσιολογικά συμμετέχει στη διατήρηση της νευρωνικής ακεραιότητας, στην αξονική μεταφορά και πολικότητα, προάγοντας την συναρμολόγηση και τη σταθερότητα των μικροσωληνίσκων. Τέλος, παρατηρείται μεγάλος εκφυλισμός των συνάψεων και των νευρώνων που σχετίζονται με χολινεργική δραστηριότητα. Σε μακροσκοπικό επίπεδο, ως αποτέλεσμα του σταδιακού νευροεκφυλισμού, παρατηρείται ατροφία του φλοιού του εγκεφάλου και διερεύνηση των αυλάκων.

Αναφορικά με την κλινική εικόνα, η νόσος Alzheimer χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια της μαθησιακής λειτουργίας συμπεριλαμβανομένης της πρόσφατης μνήμης, του αφαιρετικού συλλογισμού, της συγκέντρωσης, του λόγου, της οπτικής αντίληψης και της παραστατικής λειτουργίας στον χώρο. (Ιατρική Γενετική, Thomson & Thomson, R.L. Nussbaum, R.R. McInnes, H.F. Willard)



**Αναπαράσταση και συγκριτική απεικόνιση υγιούς εγκεφάλου σε σχέση με εγέφαλο ασθενούς με προχωρημένο AD.** Φαίνεται ξεκάθαρα το μακροσκοπικό αποτέλεσμα του νευροεκφυλισμού που οδηγεί σε μείωση του εγκεφαλικού όγκου και ιστού και σε χαλάρωμα -απομάκρυνση των εγκεφαλικών αυλακών. (Pharma & Healthcare, Steven Salzberg, 2012)

Σε όλη αυτή την αχανή, εικόνα της παθογένειας αλλά και της αντιμετώπισης της νόσου Alzheimer, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν τα οιστρογόνα (Grimm et al. 2012, Crawford, 1998, Fitzpatrick et al. 2002, Liu et al. 2005, Deroo et al. 2006). Αναφέρεται

συγκεκριμένα, ότι μετεμνηνοπαυσικές γυναίκες που λαμβάνουν ορμονική αντικατάσταση με οιστρογόνα, έχουν λιγότερες πιθανότητες να αναπτύξουν μετέπειτα τη νόσο. Επιπλέον, η οιστρογονική αντικατάσταση μπορεί να βελτιώσει τη μαθησιακή λειτουργία και τη μνήμη γυναικών που πάσχουν από AD ή ακόμη και να καθυστερήσει την ανάπτυξη της νόσου (Liu et al. 2005, Deroo et al. 2006).

Σε μοριακό επίπεδο, φαίνεται πως οι πρωτεΐνες-κλειδιά της (AD), δηλαδή το αμυλοειδές πεπτίδιο Αβ και η πρωτεΐνη tau, τροποποιούν άμεσα ή έμμεσα τα επίπεδα των νευροστεροειδών (τα οποία είναι ουσιαστικά τα νευροενεργά στεροειδή που συντίθενται εντός του νευρικού συστήματος και είναι ανεξάρτητα από τους ενδοκρινείς αδένες της περιφέρειας). Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη που έγινε σε νευρικά κύτταρα SH-5Y5Y, η υπερέκφραση της φυσιολογικής πρεωτεΐνης tau, οδήγησε σε αύξηση παραγωγής νευροστεροειδών, σε αντίθεση με αυτά, στα οποία η υπερέκφραση της υπερφωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης tau είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων τους. Επίσης σε SH-5Y5Y κύτταρα, όταν το αμυλοειδές πεπτίδιο Αβ υπήρχε σε επίπεδα της τάξης των nM, στα οποία δεν φανερώνει τοξικότητα, παρουσιάστηκε αύξηση της παραγωγής οιστραδιόλης. Όταν όμως τα επίπεδα του Αβ<sub>42/43</sub> το καθιστούσαν τοξικό, σημειώθηκε πολύ μεγάλη μείωση των επιπέδων οιστραδιόλης και κυτταρικός θάνατος των νευρικών κυττάρων. Όπως προαναφέραμε, τα οιστρογόνα φαίνεται να μειώνουν το ρίσκο ή τη σοβαρότητα της νόσου μέσω μείωσης του οξειδωτικού στρες, μείωση της αιματικής ροής του εγκεφάλου και μείωση της μεταφοράς γλυκόζης. Έκτος της δράσης που έχουν στους ντοπαμινεργικούς νευρώνες, μπορούν επίσης να επηρεάζουν το χολινεργικό, σεροτενεργικό και νορ-αδρενεργικό σύστημα νευροδιαβίβασης. Ακόμη, εμπλέκονται και στην αποτροπή εκφυλισμού των συνάψεων και των περιφερικών δενδριτών που συμβαίνει κατά την πρόοδο της νόσου (Grimm et al. 2012).

#### 1.4 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

Έχουμε αναφέρει ήδη αρκετές φορές κάποιες από τις δράσεις που έχουν τα οιστρογόνα, μέσω της σύνδεσής τους με τον υποδοχέα τους. Παρακάτω, θα επικεντρώσουμε το ενδιαφέρον μας στη χημεία- βιοχημεία τους, στη δράση τους και τελικώς, θα γίνει λόγος για το αργίλιο, που ανήκει στα μεταλλοοιστρογόνα και που αποτελεί κύριο ερευνητικό πεδίο της συγκεκριμένης εργασίας.

Τα οιστρογόνα, λοιπόν, μαζί με τα αλατοκορτικοειδή, τα ανδρογόνα, την προγεστερόνη και τα γλυκοκορτικοειδή, ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των στεροειδών ορμονών και έχουν ως πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη. Τα σημαντικότερα οιστρογόνα που παράγονται από το σώμα είναι η 17β-οιστραδιόλη (E2) και οι δύο μεταβολίτες της: η οιστρόνη (E1) και η εστριόλη (E3). Και τα τρία αυτά είδη των οιστρογόνων είναι προσδέτες υψηλής συγγένειας των υποδοχέων των οιστρογόνων, αν και η E2 είναι ο ισχυρότερος αγωνιστής. Οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες της E2 αν και παλαιότερα ήταν ευρέως αποδεκτό ότι είναι

ανενεργοί, σήμερα πολλά στοιχεία υπονοούν την ιστοειδική τους δράση (Heldring et al. 2007).

Ο ρόλος των οιστρογόνων αυτών είναι η σύνδεση με τις διάφορες μορφές των υποδοχέων των οιστρογόνων, πυροδοτώντας έτσι τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος στα οποία εμπλέκονται οι υποδοχείς των οιστρογόνων και αναλόγως την -γενωμική ή -μη γενωμική δράση τους, το κύτταρο θα εκφράσει συγκεκριμένα γονίδια ή θα οδηγηθεί σε άλλες διεργασίες, όπως τροποποιήσεις των κυτταρικών συστατικών και των πρωτεϊνών του, αλληλεπίδραση με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και διακυτταρική επικοινωνία (Sjoberg et al. 2006).

Τα οιστρογόνα συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη ολόκληρου του ανθρώπινου οργανισμού, σε έναν μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διαδικασιών και σε διάφορα στάδια της ζωής. Εμπλέκονται στην αύξηση και στην ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος, στον καθορισμό και στη διατήρηση του φύλου και την υγιούς αναπαραγωγικής λειτουργίας (Heldring et al 2007). Παράλληλα, τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες, λαμβάνουν μέρος σε μία πληθώρα βιολογικών δράσεων, στο καρδιαγγειακό, στο ανοσοποιητικό, στο μυοσκελετικό, στο νευρικό σύστημα, στην συμπεριφορά κ.α ( Korach et al.2006).

Εξίσου σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος- κυρίως του μαστού, των ωθηκών και του ενδομητρίου (όπου και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως ορμονοεξαρτώμενοι καρκίνοι)- χωρίς αυτό να είναι απόλυτο, φαίνεται πως έχουν εμπλοκή και σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου και ο καρκίνος του προστάτη. Πέρα από την ογκογένεση, έχουν ενοχοποιηθεί και για πολλές άλλες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της οστεοπόρωσης, του συστηματικού ερυθηματώδους λύκου, της αντίστασης στην ινσουλίνη, των καρδιαγγειακών προβλημάτων, της ενδομητρίωσης και των νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως η νόσος Parkinson (PD), το εγκεφαλικό και η νόσος Alzheimer (AD) ( Korach et al.2006)

Συγκεκριμένα, στο νευρικό σύστημα, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, ως ενεργές στεροειδείς ορμόνες δρουν τα νευροστεροειδή, χημικά όμοια με τα υπόλοιπα στεροειδή, απλώς βιο-συντίθενται στο νευρικό σύστημα και όχι στους ενδοκρινείς αδένες (A. Grimm et al. 2012). Ο ρόλος λοιπόν, της 17β-οιστραδιόλης φαίνεται να έχει **νευροπροστατευτική δράση**. Η ορμόνη αυτή έχει θετική επίδραση στη ρύθμιση της φλεγμονής, του τραύματος (στο ΚΝΣ), της ισχαιμίας, του νευροεκφυλισμού και των γνωστικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα κατά την πάροδο των ετών και την αύξηση της βιολογικής ηλικίας του ατόμου και κατά τις διάφορες νευρολογικές διαταραχές (Pietranera, et al. 2014).

#### 1.4.1 ΑΛΛΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

Τα οιστρογόνα, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι στεροειδείς ορμόνες με ρόλο μέγιστης σημασίας σε όλον τον οργανισμό. Παράλληλα, γνωρίζουμε την ύπαρξη μορίων, ανάμεσα σε φυσικά και τεχνητά μόρια που υπάρχουν στο περιβάλλον με το οποίο συνεχώς αλληλεπιδρά ο άνθρωπος, που μιμούνται τη δράση των οιστρογόνων. Τα μόρια αυτά μπορεί να προέρχονται από τα φυτά, να είναι δηλαδή φυτοοιστρογόνα, όπως κάποιες ισοβλαβόνες και οι μεταβολίτες τους ή μπορεί να είναι τεχνητά οιστρογόνα, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική ή την κοσμετολογία, καθώς και τέλος, άλλα παράγωγα χημικών ουσιών (Watson et al. 2012).

Όλα αυτά τα είδη των οιστρογόνων λόγω του χαμηλού μοριακού τους βάρους και των υδρόφιλων συστατικών που διατίθενται στα σκευάσματά τους, τα κάνουν εξαιρετικά ευδιάλυτα κατά την επαφή τους με το νερό, με αποτέλεσμα να υπάρχουν σε πολύ μικρές ποσότητες στους υδροφόρους ορίζοντες και στο πόσιμο νερό. Επιπλέον, ο άνθρωπος μπορεί να έρθει σε επαφή με αυτά και από άλλες αμεσότερες πηγές, όπως η τροφή του, τα είδη προσωπικής υγιεινής, φαρμακευτικά προϊόντα, φυτοφάρμακα εντομοκτόνα, καθώς και καλλυντικά (Watson et al. 2012).

Τα οιστρογόνα που βρίσκουν εφαρμογή στην ιατρική και τη φαρμακευτική χρησιμοποιούνται ευρύτατα, και είναι ουσίες όπως η αιθινυλ-οιστραδιόλη, η διεθυλοιστραδιόλη (DES) και η μεστρανόλη, που αποτελούν ορμονικά αντισυλληπτικά, η ταμοξιφένη και άλλα αντι-οιστρογονικά φάρμακα που είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά σε ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους και τέλος, πληθώρα άλλων ουσιών που χορηγούνται για ορμονική αντικατάσταση σε μετεμμηνοπαυσικές γυναίκες (Watson et al. 2012). Τέλος, μία σημαντική κατηγορία φαρμακευτικών οιστρογόνων είναι τα SERMs (Selective Estrogen Receptors Modulators), τα οποία πιθανόν να αποτελούν μία εναλλακτική της οιστραδιόλης στην θεραπεία ή την πρόληψη νευροεκφυλιστικών διαταραχών. Είτε συνθετικά, όπως η ταμοξιφαίνη, είτε φυσικά, όπως τα φυτοοιστρογόνα, φαίνεται να έχουν νευροπροστατευτικές δράσεις, οι οποίες θα αναλυθούν πιο κάτω.

#### 1.4.2 ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ ΚΑΙ SERMS

Έχουμε ήδη αναφερθεί αναλυτικά στους υποδοχείς των οιστρογόνων, στα οιστρογόνα και ιδιαίτερα στην οιστραδιόλη ως φυσικός ενεργοποιητής τους. Στο σημείο αυτό, θα εστιάσουμε στην νευροπροστατευτική δράση των υποδοχέων και των ενεργοποιητών τους (οιστραδιόλη και serms) και στους μηχανισμούς με τους οποίους επιτυγχάνεται η δράση αυτή.

Αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους τα οιστρογόνα και τα SERMS προκαλούν νευροπροστασία δεν είναι ξεκάθαροι, φαίνεται να περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση των κινάσων MAPK/PI3/PKB. Έχει αποδειχτεί ότι οι οιστρογονικοί υποδοχείς, ενεργοποιημένοι από την οιστραδιόλη, θέτουν σε λειτουργία το MAPK/PI3-K/Akt μονοπάτι και με αυτόν τον τρόπο προστατεύουν τους νευρώνες του ιππόκαμπου από την γλουταμινεργική υπερ-ενεργοποίηση, ένα φαινόμενο γνωστό ως διεγερόμενη τοξικότητα, το οποίο οδηγεί σε υψηλό φορτίο ασβεστίου εντός των νευρώνων, και εν συνεχεία σε απόπτωση (Singh et al.). Επιπλέον, η ενεργοποίηση της Akt από την οιστραδιόλη σε νευρικά κύτταρα του ιπποκάμπου, τα προστατεύει από τον κυτταρικό θάνατο που θα επερχόταν από τα β-αμυλοειδή. Ένας άλλος μηχανισμός νευροπροστασίας της οιστραδιόλης, εμπλέκει αυξητικούς παράγοντες όπως είναι ο παρόμοιος με την ισουλίνη αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1). Αλληλεπιδράσεις μεταξύ οιστραδιόλης και IGF-1 ελέγχουν τα επίπεδα της Bcl-2 στον εγκέφαλο και ταυτόχρονα ρυθμίζουν το μονοπάτι της Akt (Cardona-Gomez et al.).

Η δράση της 17β-οιστραδιόλης και των οιστρογονικών ενώσεων στον εγκέφαλο και η δραστηριότητα των οιστρογονικών υποδοχέων πιθανόν να διαφέρουν ανάλογα με τη διαθεσιμότητα μεταγραφικών παραγόντων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται ο AP1 (Webb et al), ο NF-κB (Dodel et al), ο STAT3 (Ciana et al), καθώς και αναπτυξιακοί παράγοντες, όπως ο προερχόμενος από τον εγκέφαλο νευροτροφικός παράγοντας (BDNF) και ο IGF-1. Το γονίδιο του BDNF περιλαμβάνει ERE's την περιοχή του προαγωγέα του και έτσι τα οιστρογόνα μπορούν απευθείας να ρυθμίζουν τη μεταγραφή του γονιδίου (Sohrabji et al.). Η υψηλή εξαρτώμενη από την οιστραδιόλη έκφρασή του BDNF εμπλέκεται στην επιβίωση των χολινεργικών νευρώνων, ενώ τα υψηλά επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης συσχετίζονται με καλύτερη λειτουργία του ιππόκαμπου σε θυληκούς αρουραίους (Scharfman and MacLusky et al.). Οι υποδοχείς των οιστρογόνων και του IGF-1 φαίνεται να συνεργάζονται επιφέροντας νευροπροστασία σε μοντέλα ζώων με νευροεκφυλισμένα κύτταρα ιπποκάμπου και Parkinson (Azcoitia et al.). Οι παράγοντες BDNF και IGF-1 έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιούν εξωκυτταρικά ρυθμιζόμενες κινάσες (ERKs), μέλη της οικογένειας MAPK, οι οποίες πιθανόν να εμπλέκονται στις νευροπροστατευτικές επιδράσεις των οιστρογονικών ενώσεων. Η ικανότητα αυτών και της οιστραδιόλης να ενεργοποιούν μέλη της οικογένειας MAPK, όπως οι ERK1 και ERK2, έχει αποδειχτεί σε κύτταρα νευροβλαστώματος και ιπποκάμπου σε θυληκούς αρουραίους (Watters et al.). Επιπλέον, οιστρογονικές ενώσεις πιθανόν να αλληλεπιδρούν με σηματοδοτικά μονοπάτια των αυξητικών παραγόντων μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων δρώντας έξω από τον πυρήνα. Έτσι, ο ERα μπορεί να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα IGF-1 και σε συνεργασία με την πρωτεΐνη IRS-1 και την κινάση PI3, ενισχύει τη σηματοδότηση του IGF-1 στον εγκέφαλο (Mendez et al.) . Σημειωτέον, ο υποδοχέας IGF-1 και η δράση των οιστρογονικών υποδοχέων αυξάνουν συνεργικά την δραστηριότητα της κινάσης Akt με αποτέλεσμα την προστασία από νευροτοξικότητα. Οι νευροπροστατευτικές δράσεις της οιστραδιόλης και των SERMS πιθανόν να μεσολαβούνται εν μέρει από την δράση της Akt, η οποία είναι

γνωστό ότι αυξάνει την έκφραση ενός αντι-αποπτωτικού μορίου που ονομάζεται Bcl-2 (Cardona-Gomez et al.).

Μία άλλη σημαντική κινάση πέραν της Akt, η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση της επιβίωσης των νευρώνων, είναι η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3β (GSK3β). Έχει γίνει γνωστό, ότι η οιστραδιόλη και κάποια SERMS αναστέλλουν τη δραστικότητα της GSK3β στον εγκέφαλο (Cardona-Gomez et al.). Υψηλή δραστικότητα της κινάσης αυτής έχουν συνδεθεί έντονα με νευροεκφυλιστικές διαταραχές, ενώ η αναστολή της GSK3β ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε επιβίωση των νευρώνων (Bhat et al.). Η οιστραδιόλη, συγκεκριμένα, ρυθμίζει την αλληλεπίδραση του ERα με την GSK3β και την β-κατενίνη, ένα ακόμη μόριο το οποίο εμπλέκεται στη ρύθμιση της επιβίωσης των νευρώνων και στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού καθώς και στην σταθερότητα των συνάψεων (Cardona-Gomez et al.). Επιπλέον, η οιστραδιόλη ρυθμίζει την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Tau με την GSK3β, τη β-κατενίνη και το σύμπλοκο της PI3 και μειώνει την υπερφωσφορυλίωση της Tau, η οποία έχουμε ήδη αναφέρει την συμμετοχή της στην ασθένεια του Alzheimer. Ένας άλλος σημαντικός μηχανισμός, ο οποίος εμπλέκεται στις νευροπροστατευτικές επιδράσεις των οιστρογονικών ενώσεων, είναι η ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας (Schwend and Gustafsson et al.). Υπάρχουν αποδείξεις, σύμφωνα με τις οποίες οι νευροπροστατευτικές δράσεις των SERMS αποτελούν μέρος της ενεργοποίησης του μιτοχονδριακού ERβ, για τον οποίον υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η ενεργοποίησή του επιφέρει αναστολή στην αποπτωτική σηματοδότηση (Hsieh et al.).

Μία ακόμη νευροπροστατευτική δράση της οιστραδιόλης και των οιστρογονικών ενώσεων περιλαμβάνει την απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων όπως ο TGFβ1 και ο IGF-1 (Sortino et al.). Επιπρόσθετα, η οιστραδιόλη μειώνει την δραστικότητα του NF-κΒ σε αστροκύτταρα, το οποίο ενεργοποιείται από το αμυλοειδές Αβ(1-40) (Dodel et al.). Δεδομένου του ότι ο NF-κΒ αποτελεί μεταγραφικό ρυθμιστή μεγάλου αριθμού γονιδίων, που συμμετέχουν στη φλεγμονή, η ορμονική ρύθμισή του πιθανόν να παίζει σημαντικό ρόλο στις νευροπροστατευτικές δράσεις των οιστρογονικών ενώσεων.

Ο NF-κΒ φαίνεται να παίζει ρόλο-κλειδί σε έναν μηχανισμό, ο οποίος μέσω του μονοπατιού PI3/Akt, προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτικό στρες. Για την ακρίβεια, έχει αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση των PI3/Akt οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της Cu/Zn- υπεροξειδικής δισμουτάσης ( Cu/Zn-SOD ), μέσω ενεργοποίησης του NF-κΒ. Αυτά τα αποτελέσματα συμβάλλουν στο να ανακαλυφθεί ο μηχανισμός, ο οποίος μέσω των PI3/Akt, παρέχει προστασία ενάντια στο οξειδωτικό στρες και προτείνει μία νέα στρατηγική θεραπείας, που θα αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των νευρώνων. (Rojo et al. 2004)

Έχει γίνει ήδη αναφορά στο αντι-αποπτωτικό μόριο Bcl-2 και στο γεγονός ότι παίζει ρόλο ως τελικός δέκτης του νευροπροστατευτικού σήματος που επάγεται από την οιστραδιόλη και τα παράγωγά της. Επιπλέον, παρουσία οιστραδιόλης παρουσιάζεται επαγωγή των επιπέδων mRNA ενός άλλου αντιαποπτωτικού μορίου, του Bcl-XL. Από την άλλη, προκαλεί μείωση στα επίπεδα μίας προαποπτωτικής πρωτεΐνης, της BAD. Φαίνεται, λοιπόν, ότι και



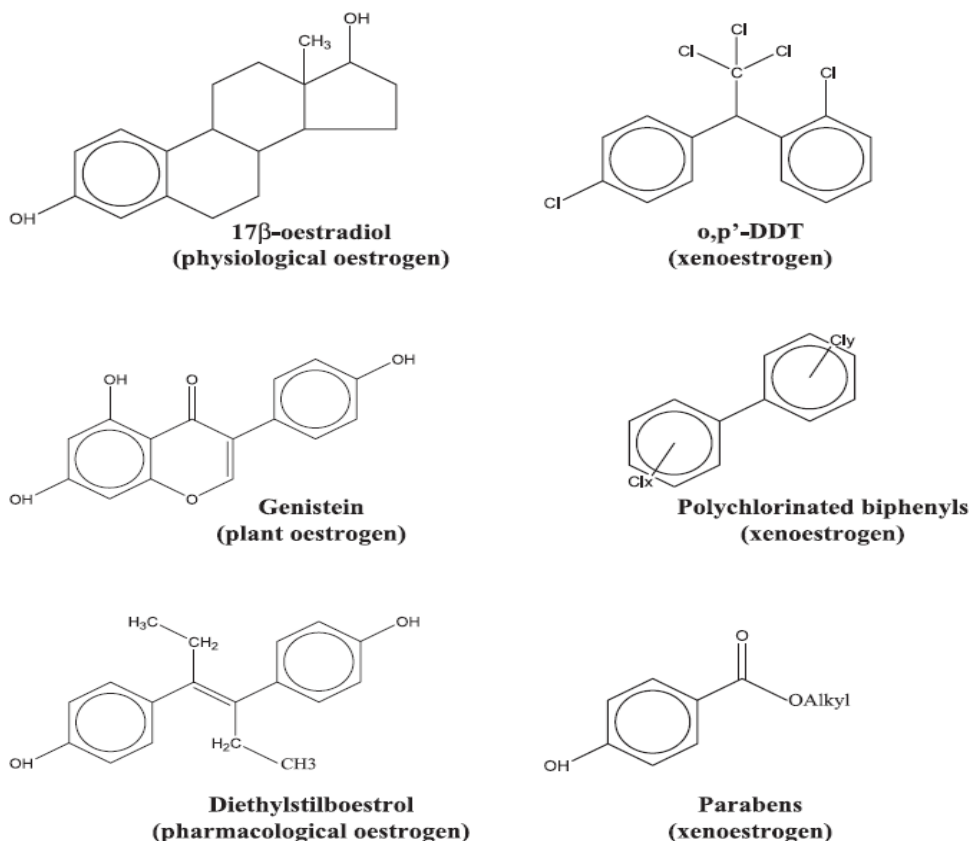
οι τρεις αυτές δράσεις της οιστραδιόλης έχουν έναν μόνο στόχο: να προστατεύσουν τα νευρικά κύτταρα από τον κυτταρικό θάνατο. Τέλος, ένας ακόμη μηχανισμός νευροπροστασίας παρουσιάζει την οιστραδιόλη και SERMS να προκαλούν υπερσυσσώρευση του cAMP μέσω 3 οδών: της PKA, των MAPK και των CAMK. Στη συνέχεια, επάγεται η φωσφορυλίωση του CREB (cAMP response element-binding protein) με αποτέλεσμα πρώτον, την καταστολή της προαποπτωτικής πρωτεΐνης RAF-1, δεύτερον την επαγωγή του Bcl-2 και συνεπώς την επιβολή νευροπροστασίας (Green and Simpkins et al. 2000).

#### 1.4.3 ΞΕΝΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ- ΜΕΤΑΛΛΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

Τα ξενοοιστρογόνα (xenoestrogens) είναι γενικώς γνωστά ως τεχνητά, μη στεροειδή οργανικά χημικά μόρια τα οποία έχουν περάσει στο περιβάλλον από αγροτικούς ψεκασμούς, βιομηχανικές επεξεργασίες, τοξικά απόβλητα συμπεριλαμβανομένων οργανοχλωρινικών εντομοκτόνων, πολυχλωριομένων διφαινυλίων, αλκυλφαινολών και parabens (συστατικό πολλών προϊόντων σωματικής υγιεινής που χρησιμοποιούνται σε καθημερινή βάση). Τα χημικά αυτά είναι γνωστά ως ενδοκρινικοί διαταράκτες και η επίδραση που έχουν στην ανθρώπινη υγεία βρίσκεται ακόμη υπό έρευνα. Τα περισσότερα από αυτά τα οργανικά μόρια με οιστρογονική δράση φέρουν συχνά φαινολικούς ή άλλους δακτυλίους, οι οποίοι συμβάλλουν στην απόκτηση της οιστρογονικής ιδιότητάς τους, διαμέσου διαμοριακών αλληλεπιδράσεων με τις αμινοξικές αλυσίδες του ER (Darbre 2005).

Μια υποκατηγορία των ανόργανων ξενοοιστρογόνων αποτελούν και κάποια μέταλλα που έχουν τη ικανότητα να τροποποιούν μειώνοντας ή αυξάνοντας την οιστρογονική δράση, ή να μιμούνται το σήμα των οιστρογόνων, διαμορφώνοντας μία νέα τάξη ενδοκρινικών διαταρακτών, που ονομάζονται μεταλλοοιστρογόνα (Darbre, 2005).

Τα μεταλλοιστρογόνα περιλαμβάνουν τόσο ανιόντα όσο και κατιόντα. Μερικά παραδείγματα αυτών όσο και άλλων τεχνητών οιστρογόνων και ξενοιστρογόνων παρουσιάζονται στην εικόνα παρακάτω:



<p style="text-align: center;">+ <b>METAL IONS</b>  aluminium, antimony, arsenite, barium  cadmium, cobalt, copper, chromium  lead, mercury, nickel  selenite, tin, vanadate</p>
--

Η χημική δομή άλλων φύτο, φάρμακο-και ξενοιστρογόνων καθώς και της E<sub>2</sub>. Στο πλαίσιο παρατίθενται τα μεταλλοιστρογόνα. *Darbre J. Appl. Toxicol. 2006; 26: 191–197*

#### 1.4.4 ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, ο ER είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος σχηματίζει δομή δακτύλου ψευδαργύρου (zinc finger) και επομένως η δράση του στηρίζεται στη σχέση πρωτεΐνης-μετάλλου. Συγκεκριμένα, αποτελεί μία δομή που περιλαμβάνει δύο δάκτυλα ψευδαργύρου, όπου το κάθε ένα σχηματίζεται από τις

πλευρικές αλυσίδες δύο ζευγαριών κυστεϊνικών καταλοίπων που συνδέονται με ένα άτομο ψευδαργύρου. Η σύνδεση οιστρογόνου- ER, γίνεται στην περιοχή LBD (Ligand Binding Domain). Ο υποδοχέας διμερίζεται και δια μέσω των δακτύλων ψευδαργύρου αλληλεπιδρά με τα στοιχεία EREs (Estrogen Response Elements) στο DNA επηρεάζοντας τη μεταγραφική τύχη των γονιδίων που φέρουν τα στοιχεία αυτά ή μέσω άλλων μηχανισμών ακόμη περισσότερα γονίδια ( Darbre, 2006).

Τα διάφορα μέταλλα που έχουν δράση μεταλλοοιστρογόνων έχουν την ικανότητα να παρεμβαίνουν στη δράση του ER με ποικίλους τρόπους. Κάποια μπορεί να πάρουν τη θέση του ψευδαργύρου, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η ικανότητα του DBD να προσδέεται σε κάποιο ERE. Κάποια άλλα μέταλλα έχουν την ικανότητα να προσδέονται με το LBD και κατά συνέπεια να αποτρέπουν την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την 17β-οιστραδιόλη. (Darbre, 2006)

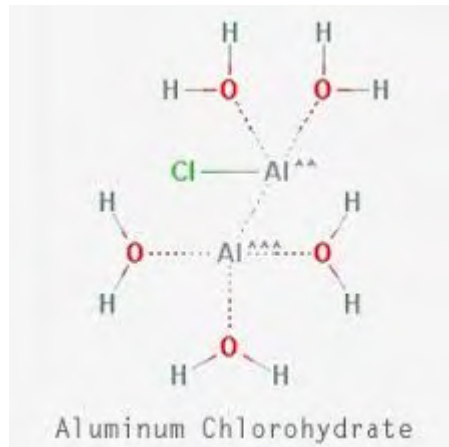
#### 1.4.5 ALUMINUM ΚΑΙ ΤΑ ΑΛΑΤΑ ΤΟΥ –ΥΔΡΟΞΥ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟ ΑΡΓΙΛΙΟ (Aluminum Chlorhydrate, ACH)

Το Aluminum (αργίλιο), είναι ένα από τα μεταλλοοιστρογόνα και μελετάται ευρέως η δράση του λόγω της συχνής επαφής του με τον άνθρωπο κυρίως μέσω της κοσμετολογίας και των προϊόντων προσωπικής υγιεινής. Στη συγκεκριμένη εργασία θα εξεταστεί η οιστρογονική δράση που έχει το Aluminum Chlorhydrate και γενικότερα η δράση του σε βιοχημικές, κυτταρικές διαδικασίες, οι οποίες υπόκεινται μεταξύ άλλων και σε οιστρογονικό έλεγχο, σε νευρικά κύτταρα. Μία τέτοια βιοχημική διεργασία, όπως προαναφέρθηκε είναι η αντιοξειδωτική άμυνα, η οποία ενισχύεται από τη δράση των οιστρογόνων.

Γενικά τα άλατα αλουμινίου έχουν ενοχοποιηθεί για τη συμμετοχή τους στον μηχανισμό ανάπτυξης διάφορων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων όπως η νόσος Alzheimer και η νόσος Parkinson.

Τα άλατα του αργιλίου, όπως και το ACH, προστίθεται ως κύριο ενεργό συστατικό στην παρασκευή αποσμητικών, έχοντας αντι-ιδρωτική δράση (antiperspirant). Η προσθήκη τους μάλιστα, γίνεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 25% w/v, έχοντας ως συνέπεια τα αποσμητικά να αποτελούν μία πηγή υψηλής έκθεσης του ανθρώπινου οργανισμού σε ACH. Βέβαια, δεν είναι ακόμη γνωστά τα αποτελέσματα από μακροχρόνια και ευρεία έκθεση πληθυσμών σε ACH, υπάρχουν όμως πολλά δεδομένα που εξαιτίας και της μεταλλοοιστρογονικής του ιδιότητας, το συσχετίζουν με ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (Darbre, 2006), καθώς και με νευροεκφυλιστικές διαταραχές και κυρίως με τη νόσο Alzheimer.

Ο τρόπος με τον οποίον ένας οργανισμός μπορεί να εκτεθεί στα άλατα αργιλίου είναι μέσω της απορρόφησής τους από το δέρμα με την εφαρμογή του αποσμητικού. Το άλας απορροφάται και δρα φράσσοντας τους πόρους, αποτρέποντας έτσι τον ιδρώτα να εξέλθει και κατόπιν δίσταται στους παρακείμενους ιστούς καθώς και στο αίμα (Darbre, 2006) .



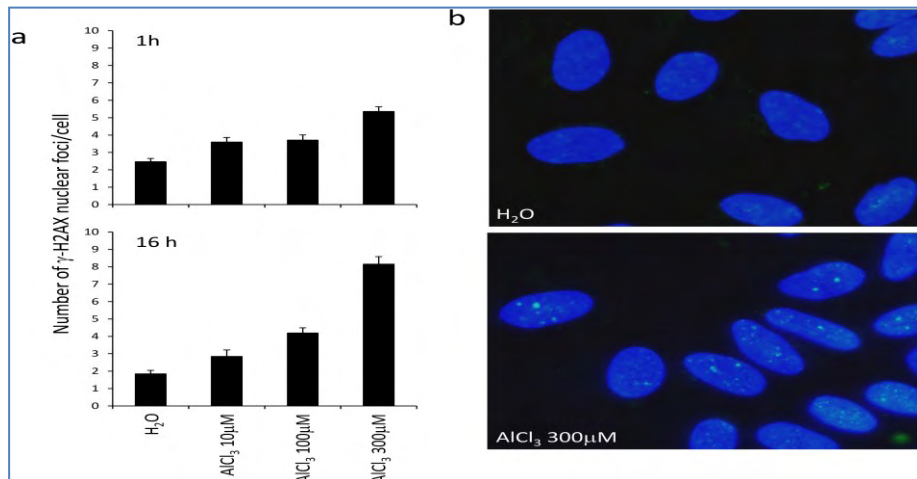
Η χημική δομή του Aluminum Chlorohydrate

#### 1.4.6 Η ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ACH

Το ACH, λόγω του τρόπου και του ιστού που εφαρμόζεται αρχικά έχει κατηγορηθεί για την εμπλοκή του στην καρκινογένεση και συγκεκριμένα, για τη συμμετοχή του στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Εκτός αυτού βέβαια, φαινόμενα γενετοξικότητας έχουν εντοπιστεί σε διάφορα συστήματα, εκ των οποίων και το νευρικό σύστημα. Οι περισσότερες μελέτες τοξικότητας έχουν γίνει σε καρκινικές σειρές μαστικών κυττάρων (MCF-7, MCF-10A ), στα οποία και εντοπίστηκε η παρεμβολή του ACH στην οιστρογονική σηματοδότηση: Το ACH προσδέεται στο σημείο πρόσδεσης της E2 και προωθεί τη μεταγραφή γονιδίων μέσω των ERE στοιχείων (Sarpino et al. 2012, Darbre, 2006).

Αν και η μοριακή βάση του φαινομένου δεν είναι πλήρως ξεκαθαρισμένη, κάποιες από τις υποθέσεις που έχουν διατυπωθεί, υποστηρίζουν πως υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση του DNA με το αργίλιο και ότι οδηγεί στην επαγωγή βλάβης στο DNA μέσω οξειδωτικού στρες, ότι υπάρχει επέμβαση στο γενετικό υλικό μέσω της απελευθέρωσης DNAσης από τα

λυσοσώματα, ότι μπορεί να πραγματοποιείται αποσιώπηση της φυσιολογικής λειτουργίας των μικροσωληνίσκων ή ότι επιστρατεύονται οι κυτταρικοί μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA. (Sarpino et al. 2012)



Στην παρακάτω εικόνα δίνεται ένα παράδειγμα τοξικότητας του ACH σε MCF-10A κύτταρα. Το AlCl<sub>3</sub> αυξάνει τα διπλά κατάγματα στο DNA (DSBs) των MCF-10A κυττάρων. (a) αριθμός των  $\gamma$ -H2AX πυρηνικών εστίες ανά κύτταρο, τα οποία καλλιεργήθηκαν παρουσία 300 $\mu$ M AlCl<sub>3</sub> ή του αντίστοιχου όγκου H<sub>2</sub>O και για το χρόνο που αναγράφεται. Οι σταθερές έχουν επαναληφθεί σε τρία διαφορετικά πειράματα. Για την 1<sup>η</sup> και τη 16<sup>η</sup> ώρα ισχύει  $P < 0.002$  (το AlCl<sub>3</sub> σε σχέση με το H<sub>2</sub>O). (b) εικόνα από IHC των  $\gamma$ -H2AX μετά από επίωση με το AlCl<sub>3</sub> και το H<sub>2</sub>O για 16 ώρες (Sarpino et al. 2012).

### 1.5 ΤΑ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΚΑΙ Η ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΤΟΥ ΑΡΓΙΛΙΟΥ

Στο αίμα, η μεγαλύτερη ποσότητα του Al, συνδέεται με την τρανσφερίνη, έχοντας μάλιστα την ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, μέσω ενδοκύττωσης με τη διαμεσολάβηση του υποδοχέα της τρανσφερίνης (Bondy, 2013). 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.

Αναφορικά μάλιστα με τη συγκέντρωση του Al στον εγκέφαλο έχει καταγραφεί πως υπάρχει αυξανόμενη συγκέντρωσή του με την πάροδο των ετών (Vucetic-Arsicet et al. 2013).

Οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως έγινε και παραπάνω αναφορά, 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).

Τα νευρολογικά και ψυχιατρικά νοσήματα που σχετίζονται με νευροεκφυλισμό είναι πολλά, όμως τα πιο σημαντικά και συχνά είναι τα έξης: Parkinson's Disease (PD), Alzheimer's Disease (AD), Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS), Συσχετιζόμενη με τη ηλικία Εκφύλιση Ωχρής Κηλίδας (AMD Age-related macular degeneration), Νόσος του Χάντινγκτον (HD Huntingdon's Disease), Σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) και εγκεφαλικά επεισόδια (Steward et al. 2013).

Πιο πάνω αναφερθήκαμε στα χαρακτηριστικά και στη νευροπαθολογία της νόσου Alzheimer και επικεντρωθήκαμε στην συμμετοχή των υποδοχέων των οιστρογόνων και των οιστρογόνων στην πρόοδο αυτής. Σε αυτό το σημείο της εργασίας θα γίνει αναφορά, εν συντομία, για την δράση που έχει το αργιλίο (υπό τη μορφή ACH) σχετικά με την AD:

Αρχικά, έχει σημειωθεί αυξημένη συγκέντρωση αργιλίου σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο Alzheimer (Stephen C. Bondy, 2014). Η είσοδος του αργιλίου στην περιοχή του εγκεφάλου διαμέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) φαίνεται να αυξάνει την καθίζηση του πεπτιδίου Αβ, και να ευνοεί τελικά τον σχηματισμό των αμυλοειδών πλακών (Grimm et al. 2012). Ακόμη, σε ασθενείς με Alzheimer, δραστηριοποιούνται και τα μονοπάτια της φλεγμονώδους αντίδρασης με σκοπό την επικείμενη καταστροφή στους νευρώνες, ενώ η αύξηση της εγγενούς φλεγμονώδους δραστηριότητας αυξάνεται με την ηλικία του ατόμου. Η παρουσία, λοιπόν, του αργιλίου συμβάλλει στην πραγματοποίηση των αντιδράσεων της φλεγμονής, με την επαγωγή της δράσης των κυττάρων της μικρογλοίας (Bondy, 2014). Τέλος, ένα άλλο μονοπάτι που συμμετέχει στην αρχή της AD, είναι αυτό των ελευθέρων ριζών, στο οποίο έχει επιβεβαιωθεί η συμμετοχή του αργιλίου. Σημειώνουμε πως τα δύο αυτά μονοπάτια είναι αλληλένδετα, σκεπτόμενοι τη σχέση οξειδωτικού στρες και φλεγμονώδους αντίδρασης (Stephen C. Bondy, 2014).

## 2.ΣΚΟΠΟΣ

Δεδομένης της μεγάλης σημασίας που παίζουν τα οιστρογόνα και η κυτταρική σηματοδότηση μέσω αυτών σε πολλές φυσιολογικές διαδικασίες στον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά και λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη την καίρια συμμετοχή τους στην παθογένεση και πλήθους διαταραχών, μία μελέτη που εστιάζει στην οιστρογονική δράση

και σηματοδότηση οιστρογονομιμητικών ουσιών αποσκοπεί αρχικά στην κατανόηση της συμμετοχής τέτοιων ουσιών στην εμφάνιση παθολογικών καταστάσεων. Γνωρίζοντας, μάλιστα, ότι η υπό μελέτη ουσία, τα άλατα του αργιλίου, έρχονται επί καθημερινής βάσης σε επαφή με τον ανθρώπινο οργανισμό, η πιθανή παρεμβολή της σε φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες, θεωρείται υψίστης σημασίας.

Λαμβάνοντας υπό όψιν την πιθανή μεταφορά αλάτων αργιλίου, σε περιπτώσεις τραυματισμών, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και της δυνατότητας διέλευσής τους από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, σε συνδυασμό με δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας, που ενοχοποιούν το αργίλιο για συμμετοχή του σε νευροεκφυλιστικές νόσους, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη διερεύνησης των μηχανισμών δράσης του. Παράλληλα, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, πλήττοντας μη αναστρέψιμα εκατομμύρια ανθρώπους ανά την υφήλιο, αποτελούν ένα θέμα συνεχούς έρευνας για την ευρύτερη ιατρική κοινότητα με σκοπό την όσο τον δυνατόν καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που οδηγούν στην καταστροφή των νευρώνων και κατ' επέκταση την ανάπτυξη καλύτερης πρόληψης και πιθανών θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Έχοντας λοιπόν αυτά ως δεδομένα, ο σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η εκτίμηση της επαγόμενης οιστρογονικής δράσης αλάτων αργιλίου (ACH) μέσω του οιστρογονικού υποδοχέα  $\beta$  σε δύο κυτταρικές σειρές νευρικών κυττάρων (SHSY-5Y και N<sub>2</sub>A wt) και η μελέτη της εμπλοκής τους στη ρύθμιση βασικών βιολογικών μορίων που εμπλέκονται σε μηχανισμούς άμυνας και οξειδωτικού stress.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου, η πειραματική προσέγγιση απαρτίζεται από τρία σκέλη.

1. Το πρώτο σκέλος, αφορά την εκτίμηση της οιστρογονικής δράσης του ACH και τη διερεύνηση πιθανής εξειδίκευσης του ACH ως προς τους δύο υπότυπους του ER, με μεθόδους λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης.
2. Στόχος του δεύτερου σκέλους, αποτελεί η μελέτη της επίδρασης του ACH στην ποιοτική και ποσοτική μεταβολή της κυτταρικής και υποκυτταρικής εντόπισης του ενδογενούς ER $\beta$ , με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας και ανοσοαποτύπωσης Western.
3. Τέλος, το τρίτο σκέλος της πειραματικής προσέγγισης περιλαμβάνει τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών (με μεθόδους ανοσοαποτύπωσης Western) που εμπλέκονται σε μηχανισμούς άμυνας, φλεγμονής και οξειδωτικού στρες και τα οποία βρίσκονται υπό τον έλεγχο οιστρογονικών αποκρίσεων, καθώς και η συγκριτική μελέτη των επιπέδων τους παρουσία E2, ACH, ICI 172,780 και συνδυασμού αυτών.

Εν ολίγοις, μέσω των προαναφερθέντων προσεγγίσεων στοχεύουμε στη διεξαγωγή κάποιου πιθανού συμπεράσματος: αρχικά για το πώς επηρεάζεται η παρουσία και ο υποκυτταρικός εντοπισμός του ERβ στα νευρικά κύτταρα από το ACH και β) για το ρόλο που μπορεί να διαδραματίζει το αργίλιο, μέσω της επαγωγής και σηματοδότησης του ERβ στα γεγονότα του νευροεκφυλισμού.

Τελικώς, δε αποτελώντας παράλληλα κομμάτι μίας μεγαλύτερης μελέτης για την οιστρογονική δράση των αλάτων του αργιλίου (υπό τη μορφή ACH), ευελπιστεί να συμπληρώσει την αχανή εικόνα της συμμετοχής της ουσίας αυτής στην σηματοδότηση δια μέσω ER, με την παροχή κάποιων πληροφοριών, για τη δράση του στα νευρικά κύτταρα.

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

- Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYS™
- Laminar Flow Hood Tel Star AV-30/70
- Incubator: New Brunswick (an Eppendorf Company) Galaxy 170S
- Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss Optronic Germany
- Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: Entrofriger- BLII/ PS Selecta®
- Μικροσκόπιο φθορισμού: LEICA DM 2000
- Ψυχόμενη κάμερα φθορισμού: OPTIMOS Q IMAGING
- Λουμινόμετρο: Berthold Technologies, LuBat 39508
- Φυγόκεντρος Helme Z36HK
- Συσκευή ηλεκτροφόρισης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell
- Συσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot
- Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S
- Μηχάνημα εμφάνισης W.B και gel: FluoChemE/ ProteinSimple
- Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak



- Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων από την κάμερα φθορισμού: Q Capture Pro v.7.05™

## 3.2 ΥΛΙΚΑ

### 3.2.1 Χημικά

- ACH 50% (Sigma)
- Acrylamide/Bis acrylamide 40 % (Bio-Rad)
- APS (Ammonium Persulfate, Sigma)
- Bradford protein assay (Bio-Rad)
- BSA (Sigma)
- CaCl<sub>2</sub>(Merck)
- MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen)
- HOECHST 33342 (Sigma)
- DMSO (Sigma)
- DTT (SERVA)
- EDTA (Panreac)
- ECL Kit (Pierce)
- Estradiol, E<sub>2</sub>(Sigma)
- FBS Gibco® (Life Technologies - Invitrogen) \*
- HCl (Merck)
- ICI (SIGMA)
- KCl (Merck)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck)
- L-Glutamine (Life Technologies - Invitrogen)
- Lipofectamine® 2000 (Life Technologies - Invitrogen)

- Luciferin buffer(Promega)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck)
- NaCl (Panreac)
- NaHCO<sub>3</sub> (Merck)
- NaOH (Merck)
- ONPG (Sigma)
- PMSF (SERVA)
- PVA (Sigma)
- SDS (SIGMA)
- Skimmed milk powder (Regilait)
- TEMED (Research Organics)
- Trypsin-EDTA 5% 10× (Gibco)
- Tween 20 (Euroclone)
- Αιθανόλη (Panreac και Merck)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών Pageruler™ Prestained Protein Ladder (ThermoScientific Fermentas)
- GeneRuler™ 1kb DNA Plus Ladder
- Μεθανόλη (Merck)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Whatman (Protran)
- Πενικιλίνη-Στρεπταμυκίνη (Invitrogen)
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων ×5 ή Lysis Buffer ×5 (Promega)
- PureLink™ Genomic DNA Mini kit
- Trizol
- Χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>)

- Ισοπροπανόλη
- RQ1 RNase-Free DNase
  - Reaction Buffer 10X
  - DNase
  - RQ1 DNase Stop Solution
- 10X PCR buffer minus Mg
- 10mM dNTP mixture
- 50mM MgCl<sub>2</sub>
- Taq DNA Polymerase (5 U/μl)
- Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen)
  - 5x First-Strand Buffer
  - DTT 1M
  - RNaseOUT (40u/μL)
  - Αντίστροφη μεταγραφάση
- SYBR Select Master Mix
  - Ampli Taq DNA πολυμεράση (UP)
  - SYBR GreenER χρωστική
  - dNTPs
  - UDG ενζύμου
  - ROX χρωστική αναφοράς
  - Ρυθμιστικό διάλυμα

### 3.2.2 Θρεπτικά Υλικά

- Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 4,5 g/mol Glucose και 1g/mol Glucose (Life Technologies - Invitrogen)
- Opti-MEM® (Life Technologies - Invitrogen)

Περιεκτικότητες των θρεπτικών μέσων:

DMEM 4,5 g/mol Glucose & DMEM 1 g/mol Glucose: 10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S

### 3.2.3 Διαλύματα

- **RIPA Buffer:**

Περιέχει 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA και 0.1 NP-40 σε ddH<sub>2</sub>O. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **PMSF 200 mM:**

Για την παρασκευή 2 mL PMSF 200 mM διαλύονται 0.07 gr PMSF σε 2 mL ισοπροπανόλης. Γίνεται ο διαμοιρασμός του σε aliquots των 200 μL και αποθηκεύονται στους -20 °C.

Με αραιώση 10 % σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20 mM.

- **Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (Sonication Buffer):**

Αποτελείται από 20 mM Tris pH 7.5, 0.5 % Triton X-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA και αποθηκεύεται στους 4 °C. Σε 1 mL από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 0.5 μL PMSF 20 mM (20 °C) και 2 μL DTT 1 M (20 °C). Η DTT χρησιμεύει ως αναγωγικός παράγοντας.

- **Διάλυμα Bradford:**

Stock 5x. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1x, αραιωμένο με ddH<sub>2</sub>O. Η αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford είναι 1:1000.

- **HBS 2X:**

Αποτελείται από HEPES 50 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaCl 280 mM. Αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα για παροδική διαμόλυνση με CaCl<sub>2</sub>. Ρυθμίζουμε το pH του στο 7,1 με τη χρήση NaOH ή HCl και φιλτράρεται με 0,22mm Filter.

- **Sample Buffer 4x:**

Αποτελείται από 1 M Tris pH 6.8, 10 % γλυκερόλη, 10 % SDS, 5 % β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 % κυανούν της βρωμοφαινόλης και αποθηκεύεται στους -20 °C. Η β-μερκαπτοαιθανόλη αναγάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και καταργεί την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών.

- **Tris 20 mM pH 7.5:**

Σε πλαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf (1.5 mL) αναμειγνύονται 20 μL stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 (4 °C) με 980 μL ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται σε R.T.

- **Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:**

Για την παρασκευή 0.2 L διαλύματος ζυγίζονται 36,342 gr Tris τα οποία διαλύονται σε dH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 12 N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **TEMED:**

Χρησιμοποιείται χωρίς κάποια αραίωση, όπως ακριβώς παραλαμβάνεται. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **APS 10 %:**

Παρασκευάζεται διαλύοντας 100 mg APS σε 1 mL ddH<sub>2</sub>O. Αποθηκεύεται στους -20 °C και κατά τη διάρκεια χρήσης του παραμένει τοποθετημένο σε πάγο (4 °C).

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρισης (Running Buffer) 10x:**

Ζυγίζονται 30.3 gr Tris base και 144.00 gr γλυκίνης τα οποία διαλύονται σε όγκο 1 L ddH<sub>2</sub>O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε R.T. (Ornstein, 1964; Davis, 1964).

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρισης (Running Buffer) 1x:**

Για την παρασκευή του R.B. 1x αραιώνονται 100 mL R.B. 10x σε 900 mL dH<sub>2</sub>O (αναλογία 1:9). Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε αναλογία 0.1 %. (Laemmli, 1970). Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10×:**

Αποτελείται από 10 % Running Buffer 10×, 20 % MeOH και 0.05 % SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα φόρτωσης αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10×:**

Αποτελείται από 91 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> και 1500 mM NaCl. Αποθηκεύεται σε R.T.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1×:**

Το stock buffer PBS 10× αραιώνεται σε κατάλληλο όγκο dH<sub>2</sub>O ή ddH<sub>2</sub>O και προστίθεται Tween-20 σε αναλογία 1 %. Αποθηκεύεται σε R.T.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (Sodium Phosphate buffer solution):**

Παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1 M pH 7.5 με ανάμειξη κατάλληλων όγκων από τα stock διαλύματα μονοβασικού NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 M και διβασικού Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M. Τα stock διαλύματα παρασκευάζονται με διαλύτη το H<sub>2</sub>O, κάνοντας τους κατάλληλους υπολογισμούς για τη μάζα της χημικής ένωσης που απαιτείται.

- **Διαλύματα για εμφάνιση σήματος:**

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα της Kodak. Αποτελείται από ένα διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Τα εκάστοτε διαλύματα παρασκευάζονται με ανάμειξη 1 : 3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε dH<sub>2</sub>O.

### 3.2.4 Πρωτογενή αντισώματα:

- Αντίσωμα έναντι ERβ από κόνικλο, ERβ H150 (Santa Cruz)
- Αντίσωμα έναντι β- ακτίνης από επίμυ (Sigma)
- Αντίσωμα έναντι Casp 3 από κόνικλο (Abcam)
- Αντίσωμα έναντι Bcl 2 από επίμυ (Santa Cruz)
- Αντίσωμα έναντι ERβ (IHC) MCA, (Santa Cruz)
- Αντίσωμα έναντι καταλάσης από αίγα (RnD Systems)

### 3.2.5 Δευτερογενή αντισώματα:

- Αντίσωμα έναντι mouse IgG-HRP (Jackson Laboratories)
- Αντίσωμα έναντι rabbit IgG-HRP (Pierce Antibodies).
- Αντίσωμα για IHC α-R Alexa 488 ( Santa Cruz)

### 3.2.6 Αναλώσιμα

- Σωληνάρια για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (cryovials ή cryotubes)
- Ειδικές φιάλες για ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων (Flasks)
- Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 mL, 50 mL)
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorfs (1.5 mL, 2.0 mL)
- Πιπέττες ορολογικές - Serological (2, 5, 10 και 25 mL)
- Ρύγχοι (0.2-10 μL, 20-200 μL και 100-1000 μL)
- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6x και 24x wells
- Καλυπτρίδες coverslips
- Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου

- Αιμοκυτταρόμετρο για μέτρηση κυττάρων, Neubauer
- Αυτόματος πιπεταδόρος

### 3.2.7 Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν κατά κύριο λόγο δυο τύπου καρκινικές κυτταρικές σειρές, νευρικού ιστού. Αυτές ήταν οι:

#### 1) N<sub>2</sub>A wt

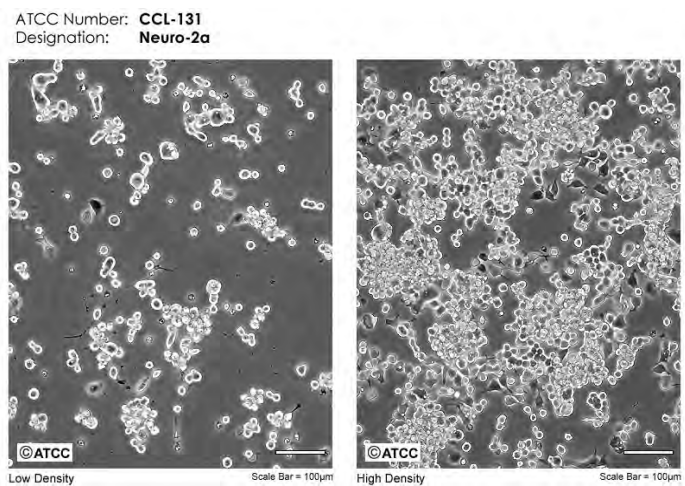
**Πληροφορίες από ATCC:** Organism: Mus musculus, mouse

Cell Type: Neuroblast

Tissue: Brain

Disease: Neuroblastoma

Product Format: frozen



*Παρουσίαση της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς (**N<sub>2</sub>A wt**) από την επίσημη ιστοσελίδα της εταιρίας (<http://www.lgcstandards-atcc.org>)*

#### 2) SH-SY5Y

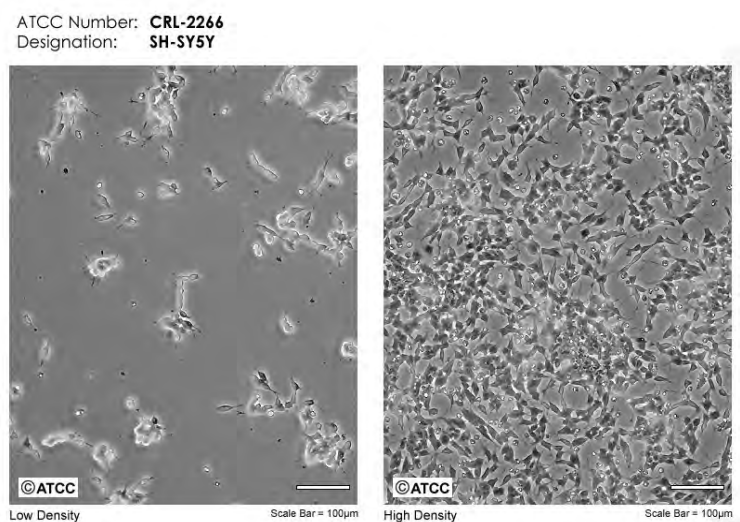
**Πληροφορίες από ATCC:**

Organism: Homo sapiens, human

Tissue: Bone Marrow

Disease: Neuroblastoma

Product Format: frozen

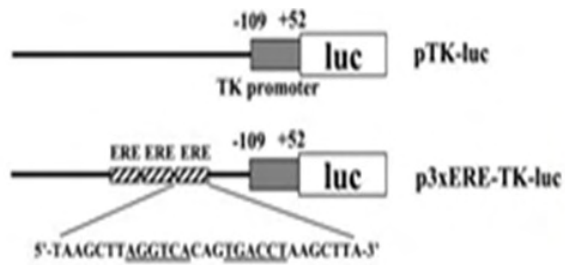
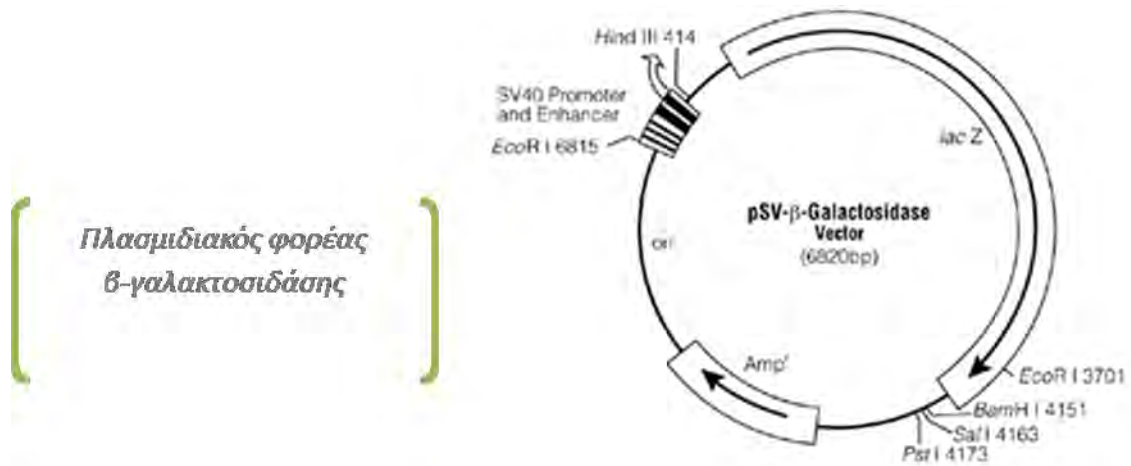


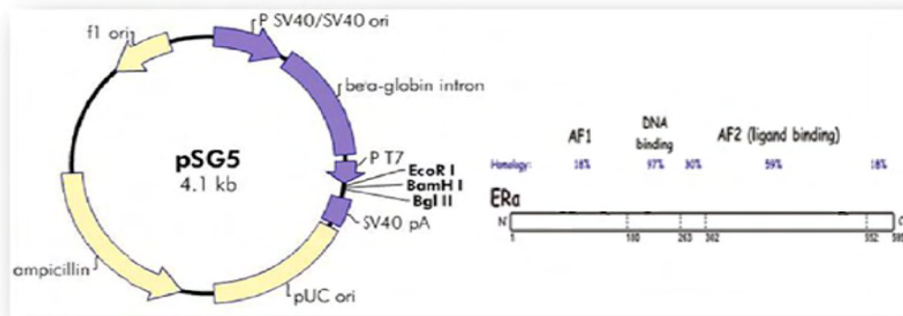
*Παρουσίαση της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς (**SH-SY5Y**) από την επίσημη ιστοσελίδα της εταιρίας (<http://www.lgcstandards-atcc.org>)*



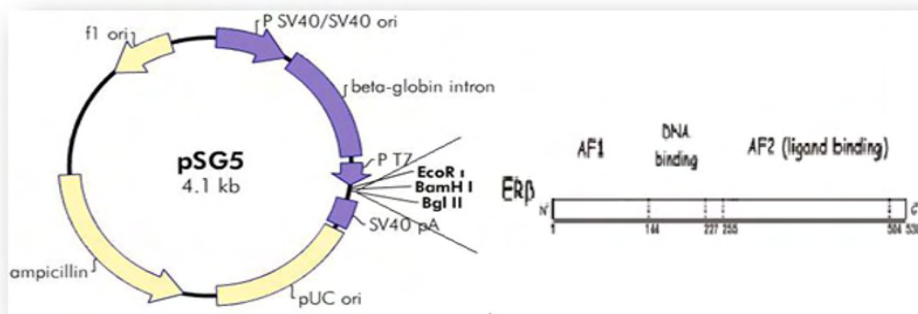
### 3.2.8 Πλασμιδιακοί φορείς

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις διαδικασίες της παροδικής διαμόλυνσης είναι οι ακόλουθοι:





*pSG5 ERα*



*pSG5 ERβ*

### 3.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ

#### 3.3.0α Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Προκειμένου να παραληφθούν προς χρήση οι πλασμιδιακοί φορείς τους οποίους χρησιμοποιήσαμε στα πειράματα παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων, έλαβε χώρα η διαδικασία μετασχηματισμού δεκτικών εντεροβακτηρίων, *E. Coli*, στελέχους DH5α, τα οποία ήταν αποθηκευμένα σε 30-40 % γλυκερόλη στους -80 °C, με τη μέθοδο θερμικού σοκ (heat-shock).

Σε πλαστικό σωληνάριο errendorf (1.5 mL) που περιέχει 80  $\mu$ L *E. coli* DH5a προστέθηκε 1  $\mu$ L του επιθυμητού πλασμιδίου (stock, -20 °C), δουλεύοντας στον πάγο και αφέθηκε προς επώαση στους 4 °C για  $\geq$  30 min. Ακολούθως, το errendorf μεταφέρθηκε για 1 min σε υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 42 °C. Έπειτα τοποθετήθηκε στους 4 °C για 2 min και ακλούθησε η προσθήκη 1 mL αποστειρωμένου LB. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στους 37 °C για 1 h και κατόπιν έγινε επίστρωση 1/500 του αρχικού όγκου σε τριβλίο με LB-άγαρ το οποίο ήταν επιστρωμένο με το κατάλληλο αντιβιοτικό, αμπικιλίνη (amp) ή καναμυκίνη (kan), σε συγκέντρωση 100  $\mu$ g/mL ή 50  $\mu$ g/mL, αντίστοιχα. Υπό στείρες συνθήκες εφαρμόστηκε η μέθοδος της διασποράς με γυάλινο διανομέα και η επώαση των βακτηριακών κυττάρων γίνεται στους 37 °C για ~16 h.

### 3.3.0β Απομόνωση pDNA από μετασηματισμένα βακτηριακά κύτταρα σε μεσαία κλίμακα (midi prep)

Μετά το πέρας του απαραίτητου χρόνου επώασης, λαμβάνει χώρα ο καθαρισμός και τελικός η απομόνωση των πλασμιδίων σύμφωνα με το πρωτόκολλο της QIAGEN χρησιμοποιώντας το plasmid midi kit για πλασμίδια υψηλών αντιγράφων (QIAGEN®, 2012).

Απομονώθηκαν τα πλασμίδια: pSV40- $\beta$ Gal και pTK-ERE-Luc, pSG5-ER $\alpha$  και pSG5-ER $\beta$  για την κλωνοποίηση των οποίων χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli* στελέχους DH5a, όπως προαναφέρθηκε στην παραπάνω παράγραφο. Τα stock διαλύματα πλασμιδιακού DNA ελέγχθηκαν για την καθαρότητά τους και ποσοτικοποιήθηκε η περιεκτικότητά τους σε pDNA με φασματοφωτομέτρηση (UV/Vis) σε αραιώση 1:200. Αποθηκεύθηκαν στους -20 °C.

### 3.3.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

#### 3.3.1.1 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ cis-FBS

Για την απενεργοποίηση του FBS, δηλαδή την απόρριψη όλων των ενεργών βιολογικών συστατικών του, όπως είναι λ.χ οι ορμόνες, προς παρασκευή cis-FBS εφαρμόστηκε κατεργασία με ενεργό άνθρακα σύμφωνα με το πρωτόκολλο καθαρισμού (Sigma, n.d.).

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 εκτίμηση της επίδρασής τους μετά την εξωγενή τους προσθήκη, η οποία και είναι απαραίτητη για την περαιτέρω μελέτη και την πρόοδο του πειράματος.

### 3.3.1.2 ΞΕΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

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

Αρχικά πρέπει να προετοιμαστούν τα πάντα προκειμένου μόλις ξεπαγώσει το vial να τοποθετηθούν τα κύτταρα στο θρεπτικό και να έρθουν κατά το δυνατόν σε λιγότερη επαφή με το DMSO το οποίο υπήρχε κατά τη φύλαξή τους.

Έχοντας ξεπαγώσει, βγάλει, και τοποθετήσει με λασκαρισμένα τα καπάκια, στο hood, όλα τα θρεπτικά, τοποθετούμε 4 ml θρεπτικού υλικού DMEM 4,5 g/mol Glucose σε δοκιμαστικό σωλήνα Falcon των 15 ml. Επιπλέον, βγάζουμε μία νέα φλάσκα καλλιέργειας, ανοίγουμε ελαφρώς το καπάκι και τοποθετούμε κάθετα στο hood. Κατόπιν, εξάγεται το cryovial από την κατάψυξη και τοποθετείται εντός του υδατόλουτρου. Δεν αφήνουμε το cryovial, αλλά το κρατάμε, προσέχοντας το νερό να μην έρχεται σε επαφή με το καπάκι αλλά ταυτόχρονα να καλύπτει τον μεγαλύτερο όγκο του παγωμένου περιεχομένου.

Μετά την πάροδο μερικών λεπτών (συνήθως 3-4 min) το περιεχόμενο του cryovial υγροποιείται και φαίνεται εντός του μία μικρή ποσότητα πάγου. Στη φάση αυτή, το βγάζουμε γρήγορα από τα υδατόλουτρο, σκουπίζουμε και ψεκάζουμε με αιθανόλη 70%. Αμέσως, το τοποθετούμε στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar flow hood). Εκεί, τοποθετούμε άμεσα το vial σε στατώ και ανοίγουμε γρήγορα και κάθετα το καπάκι του, προσέχοντας να μην έρθει σε επαφή η αιθανόλη με τα κύτταρα. Κατόπιν με σιφώνιο των 2 ml παίρνουμε το περιεχόμενο και το τοποθετούμε στον δοκιμαστικό σωλήνα με τα 4 ml θρεπτικού.

Το 15άρι falcon με το θρεπτικό και τα κύτταρα φυγοκεντρείται για 5 min σε 1000 rpm και σε θερμοκρασία άνω των  $20^{\circ}\text{C}$  ( $20-25^{\circ}\text{C}$ ). Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης γράφουμε τα στοιχεία των κυττάρων στη φλάσκα (όνομα κυτταρικής σειράς, ημερομηνία παγώματος και ξεπαγώματος, passage).

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο αναρροφάται με γυάλινη πιπέτα Pasteur και κατόπιν το ίζημα επαναδιαλύεται καλά, σε 5 ml θρεπτικού μέσου, DMEM 1 g/mol Glucose (low Glucose) -για τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία. Τέλος, το επαναδιαλυτοποιημένο περιεχόμενο λαμβάνεται με 5άρα ή 10άρα πιπέτα και τοποθετείται στη φλάσκα. Εκεί, γίνεται ξανά ήπια επαναδιαλυτοποίηση και κλείνοντας τη φλάσκα, βγάζουμε οριζόντια από το hood, την τοποθετούμε στο μικροσκόπιο και εξετάζουμε τη μορφή των ξεπαγωμένων κυττάρων. Φυσιολογικά, τα νευρικά κύτταρα, πρέπει να είναι επιπλέοντα, πολλά, σχετικά μεγάλα, στρογγυλά, μαύρα και χωρίς συσσωματώματα.

Μετά τη μικροσκοπική παρατήρηση, τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο, σε συνθήκες  $37^{\circ}\text{C}$  και 5.0 %  $\text{CO}_2$ .

### 3.3.1.3 ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, η θρυψίνη επιδρά σπάζοντας τους δεσμούς μεταξύ των κυττάρων και τις διάφορες προσκολλήσεις που κάνουν τα κύτταρα στην επιφάνεια της φλάσκας. Αυτό είναι αναγκαίο σε περιπτώσεις κορεσμού (πλήρους κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας), σε περιπτώσεις πολλών και μεγάλων συσσωματωμάτων αλλά και πριν από τους περισσότερους χειρισμούς που απαιτείται η χρήση ή η μεταφορά κυττάρων. Η κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα passage.

Ξεπαγώνει η θρυψίνη και τα θρεπτικά υλικά και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 37°C . Αφαιρείται με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό που υπάρχει στη φλάσκα και τοποθετείται 1-1,5 ml θρυψίνη. Η φλάσκα κλείνει και με ήπιες κινήσεις, επιδιώκουμε όλα τα κύτταρα να διαβρέχονται από θρυψίνη. Παρατηρούμε γρήγορα στο μικροσκόπιο. Τοποθετούμε άμεσα τη φλάσκα στον επωαστικό κλίβανο για 1- 2 λεπτά. Βγάζουμε αμέσως μετά το πέρας (συνήθως του πρώτου λεπτού), εξετάζουμε στο μικροσκόπιο: ιδανικό είναι όλα τα κύτταρα – μεμονωμένα ή σε συσσωματώματα, να επιπλέουν. Αν αυτό δεν συμβαίνει, μπορούμε να ταρακουνήσουμε ελαφρά τη φλάσκα και να ξανά παρατηρήσουμε ή να τοποθετήσουμε για μισό λεπτό και πάλι στον κλίβανο. Προσέχουμε ιδιαίτερα τον χρόνο έκθεσης των κυττάρων στη θρυψίνη, γιατί η παρατεταμένη πρωτεόλυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροτοξική δράση.

Κατόπιν, τοποθετείται η φλάσκα σε όρθια θέση στο hood και προστίθενται σε αυτή 4 ml θρεπτικού μέσου, τα οποία και σταματούν τη δράση της θρυψίνης. Έπειτα, όλο το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε falcon των 15ml και φυγοκεντρείται (5min 1000rpm, 20-25 °C).

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται περαιτέρω ή επανατοποθετούνται στη φλάσκα ανάπτυξης.

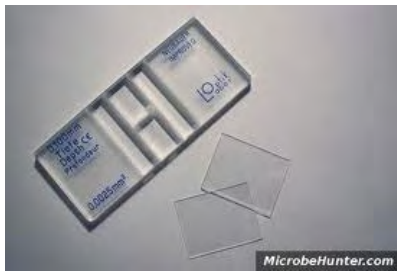
### 3.3.1.4 ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ξεπαγώνουμε τα συστατικά που θα χρειαστούμε και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 37°C. Αυτά είναι, FBS, θρυψίνη και τα θρεπτικά που χρησιμοποιούμε. Ετοιμάζουμε παράλληλα και δύο καινούριους σωλήνες για το πάγωμα των κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη- cryovial. Πάνω στα δύο cryovial γράφουμε τα στοιχεία των κυττάρων που πρόκειται να παγώσουμε (όνομα, ημ/νια, passage). Συνήθως παγώνουμε δύο- δύο cryovial αλλά αυτό εξαρτάται κι από το συνολικό αριθμό των κυττάρων που έχουμε, από το αν και πόση ποσότητα ανακαλλιέργεια θα βάλουμε και λοιπά.

Υπολογίζουμε πόσα ml από το FBS χρειαζόμαστε (για δύο cryovial και ανακαλλιέργεια). Ξεκινάμε και κάνουμε τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, όπως αυτή περιγράφηκε στην παραπάνω παράγραφο. Μόλις τελειώσει η φυγοκέντριση, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύεται στην ποσότητα του βόειου ορού που έχει υπολογιστεί προηγουμένως. Κατόπιν, σε κάθε cryovial τοποθετούνται 0,9 ml FBS με τα κύτταρα. Το υπόλοιπο, επανατοποθετείται στη φλάσκα και συμπληρώνεται (έως τα 5ml) DMEM Low Glucose. Η φλάσκα επανατοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο. Γενικά, προσέχουμε να τακτοποιήσουμε όλες τις «εκκρεμότητες» στο γύρω χώρο πριν προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα του παγώματος.

Μόλις είμαστε έτοιμοι, τοποθετούμε 0,1 ml DMSO (εξαιρετικά κυτταροτοξικό), κλείνουμε άμεσα το cryovial και με συνεχόμενη ανάδευση πάνω- κάτω, τοποθετούμε σε κατάψυξη, κατά το γρηγορότερο δυνατόν. Τέλος, σημειώνεται σε κατάλληλο αρχείο, η θέση του/ των cryovial.

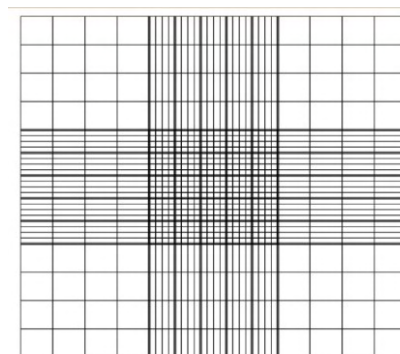
### 3.3.1.5 ΜΕΤΡΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ



Για τους μετέπειτα χειρισμούς των κυττάρων (πχ. στρώσιμο σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6× και 24× wells), για να προστεθούν ουσίες και κατόπιν συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος να μετρηθεί με ανοσολογικές μεθόδους η κυτταρική απόκριση, για προετοιμασία

παροδικής ή μόνιμης διαμόλυνσης (transfection), για μετέπειτα εξέταση με ανοσοϊστοχημικές τεχνικές (IHC) και λοιπά, απαιτείται μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού και ισόποση τοποθέτησή του σε well plate.

Κατά τη διαδικασία λοιπόν του μετρήματος του κυτταρικού πληθυσμού, ξεκινάμε με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης. Μετά την επαναδιαλυτοποίηση (που στην περίπτωση της μέτρησης πρέπει να είναι κατά το δυνατόν τέλεια), παίρνουμε 10μL (με κατάλληλη πιπέτα) από τα κύτταρα και τα εισάγουμε εντός της καλυπτρίδας στο αιμοκυτταρόμετρο neubauer (φαίνεται στην εικόνα αριστερά).



Κατόπιν τοποθετούμε την πλάκα neubauer στο μικροσκόπιο. Εκεί, εστιάζουμε στα τεταρτημόρια και ξεκινάμε να μετράμε για κάθε ένα τα κύτταρα που βρίσκονται εκεί.

Όπως, φαίνεται και στην εικόνα δεξιά, αρχικά εστιάζουμε στο σταυρό και κατόπιν από το κέντρο του μπορούμε να ξεχωρίσουμε τα τεταρτημόρια (αλλά και να προσανατολιστούμε).

Συνήθως το 1<sup>ο</sup> πάνω αριστερά τεταρτημόριο, ονομάζεται A, το αμέσως διπλανό του B, κάτω από το B είναι το Γ και αριστερά του Γ (δηλ. κάτω από το A ) είναι το Δ. Έτσι, η μέτρηση γίνεται από το A→Δ. Για κάθε τεταρτημόριο, σημειώνεται ο αριθμός των κυττάρων που βρέθηκε. Κατόπιν, βγαίνει ο μέσος όρος των κυττάρων ανά τεταρτημόριο:  $\mu.o.=(A+B+\Gamma+\Delta)/4$  και αυτός έπειτα πολλαπλασιάζεται με 10.000. Έτσι, ξέρουμε κατά προσέγγιση τον κυτταρικό πληθυσμό που διαθέτουμε, ανά ml.

Έπειτα, για να υπολογιστούν τα ml (από το επαναδιαλυτοποιημένο κυτταρικό ίζημα της φυγοκέντρησης)- και έχοντας ήδη υπολογίσει ανάλογα με το τι θα κάνουμε μετά, το συνολικό πληθυσμό που χρειαζόμαστε, κάνουμε το εξής:

«διαιρούμε→ (κύτταρα που θέλουμε )/ (κύτταρα που έχουμε)»

Η διαίρεση αυτή μας δίνει τον όγκο που πρέπει να πάρουμε από το falcon που περιέχει τα κύτταρα, προκειμένου να συνεχιστεί η πειραματική διαδικασία η οποία επιτελείται. Επειδή, συνήθως έχει περάσει αρκετή ώρα από την πρώτη επαναδιαλυτοποίηση, αυτή γίνεται εκ νέου, ώστε ο κυτταρικός πληθυσμός να είναι ομοιογενής στο θρεπτικό.

Ο όγκος που λαμβάνεται, τοποθετείται σε νέο falcon, προκειμένου να φυγοκεντρηθεί (όμοια, 5 λεπτά 1000rpm 20-25°C) εκ νέου -μόνο ο κυτταρικός πληθυσμός που θα χρησιμοποιηθεί εν συνεχεία, τα υπόλοιπα κύτταρα συνήθως επιστρέφονται για ανακαλλιέργεια.

Ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που επιτελείται, μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, επαναδιαλυτοποιούμε στην υπολογισμένη ποσότητα θρεπτικού και μοιράζουμε στα wells που θα χρειαστούμε.

Στην περίπτωση δε, που απαιτείται η μελέτη του αποτελέσματος της κυτταρικής αποκρίσεως με ανοσοϊστοχημεία, έχει προηγηθεί το στρώσιμο καλυπτρίδων (coverslips) εντός των wells στο plate. Μετά την τοποθέτηση των καλυπτρίδων, που γίνεται στον χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών, το plate παραμένει στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής, ανοιχτό και υπό τη δράση του UV light, για τουλάχιστον μισή ώρα, προκειμένου να είναι πλήρως αποστειρωμένο. Η πλάκα που φέρει καλυπτρίδες, κατά τη διαδικασία του στρωσίματος αντιμετωπίζεται όμοια με αυτή που δε φέρει.

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

### 3.3.1.6 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΟΔΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ (TRANSFECTION)

Στόχος της συγκεκριμένης διαδικασίας, είναι η επιτυχής πρόσληψη ενός πλασμιδιακού φορέα και κατόπιν, η επιτυχής έκφραση του γονιδίου που φέρει ο φορέας αυτός, από τον κυτταρικό ξενιστή. Αυτό, μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους, η βασική αρχή όμως είναι μία: απαιτείται η ύπαρξη μίας ουσίας ή ενός μηχανισμού που να καταστήσει την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου διαπερατή (είτε ανοίγοντας μικροσπές είτε μέσω μικρών κυστιδίων και τη διαδικασία της ενδοκύττωσης κτλ), στο πλασμιδιακό DNA. Η είσοδος του πλασμιδίου στα κύτταρα (γεγονός σχετικά δύσκολο), τα καθιστά εν δυνάμει ικανά να εκφράσουν το γονίδιο που αυτό φέρει.

Επειδή, μέρος της παρούσης εργασίας αφορά την επίτευξη των συνθηκών που καθιστά τα νευρικά κύτταρα ικανά/ δεκτικά να υπόκεινται σε διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς, δοκιμάστηκαν τρεις κύριοι διαφορετικοί τρόποι παροδικής διαμόλυνσης καθώς και με βάση αυτούς, διαφορετικοί πρακτικοί χειρισμοί (λ.χ στην προσθήκη των συστατικών, την ανάδευση και λοιπά).

*\*οι αναλογίες που αναφέρονται παρακάτω αφορούν την ποσότητα αντιδραστηρίων που απαιτούνται για να γίνει παροδική διαμόλυνση σε 1 πηγαδάκι.*

#### A) Διαδικασία παροδικής διαμόλυνσης με τη χρήση **Lipofectamine 2000** \*

Κατά τη διαδικασία αυτή παρασκευάζονται δύο μίγματα. Στο πρώτο μίγμα προστίθενται: το πλασμιδιακό DNA (στην επιθυμητή ως προς τη lipofectamine αναλογία) μαζί με 25μl Optimem, ενώ στο δεύτερο μίγμα προστίθεται η lipofectamine μαζί με 25μl Optimem. Στα πειράματα που έλαβαν χώρα, η συνήθης αναλογία DNA/lipofectamine ήταν ½ ).

Τα δύο μίγματα παραμένουν ως έχουν για 5-10 λεπτά, εφόσον αναμιχθούν καλά. Κατόπιν, συντήκονται μεταξύ τους, αναδεύονται και τοποθετούνται για επώαση στο σκοτάδι για διάστημα μισής ώρας.

Μετά την πάροδο του καθορισμένου χρόνου επώασης, το μίγμα βγαίνει από το σκοτάδι και προστίθεται στο πηγαδάκι. Επειδή, η lipofectamine είναι τοξική για τα κύτταρα, απαιτείται η παύση επαφής της με τα κύτταρα, μετά από τέσσερις ώρες, όπου και αφαιρείται το Optimem και στη θέση του τοποθετείται το κλασικό θρεπτικό υλικό της κυτταρικής σειράς (DMEM Low Glucose).

#### B) Διαδικασία παροδικής διαμόλυνσης με τη χρήση διαλύματος φωσφορικών **CaCl<sub>2</sub>**

Αυτός ο τρόπος επίτευξης παροδικής διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων είναι αρκετά παλιός, πλην όμως αποτελεσματικός. Ουσιαστικά, γίνεται προσπάθεια μέσω της επαφής



των κυττάρων με το άλας, να εισάγουν τον πλασμιδιακό φορέα. Κατά την εκπόνηση της παρούσης διπλωματικής εργασίας έγινε πειραματισμός σε ένα αρκετά ευρύ σύνολο χειρισμών και διαφορετικών αναλογιών προκειμένου να εντοπισθούν οι βέλτιστες συνθήκες για τις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές.

Πρακτικά δοκιμάστηκαν αναλογίες (CaCl<sub>2</sub> / DNA): 3X, 5X

Τουλάχιστον μία ώρα πριν από την αρχή των διαδικασιών απαιτείται η αντικατάσταση του παλιού θρεπτικού μέσου με νέο, προκειμένου να είναι κατά το δυνατόν καλύτερο και κατ' επέκταση να βελτιστοποιούνται οι συνθήκες διαμόλυνσης.

Η συνήθης, λοιπόν, διαδικασία απαιτεί τη δημιουργία δύο μιγμάτων. Στο πρώτο μίγμα εισάγεται το HBS 2x και στο δεύτερο μίγμα εισάγεται ddH<sub>2</sub>O, pDNA και CaCl<sub>2</sub>, (ανάλογα με την επιθυμητή αναλογία). Κατά την προσθήκη των συστατικών του δεύτερου μίγματος, είναι εξαιρετικά σπουδαίο να γίνεται πολύ καλή ανάδευση για μην κατακρημνιστεί το άλας, γεγονός που θα επηρεάσει κατά πολύ την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας.

Μόλις ετοιμαστούν τα δύο αυτά μίγματα, παραμένουν σε ηρεμία για 10 λεπτά και κατόπιν το δεύτερο μίγμα προστίθεται στο πρώτο. Η προσθήκη αυτή, πρέπει να γίνει όσο γίνεται σε περισσότερα στάδια (ουσιαστικά γίνεται στάγδην υπό συνεχή ανάδευση και των δύο μιγμάτων). Μετά την ομογενοποίησή του, το νέο μίγμα, παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου, για μισή ώρα.

Μόλις επέλθει το μισάωρο, προστίθεται το μίγμα στο πηγαδάκι- και πάλιν στάγδην με συνεχή κυκλική ανακίνηση του plate.

Επειδή, πρακτικά δεν είναι δυνατή η στάγδην προσθήκη υπό αέρινη ανάδευση, δοκιμάστηκαν επιπλέον χειρισμοί βελτίωσης της αποτελεσματικότητας της τεχνικής. Αναφορικά με τους χειρισμούς αυτούς, έλαβαν χώρα τα εξής:

- Αντί για κλασικό θρεπτικό μέσο προστέθηκε optimum και κατόπιν το ολικό μίγμα εισήχθη στο πηγαδάκι κατά 1μL x30 φορές
- Χρησιμοποιήθηκε κανονικά DMEM low Glucose και κατόπιν το ολικό μίγμα εισήχθη στο πηγαδάκι κατά 1μL x30 φορές
- Το θρεπτικό από το πηγαδάκι αναρροφήθηκε, ενώθηκε και ομογενοποιήθηκε με το ολικό μίγμα της αντίδρασης. Έπειτα από καλή ανάδευση τοποθετήθηκε εκ νέου στα κύτταρα
- Τυπικός τρόπος

### 3.3.1.7 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η προσθήκη ουσιών, είναι ένας από τους λόγους που επιλέγεται η τοποθέτηση των κυττάρων σε πλάκες με (πηγαδάκια well plates). Ουσιαστικά, σε κάθε πηγαδάκι προστίθεται μία διαφορετική χημική ουσία (συνήθως οι υπό μελέτη ουσίες), ενώ σε κάποιο από τα wells δεν τοποθετείται ουσία (control) και σε κάποιο άλλο τοποθετείται η φυσική ουσία (ως θετικός μάρτυρας). Κατόπιν, εφόσον τα κύτταρα επωάζονται με τις ουσίες για συγκεκριμένο χρόνο, αυτές αφαιρούνται και γίνεται λύση και συλλογή τους με απώτερο σκοπό την περαιτέρω μελέτη (συνέχεια εργασίας εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών). Η τελευταία διαδικασία είναι αποκαλείται harvesting.

Κατά την παρούσα εργασία η ουσία η οποία μελετήθηκε ήταν το άλας του αργιλίου, συγκεκριμένα ACH, το οποίο έχει φανεί να έχει οιστρογονική δράση. Έτσι, ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η E2 (17β-οιστραδιόλη) και ως αρνητικός μάρτυρας το ICI 182,780 (7α,17β-(9-((4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl)nonyl)estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol) το οποίο και δρα ως αγωνιστής του υποδοχέα των οιστρογόνων.

Παρακάτω, παρουσιάζεται ένα παράδειγμα για την προσθήκη των συγκεκριμένων ουσιών, σε 6x well plate (2ml / well)+1 well από άλλο well plate :

Πρώτα γίνεται παρασκευή των επιθυμητών συγκεντρώσεων από τα stock που διατίθενται.

Για το ACH, υπάρχει σε αρχικό stock 7,5 M και προστίθεται στα κύτταρα σε συγκέντρωση 0,01M προκειμένου να αραιωθεί και να έχει τελικώς συγκέντρωση ίση με 0,0001 M. Άρα, σε 990 μl ddH<sub>2</sub>O προστίθενται 150 μl ACH και αναδεύονται καλά. Η τωρινή συγκέντρωση ισούται με 1 M. Από το ACH (1M) αραιώνονται 100 μl σε 900 μl δις απεσταγμένου ύδατος. Η τελική συγκέντρωση τώρα είναι 0,1 M.

Η E2 βρίσκεται σε απόθεμα σε συγκέντρωση 10<sup>-6</sup> M, αν όχι χρησιμοποιώντας τον νόμο της αραιώσης, μπορεί να προκύψει η ζητούμενη συγκέντρωση. Η οιστραδιόλη, έχει ως διαλύτη την αιθανόλη.

Το ICI είναι σε απόθεμα σε συγκέντρωση 10<sup>-3</sup> M και τοποθετείται σε συγκέντρωση 10<sup>-4</sup>M. Διαλύτης του είναι το DMSO.

Επομένως:

Well No1: Control, 2ml DMEM cis +2μl EtOH+ 2 μl ddH<sub>2</sub>O +2 μl DMSO

Well No2: E2, 2ml DMEM cis +2 μl E2(10<sup>-6</sup>M)+ 2 μl ddH<sub>2</sub>O+2 μl DMSO

Well No3: ACH, 2ml DMEM cis +2 μl EtOH+ 2μl ACH (10<sup>-1</sup> M) +2 μl DMSO

Well No4: E2+ACH, 2ml DMEM cis +2 μl E2(10<sup>-6</sup>M)+ 2 μl ACH (10<sup>-1</sup> M) +2 μl DMSO

Well No5:ICI, 2ml DMEM cis +2 μl EtOH +2 μl ddH<sub>2</sub>O +2 μl ICI 10<sup>-4</sup>M

Well No6: E2+ICI, 2ml DMEM cis +2 μl E2( $10^{-6}$ M) +2 μl ddH<sub>2</sub>O +2 μl ICI  $10^{-4}$ M

Well No7: ACH+ICI, 2ml DMEM cis +2 μl EtOH+2 μl ACH 0,1M +2 μl ICI  $10^{-4}$ M

Μετά την τοποθέτησή τους, τα well plates τοποθετούνται εκ νέου στον επωαστικό κλίβανο και παραμένουν εκεί για 2-3 ή 4-5 μέρες.

Μετά το πέρας των δεδομένων ημερών γίνεται απόξεση (Harvesting) και λύση των κυττάρων.

Κατά τη διαδικασία της απόξεσης από το πηγαδάκι, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, γίνεται μία πλύση με PBS 1X, άμεσα και κατόπιν τοποθετείται το Lysis Buffer 1X, (εάν απαιτείται γίνεται προηγουμένως αραίωση) 70μl/well. Ολόκληρη η πλάκα εξάγεται από τον χώρο των κυτταροκαλλιεργειών και τοποθετείται για μισή ώρα σε ψυχρό θάλαμο υπό ανάδευση. Μόλις, επέλθει το μισάωρο- εφόσον έχουν ετοιμαστεί άδεια erpendorfs (ένα για το κάθε πηγαδάκι), το περιεχόμενο των wells αποξινείται με ειδικό εργαλείο ή με το τιπ της πιπέτας. Το Lysis Buffer συλλέγεται με τα κύτταρα στα erpendorfs. Μετά από αυτό μπορεί να γίνει αμέσως φυγοκέντρηση (15.000 rpm, 5min, 4 °C) και κατόπιν λύση με υπερήχους και μέτρηση συνολικής πρωτεΐνης, με τη μέθοδο Bradford, ή να φυλαχθούν τα δείγματα σε βαθειά κατάψυξη (-80 °C) και να προχωρήσουμε παρακάτω σε δεύτερο χρόνο.

### 3.3.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

#### 3.3.2.1α Ενζυμικός προσδιορισμός δραστικότητας λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης

Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα έπειτα από τη διαδικασία της παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων. Οι πλασμιδιακοί φορείς (στην προκειμένη μελέτη) φέρουν: 1) τη β-γαλακτοσιδάση και 2) το ERE στοιχείο, συνδεδεμένο με το γονίδιο της λουσιφεράσης, έτσι ώστε στα κύτταρα που θα προστεθεί οιστραδιόλη, να εκφραστεί το γονίδιο και να καταλυθεί η αντίδραση.

Το πρωτόκολλο αυτό αποτελείται από δύο ξεχωριστές διαδικασίες: αυτή της μέτρησης της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης και αυτή της μέτρησης ενεργότητας της λουσιφεράσης. Η τιμές που λαμβάνονται από τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, είναι εκείνες με τις οποίες πραγματοποιείται η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

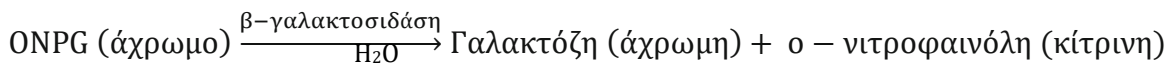
#### A) Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης (b- gal assay):

Επειδή, η έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης δεν εξαρτάται από τη μεταγραφική δραστηριότητα του ER (alpha/ beta), μπορεί με αυτόν τον τρόπο να γίνει αντιληπτό πόσο

αποτελεσματική ήταν η διαδικασία της παροδικής διαμόλυνσης που έλαβε χώρα και επιπλέον, μπορεί να είναι εφικτή η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων από τη ERE- Luc.

#### Αρχή της μεθόδου:

Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης προσδιορίζεται με μελέτη της υδρόλυσης του χρωμογόνου υποστρώματος 2-Nitrophenyl b-D-galactopyranoside (ONPG), όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση.



Η αντίδραση καταστέλλεται με προσθήκη διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M (R.T.), το οποίο διαμορφώνει την τιμή του pH στο 11. Στο συγκεκριμένο pH η β-γαλακτοσιδάση απενεργοποιείται και η ο-νιτροφαινόλη σταθεροποιείται στην ανιονική της μορφή κίτρινου χρώματος (Miller, 1972).

Το ποσό της ο-νιτροφαινόλης που σχηματίζεται μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με φασματοφωτομέτρηση των διαλυμάτων σε  $\lambda=420$  nm.

#### Πειραματική διαδικασία:

Η διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το τροποποιημένο πρωτόκολλο των Bengs και Leonhardt (2000) και έπεται της μεθόδου της διαμόλυνσεως κυττάρων. Κατά την πειραματική αυτή διαδικασία, όγκος ίσος με 20  $\mu\text{L}$  κυτταρικού εκχυλίσματος από το κάθε δείγμα αναμειγνύεται με 0.3  $\mu\text{L}$  διαλύματος ιόντων  $\text{Mg}^{2+}$  100x και 201  $\mu\text{L}$  διαλύματος sodium phosphate.

Το διάλυμα ιόντων  $\text{Mg}^{2+}$  αποτελείται από 31.5 % v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 10 % v/v  $\text{MgCl}_2$  και 58.5 % v/v ddH<sub>2</sub>O. Τελευταίο και σχεδόν ταυτόχρονα σε όλα, προστίθεται το υπόστρωμα της αντίδρασης, ONPG, όγκου 66  $\mu\text{L}$ . Τα δείγματα αναδεύονται και αφήνονται προς επώαση στους 37 °C μέχρι την ανάπτυξη επαρκούς έντασης κίτρινου χρώματος (30 min είναι ο ιδεατός χρόνος ανάπτυξης της απαιτούμενης έντασης, πολλές φορές όμως, κατά την εκπόνηση της συγκεκριμένης πειραματικής διεργασίας απαιτήθηκε πολύ περισσότερος χρόνος). Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 500  $\mu\text{L}$  διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M.

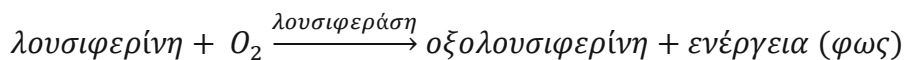
Μετά το σταμάτημα της αντίδρασης, τα δείγματα φασματοφωτομετρούνται στα 420 nm, αφού προηγηθεί ο μηδενισμός του μηχανήματος με τον τυφλό σωλήνα. Ο τυφλός σωλήνας περιέχει ό,τι και τα υπόλοιπα διαλύματα με τη διαφορά πως αντί για δείγμα έχουν προστεθεί 20  $\mu\text{L}$  από το χρησιμοποιηθέν Lysis Buffer.

## B) Δοκιμασία λουσιφεράσης

Κατά τη δοκιμασία αυτή, είναι ήδη γνωστό ότι η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση υπόκειται στον μεταγραφικό έλεγχο του ER, καθώς βρίσκεται καθοδικά ενός υποκινητή που φέρει επαναλαμβανόμενες ERE αλληλουχίες. Χρησιμοποιείται, έτσι, ως γονίδιο αναφοράς, δίνοντας πληροφορίες που αφορούν στη μεταγραφική ενεργότητα των κυττάρων που έχουν υποστεί διαμόλυνση (transfection) με τη συγκεκριμένη μοριακή κατασκευή.

### Αρχή της μεθόδου:

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



Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε δύο μέρη και καταλύεται από το ένζυμο λουσιφεράση (το ένζυμο αυτό έχει εισαχθεί με τον πλασμιδιακό φορέα), παρουσία συμπαραγόντων όπως το ATP ή τα  $\text{Ca}^{2+}$ . Η ενεργότητά της προσδιορίζεται με μέτρηση του παραγόμενου φωτός σε λουμινόμετρο (Berthold Technologies, LuBat 39508) και εκφράζεται σε μονάδες RLU.

### Η Πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει:

Την προσθήκη όγκου 20  $\mu\text{L}$  από το κυτταρικό εκχύλισμα κάθε δείγματος και την ανάμιξή του με 100  $\mu\text{L}$  διαλύματος υποστρώματος λουσιφεράσης. 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  $\text{dH}_2\text{O}$  μέχρι τη συμπλήρωση του απαιτούμενου όγκου. Το κρίσιμο σημείο αυτής της τεχνικής είναι ο χρόνος έκθεσης του δείγματος στο διάλυμα της λουσιφερίνης. Αυτός πρέπει να είναι αυστηρά ίσος με 5''. Έτσι, απαιτείται πλήρης τήρηση του χρόνου επώασης και μέτρησης, δεδομένου ότι μόνον έτσι τα αποτελέσματα είναι αξιόπιστα.

### 3.3.2.1β ΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (SONICATION) ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ (ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD)

Κατά τη διαδικασία του sonication, ουσιαστικά, θέλουμε να επιτύχουμε κατά το δυνατόν μεγαλύτερη λύση των κυττάρων. Συνήθως, επαναλαμβάνουμε 4 κύκλους 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 διάστημα ίσο με ένα λεπτό.

Εφόσον ολοκληρωθούν οι δεδομένοι κύκλοι, τα δείγματα είναι πλέον έτοιμα για περαιτέρω επεξεργασία. Στην προκειμένη περίπτωση, γίνεται μέτρηση του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου, με τη μέθοδο Bradford. Αυτό αποσκοπεί στον μετέπειτα υπολογισμό της ποσότητας από τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθεί για να γίνει ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Η μέθοδος Bradford έχει βασική αρχή την αλλαγή της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία υπό όξινες συνθήκες, μπορεί από την κόκκινη να μετατραπεί στη μπλε μορφή της, προσδεδεμένη με τις πρωτεΐνες που εμπεριέχονται στο προς εξέταση διάλυμα. Η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα 595nm.

Από πρακτικής άποψης, ετοιμάζονται τόσο δοκιμαστικοί σωλήνες όσα και τα δείγματα που διαθέτουμε +1 ακόμη, που θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό, για το μηδενισμό του φωτομέτρου. Επειδή, το απόθεμα του αντιδραστηρίου Bradford που διατίθεται στο εργαστήριο είναι 5X, χρησιμοποιώντας το νόμο της αραίωσης προκύπτει το επιθυμητό 1X. Από αυτό, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται 1ml αντιδραστηρίου Bradford και κατόπιν σχεδόν παράλληλα σε όλα, 1μL από το κάθε δείγμα. Μετά από άμεσο vortex, τα δείγματα τοποθετούνται σε σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Μόλις ολοκληρωθεί ο χρόνος αντίδρασης, τα δείγματα αφαιρούνται από το σκοτάδι και φωτομετρούνται στα 595nm, μετά από μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου με το τυφλό.

Η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος υπολογίζεται από τον τύπο  $y=0,0345x+0,01$ , όπως αυτός προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA, που έγινε στο εργαστήριο.

Τα δεδομένα αναλύονται με τη βοήθεια του προγράμματος excel, παρέχοντας τελικώς την ακριβή σύσταση των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση.

### 3.3.2.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ- ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Μετά τον υπολογισμό της σύστασης των δειγμάτων που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, προχωρούμε στην παρασκευή τους. Τα δείγματα ηλεκτροφόρησης περιέχουν τα εξής:

- Συνολικό κυτταρικό εκχύλισμα (Total cell extract)
- Tris HCl pH 7,5
- SB 4X 20μl (σταθερή ποσότητα)

\* Οι υπόλοιποι όγκοι καθορίζονται ανάλογα με την πρωτεϊνική συγκέντρωση του κυτταρικού εκχυλίσματος, ο δε τελικός όγκος είναι 80ml

Μετά την ετοιμασία τους, τα δείγματα φόρτωσης παραμένουν στον πάγο. Παράλληλα ξεκινάμε την κατασκευή της πηκτής πολυ-ακρυλαμίδης. Πρωτίστως, παρασκευάζεται η γέλη διαχωρισμού (separating gel), η σύσταση της οποίας περιλαμβάνει τα εξής (περιεκτικότητας 12%):

ddH <sub>2</sub> O	2,175 ml
1,5 M Tris HCl pH= 8,8	1,25 ml
SDS 10%	50μl
Bis Acr. 40%	1,5 ml
Temed	2,5 μl
APS 10%	25 μl

Για να ξεκινήσουμε την όλη διαδικασία, πρέπει να έχει ετοιμαστεί και στηθεί η συσκευή κατασκευής του gel. Ουσιαστικά, πρέπει να εφαρμοστούν και να κλείσουν σωστά τα δύο τζάμια, να τοποθετηθούν στη βάση τους και να γίνει έλεγχος για τυχόν διαρροή. Είναι επίσης σημαντικό, κατά την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού να μπουν τα συστατικά με τη σειρά που παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα. Τα δε τελευταία τρία συστατικά, απαιτείται να εισαχθούν κατά το δυνατόν ταυτόχρονα.

Μόλις ετοιμαστεί το gel, αναδεύεται και άμεσα, εγχύεται μεταξύ των δύο τζαμιών. Ταυτόχρονα, στην πάνω περιοχή μένει ένα κενό 2-3 εκατοστών για να τοποθετηθεί σε δεύτερο χρόνο το gel προσκόλλησης. Στο κενό εκείνο τοποθετείται ισοπροπανόλη, προκειμένου να διατηρηθεί υγρό, κατά το χρόνο πήξης του υπόλοιπου όγκου του. Ο χρόνος πήξης είναι περίπου μισή ώρα.

Με την πάροδο του χρόνου πήξης, ξεκινάμε τη δημιουργία του gel προσκόλλησης, η σύσταση του οποίου είναι η ακόλουθη:

ddH <sub>2</sub> O	2,025 ml
Tris HCl pH= 6,8	0,21ml
SDS 10%	25 μl
Bis Acr.40%	0,25 ml
Temed	2,5 μl
APS 10%	12,5 μl

Κατά την δημιουργία του gel αυτού, πριν εισαχθούν τα τρία τελευταία συστατικά, που είναι άκρως σημαντικό να μπουν σχεδόν ταυτόχρονα και το gel να εισαχθεί στη βάση του, αφαιρείται η ισοπροπανόλη από το πάνω μέρος του διαχωριστικού gel, με απόχυσή της στο πλάι. Κατόπιν, τοποθετούνται τα τρία τελευταία συστατικά, γίνεται γρήγορα ομογενοποίηση και τέλος αποχύνεται το νέο gel στα τζαμάκια στη βάση, προκειμένου να πήξει και παράλληλα να κολλήσει με το gel διαχωρισμού. Αμέσως μόλις αποχυθεί το υγρό gel, εισάγονται τα χτενάκια που θα δημιουργήσουν τα πηγαδάκια φόρτωσης. Ο δε χρόνος πήξεως είναι 30 λεπτά της ώρας.

Ενώ αναμένεται η ολοκλήρωση της αντίδρασης πολυμερισμού της ακρυλαμίδης, ενεργοποιούμε τη συσκευή Heat Blocker, ρυθμίζοντας τη θερμοκρασία στους 95°C. Παράλληλα, στήνουμε και τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στήνοντας την ειδική κασετίνα και κατόπιν γεμίζοντας εξωτερικά με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (δεύτερης χρήσης). Εφόσον, έχει πήξει το gel, τα τζαμάκια εξάγονται από τη βάση τους και τοποθετούνται στην κασετίνα που έχουμε εισάγει στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Έπειτα, αφαιρείται το χτενάκι, προκειμένου να ετοιμαστούν τα πηγαδάκια. Μόλις όλα αυτά ετοιμαστούν, γεμίζουμε ως το χείλος, εντός της κασετίνας με φρέσκο διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Σε επόμενο στάδιο, εξάγουμε τα δείγματα από τον πάγο και τα τοποθετούμε στο Heat Blocker (5min ή 3min ανάλογα με το αν έχουν υποστεί ξανά θέρμανση ή όχι).

Τέλος, τα δείγματα υπόκεινται σε ελαφρό spin για χρόνο 3'' και κατόπιν, φορτώνονται στα πηγαδάκια. Ο όγκος φόρτωσης για τα δείγματα είναι συνήθως 20 μl και παράλληλα, σε παρακείμενο πηγαδάκι, φορτώνονται 5 μl δείκτη γνωστού μοριακού βάρους.

Μετά την ολοκλήρωση της φόρτωσης των δειγμάτων, τοποθετείται προσεχτικά, το καπάκι με τα ηλεκτρόδια της συσκευής. Είναι πολύ σημαντικό, τα χρώματα των επαφών και των ηλεκτροδίων να ταυτίζονται. Ενεργοποιείται και ρυθμίζεται το τροφοδοτικό ρεύματος στα 0,02 mA. Ξεκινάμε την εφαρμογή της τάσης. Το gel αφήνεται να «τρέξει» για όσο χρόνο χρειαστεί.

Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία, απενεργοποιείται το τροφοδοτικό και γίνονται οι προετοιμασίες για να γίνει ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

### 3.3.2.3 ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΙΣΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ

Καθώς ολοκληρωθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ξεκινάει το επόμενο στο βήμα, στο οποίο γίνεται η εξισορρόπηση, δηλαδή η εμβάπτιση της μεμβράνης, των σφουγγαριών, των χαρτιών whatman, καθώς και του gel, στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς για 10 λεπτά. Πρακτικά, σε δοχείο που χωράει τη μεμβράνη, τα χαρτιά whatman και τα σφουγγαράκια,



τοποθετείται φρέσκο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και εμβαπτίζονται όλα τα παραπάνω μέσα σε αυτό.

Παρομοίως, σε δεύτερο δοχείο, τοποθετείται χρησιμοποιημένο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και εμβαπτίζεται εντός του το gel. Μετά το πέρας του δεκαλέπτου, στήνεται η κασετίνα στην οποία θα τοποθετηθούν τα περιεχόμενα των δύο δοχείων.

Κατά το στήσιμο αυτής της κασετίνας, εργαζόμαστε ως εξής:

Η κασετίνα τοποθετείται ανοιχτή, με την μαύρη πλευρά προς τα κάτω και την άσπρη προς τα πάνω. Στην κάτω πλευρά, τοποθετείται πρωτίστως, ένα σφουγγαράκι, όχι πολύ στραγγισμένο και έπειτα δύο χαρτιά Whatman. Παίρνοντας το δεύτερο χαρτί Whatman από το διάλυμα, επιχειρείται η ταυτόχρονη «αλίευση» και της μεμβράνης, η οποία τοποθετείται ακριβώς πάνω από το δεύτερο χαρτί. Κατόπιν το gel τοποθετείται ακριβώς πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, προσέχοντας όσο γίνεται να είναι ευθυγραμμισμένο με αυτή αλλά και όλες οι περιοχές που έχουν μπάντες να εφάπτονται στη μεμβράνη. Μετά, τοποθετούνται εκ νέου δύο χαρτιά Whatman. Εν ολίγοις, η όλη κατασκευή είναι τύπου sandwich! Σημαντικό είναι, σε κάθε βήμα από την τοποθέτηση της μεμβράνης και έπειτα να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην πλήρη εφαρμογή των αντικειμένων μεταξύ τους, διότι η ύπαρξη φυσαλίδων, θα έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη κενών σημείων στη μεμβράνη. Τέλος, τοποθετείται και το δεύτερο σφουγγαράκι, κλείνοντας την κασετίνα και τοποθετώντας τη στη συσκευή που θα γίνει η ηλεκτρομεταφορά.

Η συσκευή αυτή είναι πολύ σημαντικό να είναι βυθισμένη σε πάγο γιατί, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται από την εφαρμογή της τάσης και από το κύκλωμα που δημιουργείται κατά την ηλεκτρομεταφορά, ενδέχεται να προκληθεί πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών που μεταφέρονται. Έχοντας, λοιπόν, ήδη τοποθετήσει την παγοκύστη εντός της συσκευής, τοποθετούμε την κασετίνα με συγκεκριμένη φορά και κατόπιν γεμίζουμε όλο το δοχείο με φρέσκο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς. Τοποθετείται τέλος, το καπάκι με τα ηλεκτρόδια, προσέχοντας να γίνει στη σωστή πλευρά η εφαρμογή και ενεργοποιείται το τροφοδοτικό. Η διαδικασία αυτή, απαιτεί τάση ίση με 0.35 A και χρόνο πραγματοποίησης 70 λεπτά.

#### 3.3.2.4 Blocking με γάλα και επώαση με το πρώτο αντίσωμα

Μόλις επέλθει ο χρόνος ηλεκτρομεταφοράς, το τροφοδοτικό απενεργοποιείται και η μεμβράνη (που πλέον φέρει τις πρωτεΐνες που είχαν ηλεκτροφορηθεί), τοποθετείται εντός PBST 1x προκειμένου να σημειωθεί ο δείκτης γνωστού μοριακού βάρους με μολύβι, και να μαρκαριστεί παράλληλα και η «καλή» της πλευρά. Με αυτό τον τρόπο, η μεμβράνη εκτός των άλλων έχει πλυθεί με PBST 1x για μία φορά.

Στη συνέχεια, έπεται το επόμενο βήμα, το οποίο έχει ως σκοπό την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων από τα αντισώματα που εμπεριέχονται στο γάλα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα εμφάνισης ψευδούς θετικού αποτελέσματος (ή μεγάλου Background), λόγω μη

ειδικής σύνδεσης του αντισώματος (που θα εφαρμοστεί). Η διαδικασία αυτή, περιλαμβάνει την επώαση της μεμβράνης (μία ώρα υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου), σε γάλα, 10%.

Παρασκευάζεται το διάλυμα του γάλακτος, αραιώνοντας δέκα μέρη σκόνης γάλακτος σε 100 μέρη PBST 1x και αναδεύοντας καλά για να γίνει η ομογενοποίησή του.

Μετά την πάροδο της μίας ώρας επώασης, γίνεται μία πλύση με PBST 1x και κατόπιν τοποθετείται η μεμβράνη στο πρώτο αντίσωμα. Σε αυτό το βήμα, το αντίσωμα που πρόκειται να επωαστεί η μεμβράνη, έχει ήδη βγει από τους -20°C και έχει τοποθετηθεί σε πάγο, προκειμένου να ξεπαγώσει ομαλά. Ενώ λοιπόν αυτό έχει ξεπαγώσει, αναδεύεται ομαλά για να ομογενοποιηθεί και κατόπιν ετοιμάζεται το σακουλάκι στο οποίο θα εισαχθεί η μεμβράνη για να επωαστεί με το αντίσωμα. Πρακτικά, η μεμβράνη περικλύζεται ορμητικά μεταξύ δύο νάιλον διαφανειών από τρία μέρη και πριν κλείσει και από το τέταρτο μέρος, εισάγεται σε αυτή την αυτοσχέδια σακούλα, το αντίσωμα. Κατόπιν, κλείνεται με θερμοκόλληση και από την τέταρτη πλευρά, τοποθετείται σε μεγάλο τριβλίο και εισάγεται στο coldroom, όπου θα παραμείνει εκεί υπό ανάδευση, για overnight επώαση.

Την επόμενη μέρα, το αντίσωμα μαζεύεται στο σωληνάκι (falcon) στο οποίο βρισκόταν, και η μεμβράνη πλένεται πέντε φορές με PBST 1x , προκειμένου να προετοιμαστεί για την προσθήκη του δεύτερου αντισώματος. Οι πλύσεις (5 πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία, σε R.T και υπό ανάδευση), έχουν ως σκοπό να διώξουν την περίσσεια του αντισώματος και επομένως να μείνει στη μεμβράνη μόνο ό,τι έχει δέσει ειδικά, δηλαδή στους συγκεκριμένους επίτοπους, για τους οποίους φτιάχτηκε και προστέθηκε το αντίσωμα.

### 3.3.2.5 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ -WESTERN BLOT

Το δεύτερο αντίσωμα προστίθεται, όντας ειδικό έναντι κάποιων επιτόπων του πρώτου αντισώματος (συνήθως το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά σταθερές περιοχές επιτόπων IgG του πρωτογενούς αντισώματος και είναι ειδικό του ζώου από το οποίο έχει παραχθεί). Επιπλέον, είναι χημικά προσδεδεμένο με κατάλληλο προσδέτη (HRP), που επιτρέπει την ανίχνευσή του. Εφόσον, λοιπόν, έχουν λάβει χώρα οι πλύσεις από την επώαση του πρώτου αντισώματος, γίνεται η ίδια διαδικασία για την προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος. Ο χρόνος επώασης για το δεύτερο αντίσωμα είναι περίπου μία ώρα.

Ενώ αφαιρείται το δευτερογενές αντίσωμα, γίνονται εκ νέου 4X πλύσεις με PBST 1X, διάρκειας 5 min η κάθε μία. Κατόπιν, ετοιμάζεται η κασετίνα προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης Western.

Η μεμβράνη τοποθετείται σε γυάλινη επιφάνεια και διαβρέχεται με τα διαλύματα ECL A και ECL B, τα οποία ουσιαστικά είναι αυτά που επιτρέπουν την εμφάνιση του σήματος. Γίνεται ανάμειξη κατάλληλου όγκου των δύο σε αναλογία 1:1 και με το διάλυμα αυτό επωάζεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για 3 min (σκοτάδι, R.T.). Ακολούθως, η μεμβράνη τοποθετείται εντός μιας πλαστικής διαφανούς μεμβράνης σε μία ειδική κασέτα που δεν επιτρέπει τη διέλευση του φωτός.

Κατόπιν, έπεται η διαδικασία της εμφάνισης σήματος, η οποία λαμβάνει χώρα στο σκοτεινό θάλαμο εμφάνισης. Εκεί, ετοιμάζεται κατάλληλα ο χώρος ούτως ώστε να είναι δυνατή η πραγματοποίηση όλων των κινήσεων σε απόλυτο σκοτάδι.

Η διαδικασία περιλαμβάνει, την τοποθέτηση κατάλληλου μήκους film εντός τη κασετίνας και την επαφή του με τη μεμβράνη για το χρόνο που απαιτείται. Έπειτα, το film εξάγεται από τη κασετίνα και εμβαπτίζεται διαδοχικά σε διάλυμα developer υπό ανάδευση για περίπου 1 min, ξεπλένεται ελαφρώς σε νερό και αμέσως τοποθετείται σε διάλυμα σταθεροποίησης σήματος fixer (ομοίως υπό ανακίνηση για χρονική διάρκεια περίπου ενός λεπτού). Μετά την ολοκλήρωση της εμβάπτισης του film στο fixer, αυτό ξεπλένεται σε νερό και κατόπιν εξετάζεται το αποτέλεσμα της εμφάνισης. Αναλόγως του αποτελέσματος επαναλαμβάνουμε, εκθέτοντας το film για διαφορετικό χρονικό διάστημα στη μεμβράνη.

### 3.3.2.6 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ (IHC)

Με την ανοσοϊστοχημική μελέτη, επιτρέπεται ο προσδιορισμός μορίων τοπικά, μέσα στον ιστό ή το κύτταρο που μελετάται με τη χρήση συγκεκριμένων, φθορίζοντων αντισωμάτων, ειδικά για κυτταρικά οργανίδια αλλά και για τα υπό μελέτη μόρια. Η αρχή της διαδικασίας, λαμβάνει χώρα στην αίθουσα των κυτταροκαλλιιεργειών, όπου πριν από την προσθήκη των κυττάρων στα ειδικά πηγαδάκια, τοποθετούνται καλυπτρίδες (coverslips). Μετά την τοποθέτησή τους, οι καλυπτρίδες αφήνονται για τουλάχιστον μισή ώρα υπό την ακτινοβολία του UV. Κατόπιν της αποστείρωσης, όλες οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα είναι όμοιες με εκείνες που αναλύθηκαν παραπάνω, για τη μέτρηση και το στρώσιμο των κυττάρων, την ενδεχόμενη παροδική διαμόλυνση και την προσθήκη ουσιών. Επιπλέον, όλοι οι κυτταρικοί χειρισμοί (αλλαγή θρεπτικού μέσου, φύλαξη, μικροσκοπική παρατήρηση), γίνονται κατά πανομοιότυπο τρόπο, είτε υπάρχουν είτε όχι καλυπτρίδες.

Εφόσον λοιπόν, έχουν γίνει όλοι οι απαραίτητοι πειραματικοί χειρισμοί, προκειμένου να εξεταστούν τα δείγματα ανοσοϊστοχημικά, απαιτείται ο χειρισμός τους με μία συγκεκριμένη μεθοδολογία, που περιλαμβάνει τη μονιμοποίηση (fixation), την προσθήκη πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων, και εν τέλη την προσκόλλησή των καλυπτρίδων σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες και την εξέταση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού.

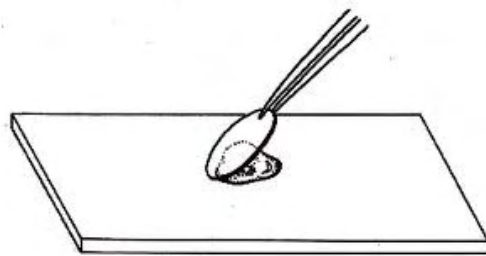
Συγκεκριμένα, η παραλλαγή στους χειρισμούς αρχίζει, στο στάδιο της προσθήκης των ουσιών, ενώ το βασικό επερώτημα είναι αν απαιτείται η χρώση και η παρατήρηση των μιτοχονδρίων, ή όχι. Εάν, όντως στη μελέτη πρέπει να συμπεριληφθούν και εικόνες από τα μιτοχόνδρια, τότε στα μίγματα που παρασκευάζονται για τις ουσίες, εισάγεται μαζί και η κόκκινη χρωστική των μιτοχονδρίων, CMXROS. Ο ελάχιστος χρόνος επαφής της χρωστικής με τα ζώντα κύτταρα είναι τριάντα λεπτά.

Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα η διαδικασία της μονιμοποίησης. Από το στάδιο αυτό και έπειτα, δεν απαιτούνται στείρες συνθήκες, γι' αυτό και συνήθως εργαζόμαστε εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών. Η διαδικασία, περιλαμβάνει δύο συνεχόμενες πλύσεις με κρύο PBS 1X και κατόπιν την προσθήκη παγωμένης (συνήθως βρίσκεται σε βαθειά κατάψυξη στους  $-80^{\circ}\text{C}$ ), τόση όση να καλύπτει όλη την επιφάνεια (περίπου 500  $\mu\text{l}$ ). Τα δείγματα, τοποθετούνται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , σε ευθεία θέση, για διάστημα 10 min. Κατόπιν, αναρροφάται η μεθανόλη. Εάν στα δείγματα είχε προστεθεί η κόκκινη μιτοχονδριακή χρωστική CMXROS, απαιτείται και άμεση προσθήκη ακετόνης (κατά τον ίδιο τρόπο) και η άφεση τους σε θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$  για 3min.

Εάν, έχει χρησιμοποιηθεί ακετόνη: με την πάροδο των 3 min, αναρροφούμε την ακετόνη και αφήνουμε τις καλυπτρίδες (περι 20 δευτερολέπτων), προκειμένου η περίσσεια της να εξατμιστεί. Λόγο της υψηλής διαβρωτικής δράσης της ακετόνης προσθέτουμε PBS 1X και μεταφέρουμε τις καλυπτρίδες σε νέα, μη διαβρωμένα πηγαδάκια, που ήδη περιέχουν PBS 1X.

Εάν δεν έχει τοποθετηθεί ακετόνη, το παραπάνω βήμα παραλείπεται και κατόπιν, πραγματοποιούνται 2X πλύσεις με PBST 1X, και τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε μέρος κατάλληλο για την προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος.

Γίνεται δε, η παρασκευή του πρωτογενούς αντισώματος, (σε αναλογία 1/50) και μία σταγόνα (25  $\mu\text{l}$ ) από το διάλυμα του αντισώματος τοποθετείται επί της καλυπτρίδας, και αφήνεται στο σκοτάδι και σε R.T, να επωαστεί για μία ώρα.



Με τη πάροδο του χρόνου επώασης, έπονται δύο πλύσεις με PBST 1X και κατόπιν η προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος.

Το δευτερογενές αντίσωμα, περιλαμβάνει (για τις δικές μας πειραματικές προσεγγίσεις που ως πρωτογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε κυρίως ο ER  $\beta$  H150), το anti- R-Alexa 488, σε αναλογία 1/500 (σε PBST 1X clear) και 0,25  $\mu\text{l}$  Hoechst (μπλε χρωστική των πυρήνων).

Τοποθετούνται 50  $\mu\text{l}$  σε κάθε καλυπτρίδα και αφήνονται υπό τις ίδιες συνθήκες για μία ώρα επώαση. Τέλος, ακολουθούν δύο εκ νέου πλύσεις με PBST 1X και η κόλληση τους από

την πλευρά που έχουν γίνει οι επώσεις (με την προσθήκη μίας σταγόνας PVA, στην αντικειμενοφόρο πλάκα). Οι αντικειμενοφόρες πλάκες, τοποθετούνται σε ειδική κασετίνα, όπου αφήνονται στους 4°C, να στεγνώσουν.

Σε δεύτερο χρόνο γίνεται η παρατήρηση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού και η συλλογή εικόνων με τα αποτελέσματα.

### 3.3.2.7 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

#### 3.3.2.7.α. Απομόνωση DNA με τη βοήθεια του PureLink™ Genomic DNA Mini kit, της invitrogen.

Για την απομόνωση του DNA από κάθε δείγμα (N<sub>2</sub>A και SHSY5Y) ακολουθήσαμε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- α. Θέτουμε το heat block στους 55°C.
- β. Προσθέτουμε σε ένα erpendorf (1.5 ml) 20μl Proteinase K.
- γ. Φυγοκεντρούμε το κάθε δείγμα σε 1000 rpm και αφαιρούμε το υπερκείμενο, δηλαδή το θρεπτικό μέσο, ενώ το ίζημα περιλαμβάνει τα κύτταρα.
- δ. Διαλυτοποιούμε το ίζημα με 200 μl PBS και τα μεταφέρουμε στο erpendorf που περιέχει την Proteinase K.
- ε. Προσθέτουμε 20 μl RNase A. Αναδεύουμε έντονα με χρήση vortex επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
- στ. Προσθέτουμε 200 μl PureLink™ Genomic Lysis/ Binding Buffer και αναδεύουμε με χρήση vortex μέχρι να ομογενοποιηθεί το διάλυμα.
- ζ. Επωάζουμε στους 55°C για 10 λεπτά με σκοπό την πέψη των πρωτεϊνών.
- η. Προσθέτουμε 200 μl 96-100% αιθανόλη και αναδεύουμε καλά μέχρι ομογενοποίησης με χρήση vortex.
- θ. Αδειάζουμε το περιεχόμενο του erpendorf σε μία ειδική στήλη (PureLink™ Spin Column) και τοποθετούμε σε ένα καθαρό erpendorf.
- ι. Φυγοκεντρούμε στα 10.000 g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- ια. Αδειάζουμε το περιεχόμενο του erpendorf και προσθέτουμε 500μl Wash Buffer 1 στην στήλη.
- ιβ. Φυγοκεντρούμε στα 10.000 g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
- ιγ. ια. Αδειάζουμε το περιεχόμενο του erpendorf και προσθέτουμε 500μl Wash Buffer 2 στην στήλη.
- ιδ. Φυγοκεντρούμε σε 13.000 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αντικαθιστούμε το erpendorf με ένα καινούριο.
- ιε. Προσθέτουμε 50 μl PureLink™ Genomic Elution Buffer στην στήλη και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.

ιστ. Φυγοκεντρούμε σε 13.000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και τελικά το περιεχόμενο του erpendorf αποτελεί το DNA του δείγματος.

### 3.3.2.7.β. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Με την PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης, επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, «in vitro». Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA στόχος), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος. Το DNA στόχος επεκτείνεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές, σε σημείο που να είναι ανιχνεύσιμο. Αποτελεί το πρότυπο DNA στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων), που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA στόχου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση.

Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Στη συνέχεια, «υβριδίζονται» τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία καλούνται εκκινητές (primers), στις δύο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA (2<sup>ο</sup> στάδιο). Με τη δράση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και κατ'αυτόν τον τρόπο η αλυσίδα επεκτείνεται (3<sup>ο</sup> στάδιο). Έτσι σχηματίζονται δύο καινούριοι κλώνοι DNA συμπληρωματικοί προς αυτούς του πρότυπου DNA με αποτέλεσμα τον διπλασιασμό του DNA στόχου. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωση (denaturation), υβριδισμός των εκκινητών (primers annealing) και επέκτασης των εκκινητών με τη σύνθεση καινούριου κλώνου (extension), αποτελούν 1 κύκλο της αντίδρασης PCR.

Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται: DNA στόχος, εκκινητές (primers), τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), ένζυμο Taq DNA πολυμεράση, ιόντα  $Mg^{2+}$  απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με  $pH \approx 8.2$  για τη δράση του ενζύμου.

Στην παρούσα εργασία, τα δείγματά μας περιλαμβάνουν ένα αρνητικό control (το οποίο στερούταν DNA), ένα θετικό control (το οποίο προήλθε από μολυσμένη κυτταρική σειρά), ένα δείγμα από N<sub>2</sub>A και ένα δείγμα από SHSY5Y. Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούν 2 erpendorfs, όπου το ένα στο mix της αντίδρασης περιλαμβάνει εκκινητές για το μυκόπλασμα και το άλλο εκκινητές ακτίνης για κανονικοποίηση.

Στον πίνακα φαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε για το μυκόπλασμα και για την ακτίνη.

PRIMERS	Reverse	Forward
mycoplasma	CCRTGCACCACTGTCWHHHBGGWAAC CTC	GAAAGYGTGGGGAGCAAAYAGGATTAG ATA
actin	CGTTCGTCCGCATGGAGTCCT	GGAGCAATGATCTTGATCTT

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήσαμε ήταν το εξής:

Components	Volume	Final Concentration
10X PCR buffer minus Mg	10 µl	1X
10mM dNTP mixture	2 µl	0.2 mM each
50mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl	1.5 Mm
Primer mix (10mM each)	5 µl	0.5 µM each
Template DNA	1-20 µl	n/a
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0.2-0.5 µl	1.0-2.5 units
Autoclaved distilled water	To 100 µl	n/a

- α. Τα δείγματα επωάζονται στον θερμοκυκλοποιητή στους 94°C, για 3 λεπτά με σκοπό την πλήρη αποδιάταξη των αλυσίδων του DNA στόχου.
- β. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 35 κύκλους σύμφωνα με το ακόλουθο θερμικό προφίλ:

<b>Denature</b>	94°C	45 sec
<b>Anneal</b>	55°C	30 sec
<b>Extend</b>	72°C	1 min 30 sec

- γ. Μετά το τέλος της αντίδρασης, τα δείγματα επωάζονται για άλλα 10 λεπτά στους 72 °C και διατηρούνται στους 4 °C.

### 3.3.2.8 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (Real Time PCR)

#### 3.3.2.8.α. Απομόνωση ολικού RNA με TRIZOL

Η απομόνωση ολικού RNA, από κύτταρα SHSY5Y, έγινε με τη χρήση του χημικού αντιδραστήριου Trizol. Το Trizol, είναι ένα φωτοευαίσθητο αντιδραστήριο που φυλάσσεται στους 4°C και χρησιμοποιείται στην απομόνωση του RNA, DNA και πρωτεϊνών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του ολικού RNA. Όλα τα δείγματα διαλυτοποιούνται σε 0,5ml Trizol και έπειτα επωάζονται για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Με την πιπέτα αναδεύουμε ήπια μέχρι το μείγμα να γίνει ομοιογενές. Στη συνέχεια, προσθέτουμε ανάλογης ποσότητας (100 μl) CHCl<sub>3</sub> σε κάθε δείγμα, αναδεύουμε έντονα και τα δείγματα επωάζονται για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, φυγοκεντρώνονται όλα τα δείγματα για 15 λεπτά, στους 4 °C υπό 11.000 rpm. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης στο κάθε δείγμα σχηματίζονται 3 φάσεις. Η κάτω φάση περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες, η μεσαία περιλαμβάνει το DNA και η πάνω το ολικό RNA. Με πολλή προσοχή συλλέγουμε την πάνω φάση (ολικό RNA) σε νέο erpendorf για το κάθε δείγμα, προσθέτουμε 0,250 ml ισοπροπανόλης, αναδεύουμε πάρα πολύ καλά και αφήνουμε τα δείγματα για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στους 4 °C υπό 11.000 rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο, το οποίο περιλαμβάνει τον οργανικό διαλύτη και κρατάμε μόνο το ίζημα. Επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 1ml Αιθανόλη 80% και φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 5 λεπτά, στους 4 °C υπό 8.000 rpm. Στη συνέχεια αφαιρούμε πολύ προσεκτικά η αιθανόλη από όλα τα δείγματα. Προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα, αφήνουμε ανοικτά τα καπάκια των erpenorfs για να εξατμιστεί η αιθανόλη που έχει απομείνει. Τέλος, επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 15 μl ddH<sub>2</sub>O(extra clear) και αποθηκεύονται στους -80 °C.

Στη συνέχεια, είναι απαραίτητο να γίνει η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του ολικού RNA που έχει απομονωθεί από το κάθε δείγμα ξεχωριστά. Πραγματοποιήθηκε αραίωση 1 μl RNA προς 99 μl ddH<sub>2</sub>O σε όλα τα δείγματα, ακολούθησε φωτομέτρηση στα 260nm και κανονικοποίηση στα 280nm.

#### 3.3.2.8.β. Πέψη με DNase

Προκειμένου να απομακρυνθεί το DNA που πιθανόν να έχει παραμείνει στα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο RQ1 RNase-Free DNase (Promega), με το οποίο επιτυγχάνεται η αποικοδόμηση τόσο του δίκλωνου όσο και του μονόκλωνου DNA, σχηματίζοντας ελεύθερα 3' -OH άκρα.

Στην αντίδραση πέψης με DNases, είναι απαραίτητο να υπάρχει σε κάθε δείγμα 2μg RNA. Η ποσότητα του RNA που πρέπει να προστεθεί για κάθε δείγμα, υπολογίζεται με την μέθοδο των τριών. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο RQ1 RNase-Free DNase, προσθέτουμε στο



κάθε δείγμα 1μl Reaction Buffer x10, 2μl από το ένζυμο DNase και συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O για τελικό όγκο 10 μl. Στη συνέχεια ακολουθούν οι εξής διαδικασίες:

- α. Θέρμανση των δειγμάτων στους 37 °C για 30 λεπτά.
- β. Προσθήκη 1 μl σε κάθε δείγμα από το αντιδραστήριο RQ1 DNase Stop Solution για να σταματήσει η αντίδραση.
- γ. Θέρμανση όλων των δειγμάτων στους 65 °C για 10 λεπτά.

#### 3.3.2.8.γ. Αντίστροφη Μεταγραφή, RT-PCR

Με την RT-PCR πραγματοποιείται η μετατροπή του RNA σε cDNA. Για να επιτευχθεί αυτή η μετατροπή εφαρμόσαμε το πρωτόκολλο SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Τα βήματα που ακολουθήσαμε για την διαδικασία σύνθεσης του cDNA έχουν ως εξής:

- α. Σε ένα tube των 0,2ml, προσθέτονται τα εξής αντιδραστήρια:

<b>Random Primers</b>	1μl
<b>dNTPs (10mM)</b>	1μl
<b>Total RNA</b>	2μl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	12μl

- β. Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 65 °C για 5 λεπτά
- γ. Τα δείγματα παγώνονται άμεσα με την τοποθέτηση τους στο πάγο.
- δ. Απομακρύνουμε τα δείγματα από το πάγο και προσθέτονται τα εξής αντιδραστήρια σε κάθε tube:

<b>5x First-Stand Buffer</b>	4 μl
<b>DTT 1M</b>	2 μl
<b>RNaseOUT (40u/μL)</b>	1 μl

- ε. Αναδεύουμε ήπια όλα τα δείγματα
- στ. Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 25 °C για 2 λεπτά
- ζ. Προσθήκη 1μl από το ένζυμο SuperScript II RT και αναδεύω με την πιπέτα
- η. Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 25 °C για 10 λεπτά
- θ. Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 42 °C για 50 λεπτά
- ι. Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 70 °C για 15 λεπτά

### 3.3.2.8.δ. Real Time-PCR

Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μια πολύ ευαίσθητη τεχνική με μεγάλη εξειδίκευση καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός μεταγράφου. Επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων (mRNA) και τη παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου σε όλη τη διάρκεια της PCR. Έπειτα από την αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR διότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, ακολουθεί μία εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια στόχοι στο tube, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να ξεκινήσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις.

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Στην παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο SYBR Select Master Mix (Applied Biosystem). Το Master Mix αποτελεί μίγμα AmpliTaq DNA πολυμεράσης (UP), SYBR GreenER χρωστικής, dNTPs, UDG ενζύμου, ROX χρωστική αναφοράς και ρυθμιστικό διάλυμα.

Συγκεκριμένα, κάθε tube περιείχε για τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl:

<b>SYBR Green</b>	10 μl
<b>Εκκινητής 1</b>	0,5 μl
<b>Εκκινητής 2</b>	0,5 μl
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	7 μl
<b>cDNA</b>	2 μl

Το θερμικό προφίλ που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

<b>UDG Activation</b>	1 κύκλος	2 min, 52°C
<b>AmpliTa<sub>q</sub> Fast DNA Polymerase Activation</b>	1 κύκλος	2 min, 95°C
<b>Denature</b>	35 κύκλοι	15 sec, 95°C
<b>Anneal / Extend</b>		50 sec, 60°C

Αυτή η πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε σε καρκινικά νευρικά κύτταρα SHSY5Y, τα οποία εκτέθηκαν για 6 ώρες στις χημικές ουσίες C, E2, ACH, ICI, ICI+E2 και ICI+ACH. Ο χρόνος έκθεσης των 6 ωρών καθορίστηκε ύστερα από πειραματικές δοκιμές, που είχαν σκοπό να εξακριβώσουν τον χρόνο έκθεσης, στον οποίο τα επίπεδα έκφρασης των cDNA των μορίων που μελετήσαμε ήταν η μέγιστη. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται τα μόρια που μελετήσαμε (ERβ, Cu/ZnSOD, Catalase, MnSOD και Bcl-2) και οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε για το καθένα.

PRIMERS	Reverse seq	Forward seq
ER β	AAGATGTAGAGCGGGCCTTT	GCATGACAGATTTCTACCACTCC
MnSOD	GAATAAGGCCTGTTGTTCCCTTG	ATCAAACGTGACTTTGGTTCCT
Cu/ZnSOD	ACCGTGTTTTCTGGATAGAGGA	CAATTCGAGCAGAAGGAAAGT
Catalase	GGATGAGAGGGTAGTCCTTG	TTCCCAGGAAGATCCTGACTA
Bcl-2	AGTCTTCAGAGACAGCCAGGAG	GATTGTGGCCTTCTTTGAGTTC
GAPDH	AGTCCTTCCACGATACCAAAGT	CATGAGAGTATGACAACAGCCT

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών προηγήθηκε η εξής διαδικασία: Αρχικά, ανατρέξαμε στη βάση δεδομένων PubMed, προκειμένου να βρούμε την αλληλουχία του γονιδίου για κάθε ένα μόριο που μελετήσαμε. Με τη βοήθεια του προγράμματος Primer3 (version 0.4.0), σχεδιάσαμε το ζεύγος των εκκινητών. Στη συνέχεια, ελέγξαμε την εξειδίκευση του κάθε ζεύγους ως προς την αλληλουχία του γονιδίου του αντίστοιχου μορίου, με τη χρήση Nucleotide BLAST. Τέλος, με τη βοήθεια του προγράμματος Multiple Primer Analyzer της Thermo Scientific, αποκλείσαμε τη πιθανή δημιουργία διμερών μεταξύ των εκκινητών, αλλά και αυτοδιμερών.

Ο ακριβής καθορισμός των επιπέδων mRNA πραγματοποιήθηκε με τη σύγκριση των επιπέδων ενός γονιδίου αναφοράς, του GAPDH. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε triplicates. Για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών στην αντίδραση συμπεριλήφθηκε ως αρνητικό control, NTC (No Template Control), δηλαδή αντίδραση που στερούνταν δείγματος cDNA.

#### 4. ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Αρκετά από τα αποτελέσματα που θα παρουσιαστούν παρακάτω αλλά κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, απαιτήθηκε υπολογιστική επεξεργασία. Συγκεκριμένα, κατά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης υπάρχουσας πρωτεΐνης, με τη χρήση της μεθόδου Bradford και έπειτα κατά τον υπολογισμό της σύστασης του δείγματος ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε το Microsoft Office Excel. Για την λήψη των εικόνων από το μικροσκόπιο

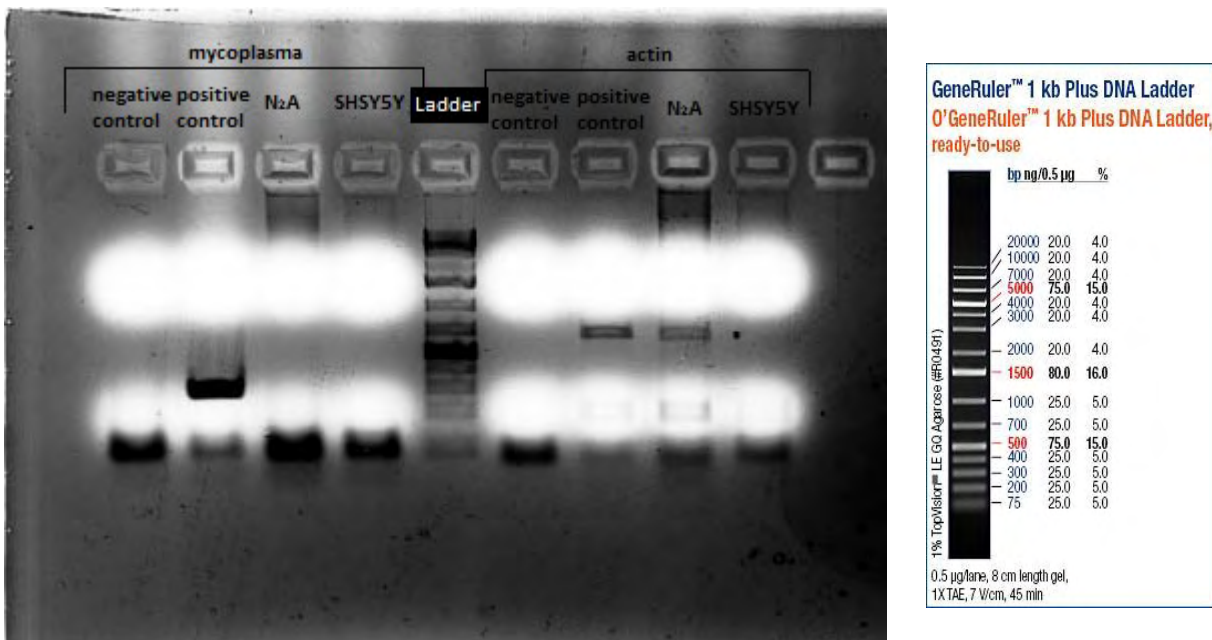
φθορισμού, χρησιμοποιήθηκε η ψυχόμενη κάμερα Optimos και το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων, Q-Capture Pro.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 5.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ N<sub>2</sub>A ΚΑΙ SHSY5Y

Κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών κρίθηκε απαραίτητο να ελεγχθεί η καθαρότητα των κυτταρικών σειρών N<sub>2</sub>A και SHSY5Y από μυκόπλασμα. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος, προηγήθηκαν 3 διαδικασίες: η απομόνωση του DNA από δείγμα που λήφθηκε από κάθε κυτταροκαλλιέργεια, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του γονιδίου του μυκοπλάσματος (αν υπάρχει) και ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Ολοκληρώνοντας τα 2 πρώτα βήματα, δηλαδή την απόμονωση του γενετικού υλικού κάθε κυτταρικής σειράς και την PCR, ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 1,5%. Στην πηκτή φορτώθηκαν με τη σειρά τα δείγματα: 1. Αρνητικό (Negative) δείγμα αναφοράς (control) 2. Θετικό (Positive) control 3. N<sub>2</sub>A 4. SH-SY5Y, τα οποία κλωνοποιήθηκαν με χρήση εκκινητών για μυκόπλασμα, 5. GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder και στη συνέχεια, με την ίδια σειρά, τα δείγματα που κλωνοποιήθηκαν με χρήση υποκινητών για την ακτίνη. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης και έκθεσης του πηκτώματος σε UV ελήφθησε η παρακάτω εικόνα:



**Εικόνα 1.** Αριστερά βλέπουμε το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης ύστερα από έκθεση της πηκτής σε ακτινοβολία UV. **Δεξιά** βλέπουμε τα μεγέθη ζωνών DNA (σε bp) του Ladder.

Το προϊόν της PCR του μυκοπλάσματος έχει μέγεθος περίπου 434-468 bp. Παρατηρούμε ότι, τα προϊόντα των PCR των δειγμάτων N<sub>2</sub>A και SH-SY5Y δεν παρουσιάζουν ζώνη DNA στο μέγεθος των βάσεων, που παρουσιάζει το θετικό control. Άρα, οι κυτταρικές σειρές πιστοποιούνται απαλλαγμένες από πρόσμειξη μυκοπλάσματος.

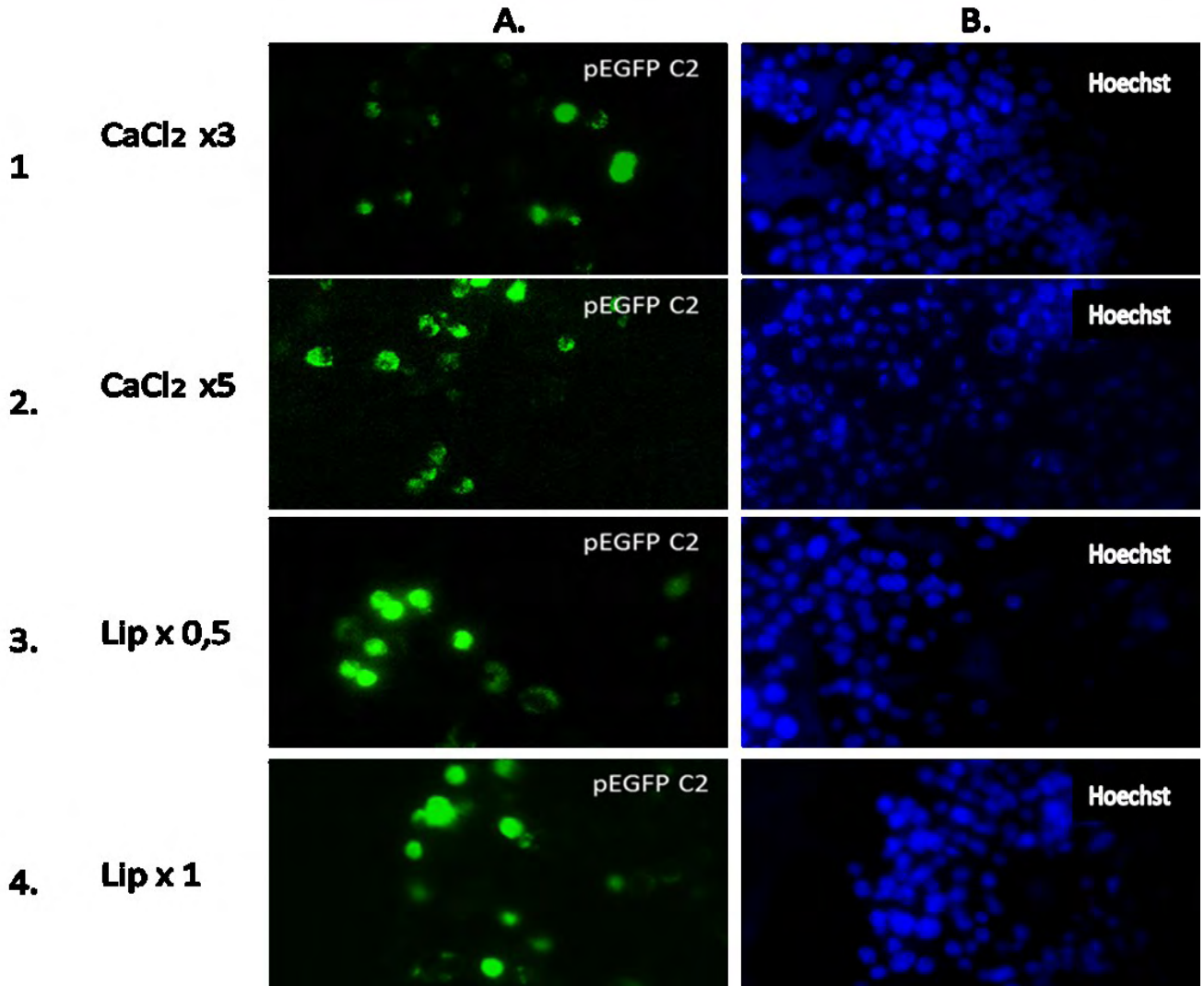
## 5.2 ΜΕΛΕΤΗ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΛΑΤΩΝ ΑΡΓΙΛΙΟΥ ΣΕ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Εφόσον, εξασφαλήσαμε την καθαρότητα των κυτταρικών σειρών, το επόμενο στάδιο της εργασίας είναι η διερεύνηση των συνθηκών της παροδικής διαμόλυνσης. Αυτό το στάδιο είναι προαπαιτούμενο για τον βασικό άξονα της εργασίας, που σχετίζεται με τη μελέτη της πιθανής οιστρογονικής δράσης ενώσεων αργιλίου στη δραστικότητα των οιστρογονικών υποδοχέων, καθώς επίσης και της πιθανής επίδρασής τους σε αντιοξειδωτικούς/αντιαποπτωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου συσχετιζόμενους με οιστρογονική δράση.

### 5.2.1 Μελέτη δεκτικότητας νευρικών κυττάρων N<sub>2</sub>A

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αλλά και με προηγούμενες πειραματικές δοκιμές, τα κύτταρα SH-SY5Y δεν είναι πολύ (εως καθόλου) δεκτικά σε παροδικές διαμολύνσεις. Έτσι, η διερεύνηση της οιστρογονικής δράσης του ACH έγινε μόνο στην κυτταρική σειρά N<sub>2</sub>A. Δεδομένου ότι η εκτίμηση του οιστρογονικής δράσης του ACH μπορεί να επιτευχθεί με μέτρηση της επίδρασης του ACH στην δραστικότητα των ενδογενών υποδοχέων, με τη μέθοδο της λουσιφεράσης, μέσω ενεργοποίησης της έκφρασης της γονιδίου αναφοράς, το οποίο βρίσκεται υπό τον έλεγχο οιστρογονοεξαρτώμενων αλληλουχιών DNA, πραγματοποιήθηκε έλεγχος βέλτιστων συνθηκών παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων και στην συνέχεια διαμόλυνση των N<sub>2</sub>A κυττάρων, υπό τις συνθήκες βέλτιστης διαμόλυνσης, με κατάλληλα πλασμίδια που φέρουν γονίδια λουσιφεράσης και γαλακτοσιδάσης, ώστε να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της επίδρασης του ACH στον έλεγχο της ενεργοποίησης της μεταγραφής, μετά από μέτρηση της δραστικότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης, της οποίας η σύνθεση έχει επιτευχθεί στα κύτταρα αυτά.

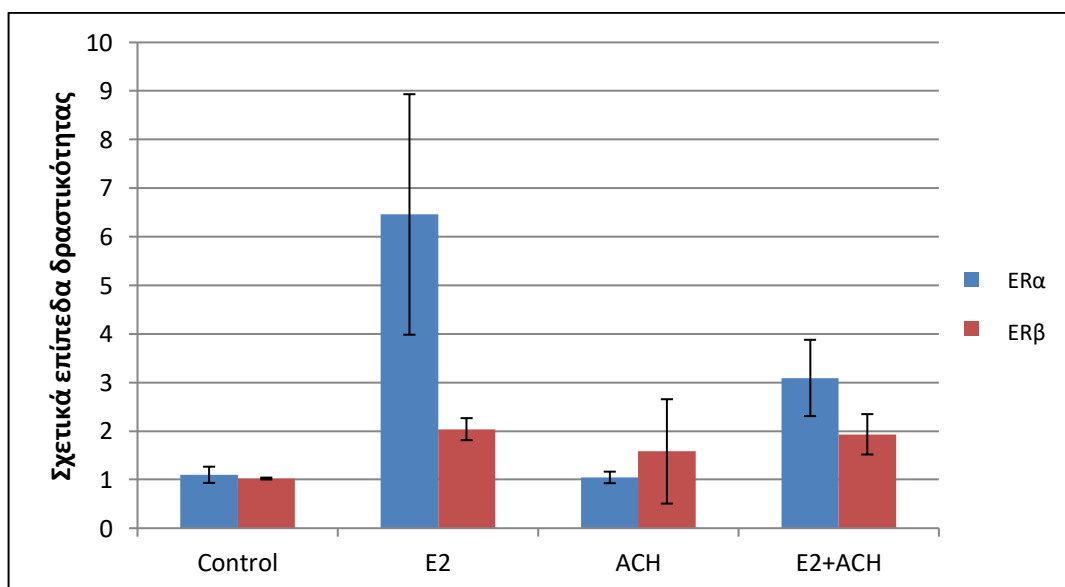
Η πιστοποίηση των βέλτιστων συνθηκών παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο ανοσοϊστοχημείας χρησιμοποιώντας ως πλασμιδιακό DNA, πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο του υποδοχέα οιστρογόνων τύπου β σε πλαίσιο με την αλληλουχία που κωδικοποιεί την έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP). Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών παρατίθενται στην εικόνα που ακολουθεί.



**Εικόνα 2. Δοκιμασία παροδικής διαμόλυνσης νευρικών κυττάρων N<sub>2</sub>A.** Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με CaCl<sub>2</sub> x3, CaCl<sub>2</sub> x5, Lip x 0,5 και Lip x 1. Για τη χρώση των πυρήνων χρησιμοποιήθηκε η χρώση Hoechst (στήλη B), ενώ το πράσινο χρώμα στα σιγμοτύπα της στήλης A, οφείλεται στην GFP-ERβ χημεική πρωτεΐνη. Προτιμούμε ως βέλτιστη συνθήκη το CaCl<sub>2</sub> x3 καθώς είναι αρκετά αποτελεσματικό χωρίς να είναι τοξικό ή να προκαλεί αλλαγές στη μορφολογία των N<sub>2</sub>A και παράλληλα χαμηλού κόστους.

### 5.2.2. Μελέτη δράσης E<sub>2</sub> και ACH στη ρύθμιση της δραστικότητας ενδογενών υποδοχέων οιστρογόνων νευρικών κυττάρων N<sub>2</sub>A

Η δοκιμασία αυτή έλαβε χώρα μετά την παροδική διαμόλυνση κυττάρων N<sub>2</sub>A με τη μέθοδο φωσφορικών-CaCl<sub>2</sub>, χρησιμοποιώντας πλασμίδια που κωδικοποιούν την έκφραση γονιδίων β-γαλακτοσιδάσης και λουσιφεράσης και πλασμίδια, τα οποία φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν τον ERα ή ERβ για την επίτευξη της υπερέκφρασης των δύο μορίων. Πειραματικά, πραγματοποιήθηκε, όπως εξηγήθηκε σε σχετική παράγραφο παραπάνω. Τα κύτταρα επωάστηκαν με 10<sup>-9</sup>M E<sub>2</sub> και 10<sup>-4</sup>M ACH για χρονικό διάστημα 6 ωρών. Στην συνέχεια, ακολούθησε έκπλυση, λύση των κυττάρων και προσδιορισμός δραστικότητας λουσιφεράσης και β-γαλακτοσιδάσης, όπως περιγράφονται στην σχετική παράγραφο. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα:



**Σχήμα 1. Μελέτη δράσης E<sub>2</sub> και ACH στη δραστικότητα των ERα και ERβ σε N<sub>2</sub>A κύτταρα.** Στο διάγραμμα φαίνονται τα σχετικά επίπεδα δραστικότητας των υποδοχέων οιστρογόνων σε κύτταρα αναφοράς (control), υπό τη δράση E<sub>2</sub>, υπό τη δράση ACH και υπό τη δράση E<sub>2</sub> και ACH.

Παρατηρούμε ότι τα επίπεδα δραστικότητας του ERα υπό την επίδραση της E<sub>2</sub>, είναι φανερά υψηλότερα συγκριτικά με το control. Υπό την επίδραση του ACH δεν παρατηρούμε στατιστικά σημαντικές μεταβολές σε σχέση με το αντίστοιχο δείγμα αναφοράς, ενώ υπό τη δράση E<sub>2</sub> σε συνδυασμό με ACH, τα επίπεδα δραστικότητας φαίνεται να είναι χαμηλότερα από αυτά της E<sub>2</sub>. Η διαφορά όμως αυτή είναι στα όρια του πειραματικού σφάλματος. Για τον ERβ, δεν

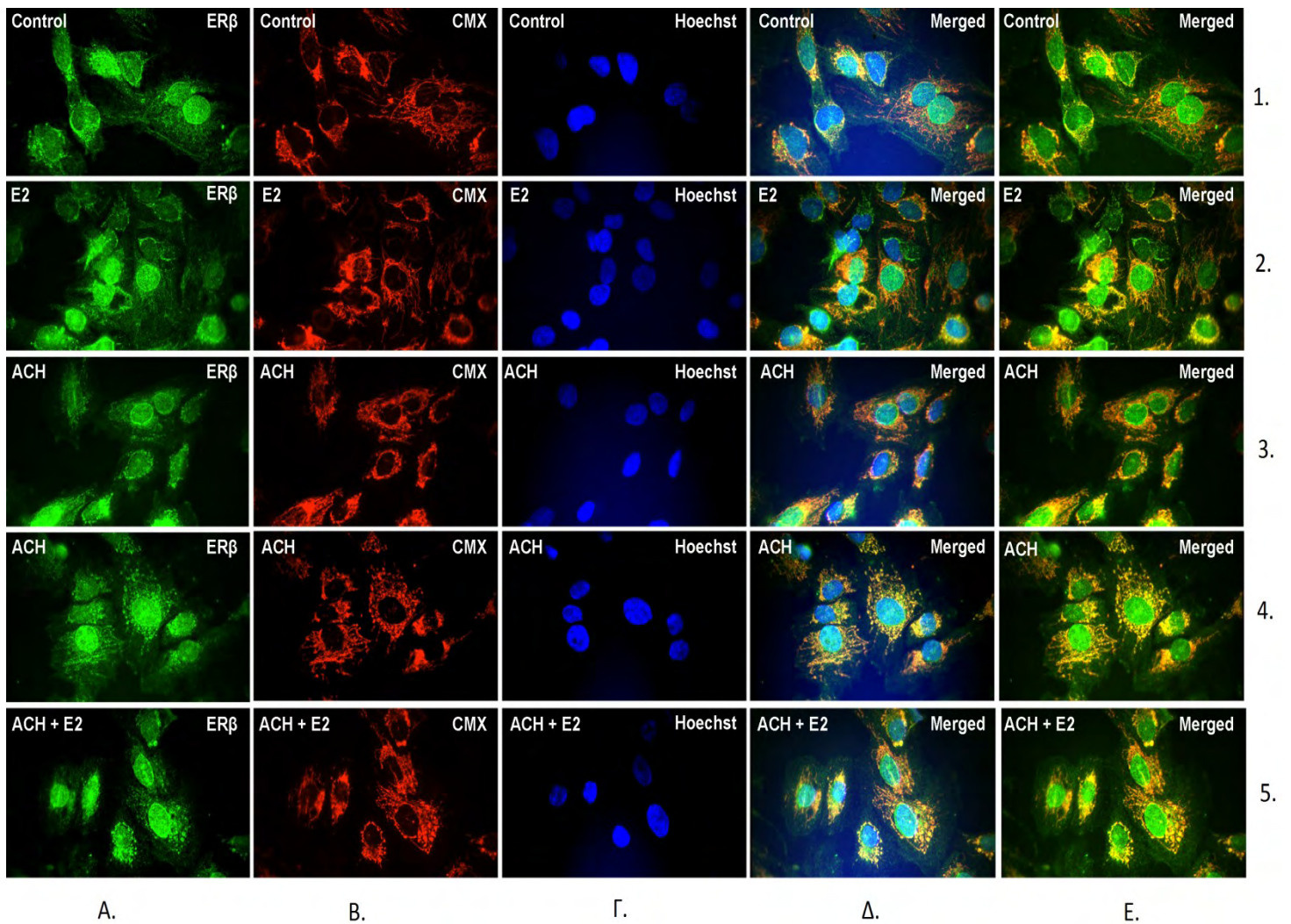
παρατηρούμε διαφορές ίδιας τάξης μεγέθους με τον ERα. Παρ'όλα αυτά, τα επίπεδα δραστικότητάς του υπό τη δράση E<sub>2</sub>, φαίνεται να είναι υψηλότερα από το αντίστοιχο control. Υπό τη δράση του ACH είναι ελαφρώς υψηλότερα από το αντίστοιχο control, όμως πάλι στα όρια του πειραματικού σφάλματος, ενώ υπό τη δράση συνδυασμού E<sub>2</sub> με ACH δεν φαίνεται να αναιρείται ούτε και να επάγεται η από την E<sub>2</sub> μεταβολή της δραστικότητας του ERβ.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το ACH δεν επάγει στατιστικά σημαντική ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστικότητας του ERα και του ERβ σε N<sub>2</sub>A.

### 5.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ACH ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΓΕΝΟΥΣ ERβ σε SH-SY5Y

Με σκοπό τον χαρακτηρισμό της πιθανής οιστρογονικής δράσης του ACH σε νευρικά κύτταρα έγινε συγκριτική μελέτη της επίδρασης των ACH και E<sub>2</sub> στη μεταβολή του υποκυτταρικού εντοπισμού του ERβ. Δεδομένου ότι αυτός ο τύπος του υποδοχέα φαίνεται να επικρατεί σε νευρικά κύτταρα SH-SY5Y και επομένως μέσω αυτού θα επιτελείται η πιθανή οιστρογονική δράση του ACH, η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα SH-SY5Y. Επίσης, δεδομένου ότι η υποκυτταρική κατανομή των υποδοχέων οιστρογόνων διαφοροποιείται μεταξύ ενεργοποιημένων και μη από ορμονικό ερέθισμα-κυττάρων, τα SH-SY5Y αναπτύσσονταν σε ειδικό μέσο καλλιέργειας 48 ώρες πριν την προσθήκη ACH και E<sub>2</sub>, στο οποίο προστίθεται ειδικά κατεργασμένο FBS (FBS cis, επεξεργασμένο με ενεργό άνθρακα και φιλτραρισμένο), με σκοπό την εξάλειψη ορμονών σε αυτό. Η πειραματική διαδικασία της ανοσοϊστοχημείας, που έλαβε χώρα έξω από τον χώρο των κυτταροκαλλιερειών αναφέρθηκε πιο πάνω σε σχετική παράγραφο και τα αποτελέσματά της φαίνονται στην εικόνα:



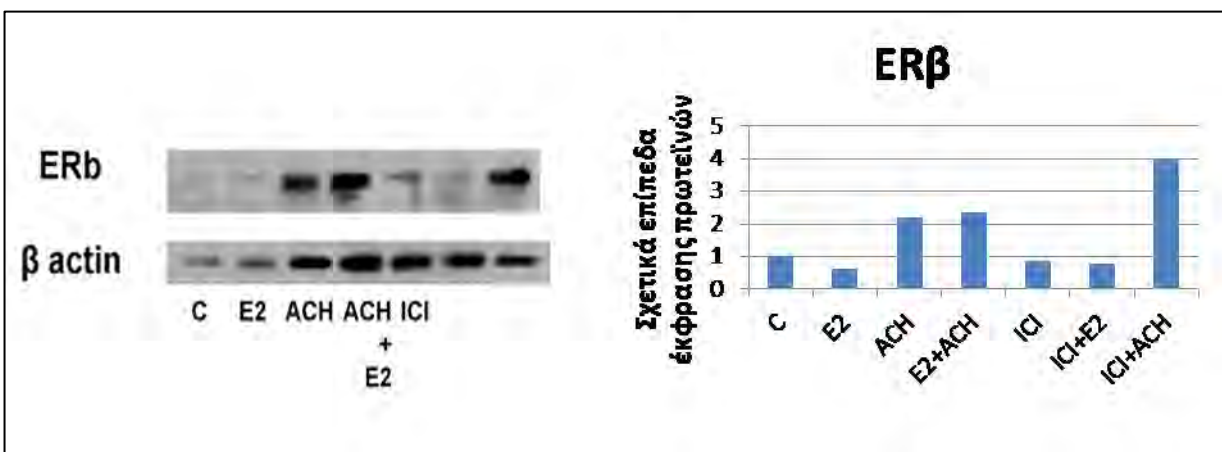


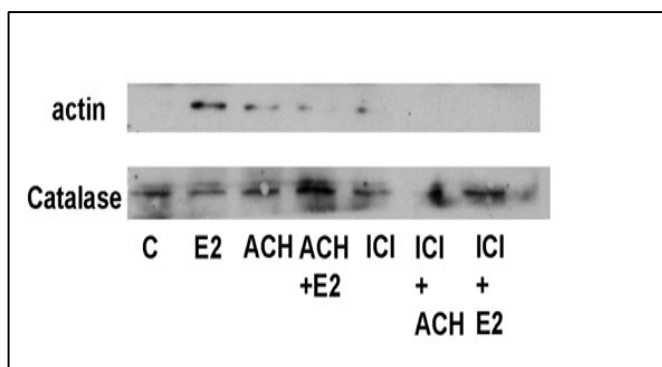
**Εικόνα 3. Επίδραση του ACH στην μεταβολή της υποκυτταρικής εντόπισης του ενδογενούς ERβ.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και επώαστηκαν με τις ουσίες E<sub>2</sub> (10<sup>-9</sup>M) και ACH (10<sup>-4</sup>M) (όπως αναφέρεται παραπάνω και σε σχετική παράγραφο). Έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων με MeOH/Aceton, CMX: μιτοχονδριακή χρώση, Hoechst: πυρηνική χρώση. Στην στήλη A φαίνεται με πράσινο χρώμα ο εντοπισμός του ERβ σε όλο το κύτταρο. Στην στήλη B φαίνεται με κόκκινο χρώμα η σήμανση των μιτοχονδρίων με τη χρωστική CMX. Στην στήλη Γ φαίνεται η σήμανση του πυρήνα με μπλε χρώμα, με την χρωστική Hoechst. Στην στήλη Δ έχει γίνει η σύμπτυξη της σήμανσης ERβ, μιτοχονδρίων και των πυρήνων αποκαλύπτοντας τον εντοπισμό του ERβ πυρηνικά (ανάμειξη πράσινου και μπλε χρώματος), ενώ στην στήλη E έχει γίνει σύμπτυξη της σήμανσης ERβ και της μιτοχονδριακής χρωστικής CMX. Η εμφάνιση του κίτρινου χρώματος υποδηλώνει την πιθανή μιτοχονδριακή εντόπιση του υποδοχέα. Τα κύτταρα της στήλης 1 αποτελούν τα control του πειράματος, της στήλης 2 αναπτύχθηκαν σε μέσο καλλιέργειας με οιστραδιόλη, της στήλης 3 και 4 αναπτύχθηκαν σε μέσο καλλιέργειας με ACH και τέλος τα κύτταρα της στήλης 5 αναπτύχθηκαν σε μέσο με οιστραδιόλη και ACH.

Σύμφωνα με την εικόνα, παρατηρούμε ότι παρουσία E<sub>2</sub>, γίνεται πιο έντονη η πυρηνική εντόπιση του ERβ σε σχέση με τα control. Επιπλέον, παρουσία του ACH, παρατηρούμε, μία ενίσχυση της περιπυρηνικής και πυρηνικής εντόπισης του ERβ. Δεδομένου ότι περιπυρηνικά στο κύτταρο έχουμε αυξημένη εντόπιση μιτοχονδρίων, υποθέτουμε, ότι έλαβε χώρα μία μετακίνηση του υποδοχέα από το κυτταρόπλασμα, προς τον πυρήνα, αλλά και προς τα μιτοχόνδρια. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από την παρατήρηση της ενίσχυσης της κίτρινης χρώσης (συνεντοπισμός ERβ και μιτοχονδριακής χρωστικής), που παρατηρείται στα κύτταρα που έχουν επωαστεί τόσο με ACH όσο και με συνδυασμό ACH και E<sub>2</sub>.

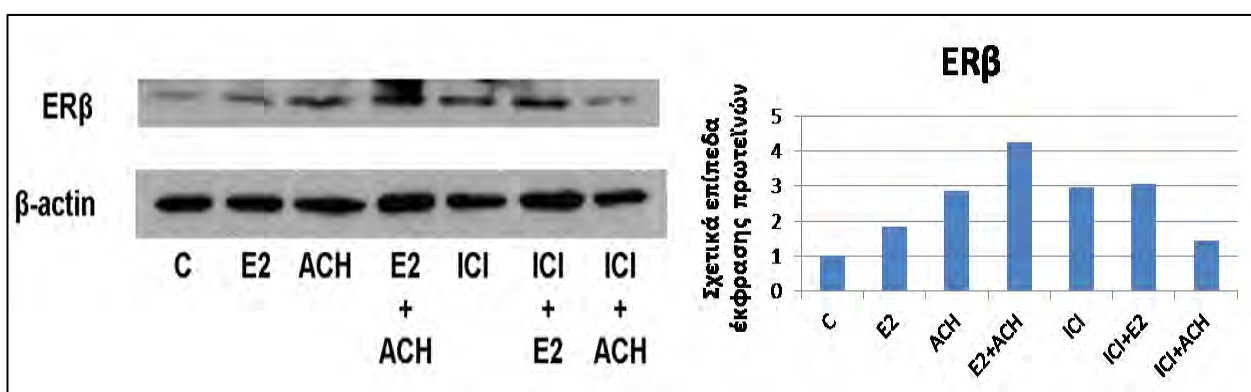
#### 5.4 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ACH ΚΑΙ E<sub>2</sub> ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ N<sub>2</sub>A ΚΑΙ SH-SY5YA ΚΥΤΤΑΡΑ

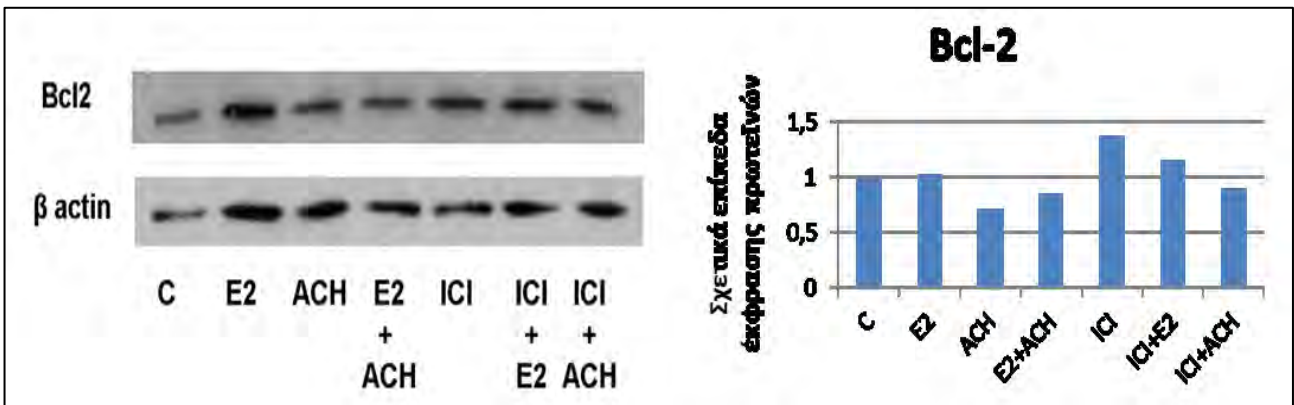
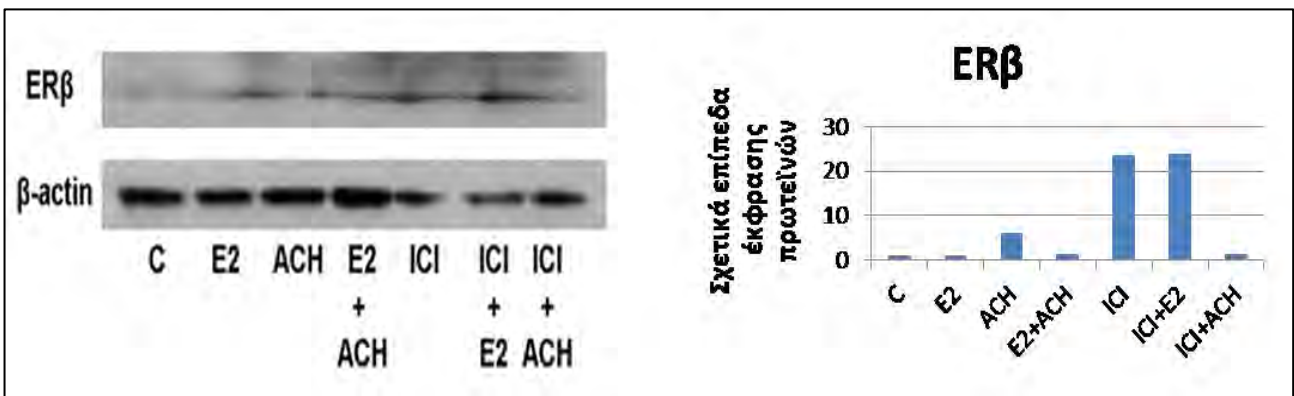
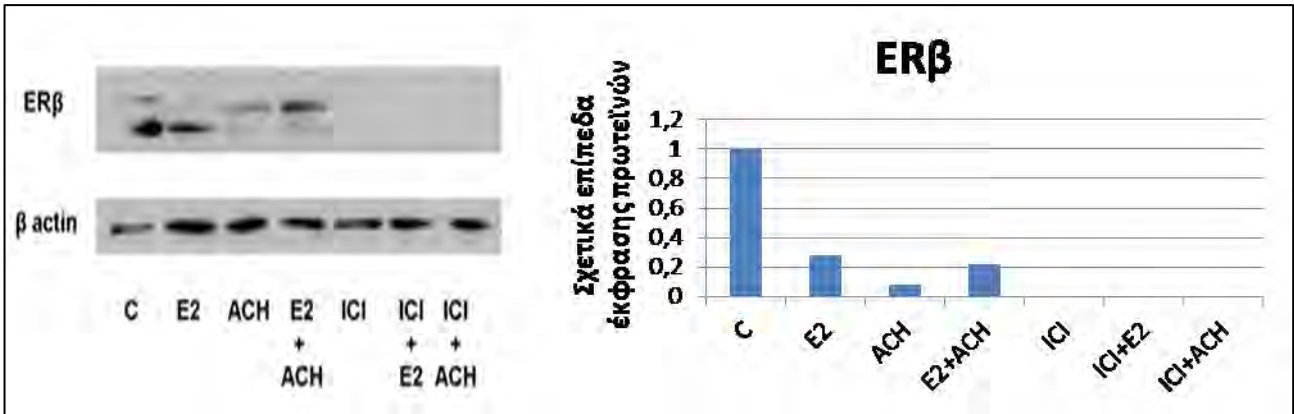
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο ERβ αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με αντιοξειδωτικά και αντιαποπτωτικά μόρια, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην επιβίωση των νευρικών κυττάρων. Για αυτόν τον λόγο, διερευνήθηκε τόσο η επίδραση της οιστραδιόλης όσο και του ACH, το οποίο έχει ενοχοποιηθεί για επαγωγή νευροεκφυλιστικών νόσων, στα επίπεδα έκφρασης του ERβ, αντιαποπτωτικών μορίων, όπως το Bcl-2, προαποπτωτικών μορίων, όπως η προκασπάση 3 και αντιοξειδωτικών μορίων, όπως η καταλάση. Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των μορίων που μελετήσαμε, μέσω ανοσοαποτύπωσης, Western blot, τα οποία συνοδεύονται από γραφήματα κανονικοποίησης ως προς τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης:

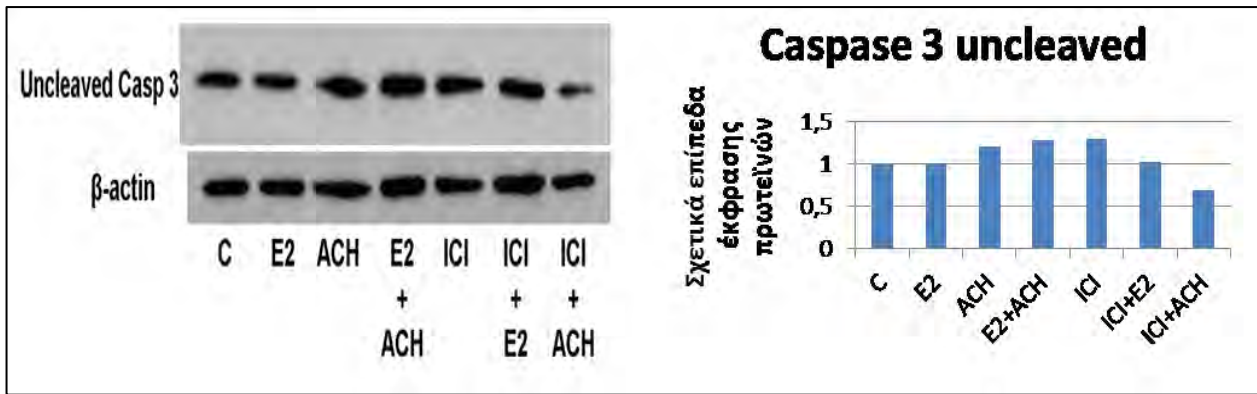




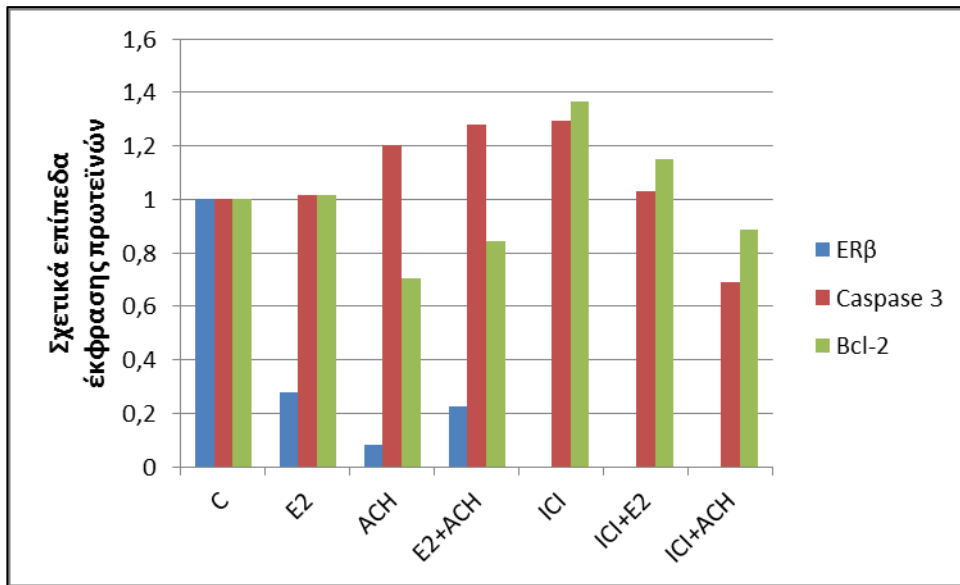
**Σχήμα 2. Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης του ERβ και της καταλάσης σε νευρικά κύτταρα N<sub>2</sub>A.** Κυτταρικά εκχυλίσματα ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου από N<sub>2</sub>A, τα οποία είχαν καλλιεργηθεί και επωαστεί με 10<sup>-9</sup>M E2, ACH 10<sup>-4</sup>M, ICI 10<sup>-7</sup>M και συνδυασμού αυτών, ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE), μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία και τις διακυμάνσεις στην έκφραση των παραπάνω μορίων. Ο εντοπισμός και τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνικών μορίων έγινε με χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι -ERβ, (ERβ-H150), -καταλάσης (RnDSystems) και -β-ακτίνης (κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων). Επίσης, απεικονίζεται σε γράφημα, η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του ERβ ως προς τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης. Η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της καταλάσης στάθηκε αδύνατη λόγω της ανεπαρκούς απεικόνισης της αντίστοιχης β-ακτίνης.







**Σχήμα 3. Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των μορίων ERβ, Caspase 3 (uncleaved) και Bcl-2 σε νευρικά κύτταρα SH-SY5Y.** Κυτταρικά εκχυλίσματα ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου από SH-SY5Y, τα οποία είχαν καλλιεργηθεί και επωαστεί με  $10^{-9}$ M E<sub>2</sub>, ACH  $10^{-4}$ M, ICI  $10^{-7}$ M και συνδυασμού αυτών, ηλεκτροφορήθηκαν σε 12% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS PAGE), μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία και τις διακυμάνσεις στην έκφραση των παραπάνω μορίων. Ο εντοπισμός και τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνικών μορίων έγινε με χρήση ειδικών αντισωμάτων ERβ-H150, β-actin (κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων), Casp 3 (Abcam) και Bcl-2 (CS). Επιπλέον, απεικονίζονται και οι κανονικοποιήσεις των επιπέδων έκφρασης του κάθε μορίου ως προς τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης.



Εικόνα 4. Συγκεντρικό σχήμα των σχετικών επιπέδων έκφρασης του ERβ, της προκασπάσης 3 και του Bcl-2 σε κύτταρα SH-SY5YA.

Από το παραπάνω Σχήμα 3., φαίνεται ότι το ACH δεν μεταβάλλει σημαντικά τα επίπεδα της προκασπάσης 3, άρα υπό τις συνθήκες του πειράματος, το ACH δεν οδήγησε σε επαγωγή απόπτωσης. Όσο αφορά την επίδραση του ACH στα επίπεδα έκφρασης της Bcl-2 παρατηρούμε μία μικρή μείωση παρουσία ACH, η οποία μάλιστα αίρεται παρουσία ICI, υποδηλώνοντας οιστρογονική δράση του ACH στα νευρικά SH-SY5Y κύτταρα.

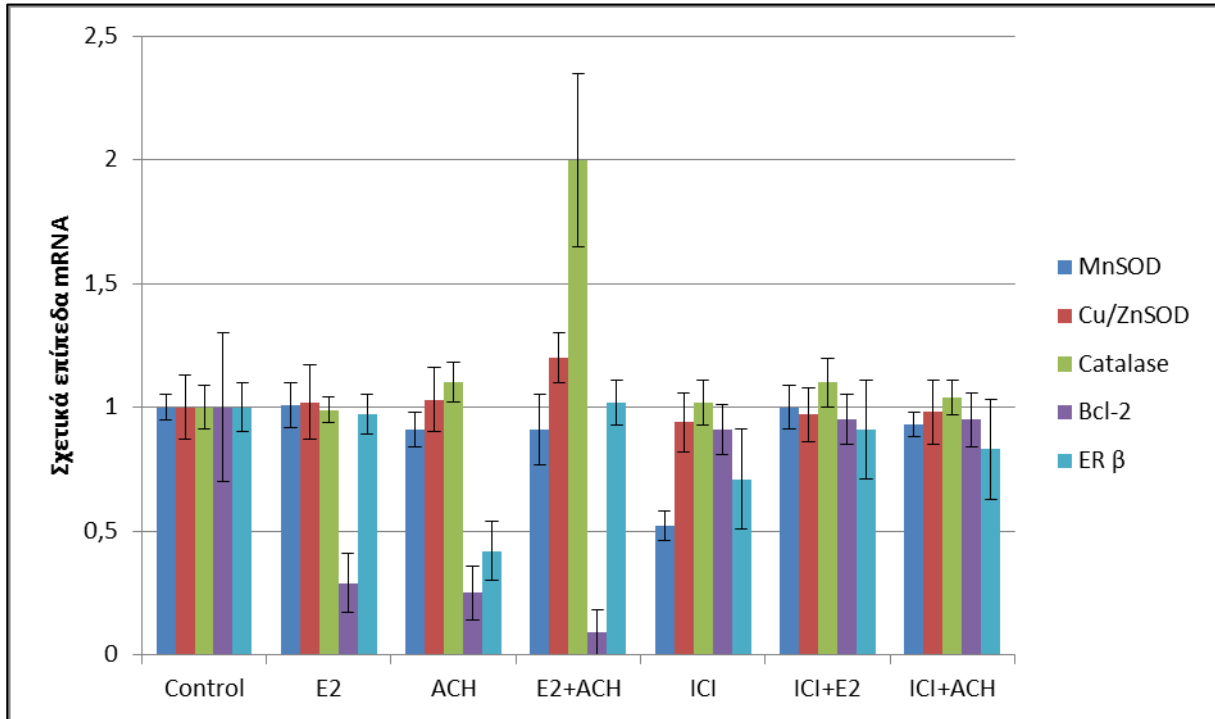
Η πιθανή μείωση των επίπεδα Bcl-2 παρουσία ACH σχετίζεται με καταστολή της αντιαποπτωτικής δράσης των SH-SY5Y κυττάρων και με τον από ACH επαγόμενο νευροεκφυλισμό, που έχει ανακοινωθεί στη διεθνή βιβλιογραφία.

Όσον αφορά την επίδραση του ACH στα επίπεδα έκφρασης του ERβ, τα αποτελέσματα στην πλειοψηφία τους, δείχνουν επαγωγή της έκφρασης του ERβ υποδοχέα, που όμως δεν αίρεται παρουσία ICI, άρα μιλάμε για μία μη οιστρογονική δράση του ACH στα νευρικά SH-SY5Y κύτταρα. Λόγω, όμως, της μη πλήρους επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων οι παραπάνω πειραματικές διεργασίες χρήζουν επανάληψης και περαιτέρω διερεύνησης.

#### 5.5 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ E<sub>2</sub> ΚΑΙ ACH ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ mRNA ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΝΤΙΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ SH-SY5YA

Εφόσον, στο προηγούμενο σκέλος της εργασίας, είδαμε πώς επιδρούν η οιστραδιόλη και το ACH στα επίπεδα έκφρασης του ERβ και κάποιων αντιοξειδωτικών/ αντιαποπτωτικών μορίων, στη συνέχεια θελήσαμε να μελετήσουμε πώς επιδρούν σε επίπεδο mRNA. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR), όπως περιγράφηκε σε σχετική παράγραφο πιο πάνω. Η πειραματική διαδικασία έγινε σε συνεργασία με τον υποψήφιο διδάκτορα Γοργογιέτα

Βύρωνα στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του. Τα μόρια που μελετήσαμε είναι ο υποδοχέας οιστρογόνων τύπου β (ERβ), το MnSOD, το Cu/ZnSOD, η καταλάση (Catalase) και το αντιαποπτωτικό μόριο Bcl-2, ενώ τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα:



**Εικόνα 5. Συγκεντρωτικό γράφημα μελέτης επίδρασης E<sub>2</sub> και ACH στα επίπεδα mRNA του υποδοχέα οιστρογόνων τύπου β και αντιοξειδωτικών/αντιαποπτωτικών μορίων.** Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν και επώαστηκαν με τις ουσίες E<sub>2</sub> (10<sup>-9</sup>M) και ACH (10<sup>-4</sup>M) για 6 ώρες πριν τη συλλογή τους (harvesting). Ακολούθησε απομόνωση του ολικού RNA, πέψη με DNase, αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR) και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR), όπως περιγράφηκαν σε σχετική παράγραφο πιο πάνω. Παρατηρούμε ότι τα επίπεδα mRNA των μορίων MnSOD, Cu/ZnSOD και της καταλάσης μένουν σχεδόν αδιαφοροποίητα, χωρίς να παρουσιάζουν ιδιαίτερες διακυμάνσεις. Από την άλλη, παρατηρείται μείωση των επιπέδων mRNA του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2, παρουσία E<sub>2</sub>, ACH και παρουσία των δύο συνθηκών ταυτόχρονα. Επιπλέον, παρατηρείται μοναδική μείωση των επιπέδων mRNA του ERβ παρουσία ACH.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, παρουσία ACH δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των mRNA των μορίων που μελετήθηκαν, με μόνη εξαίρεση τη μεταβολή στα επίπεδα της Bcl-2 και της καταλάσης. Η μείωση των επιπέδων mRNA της Bcl-2, η οποία αίρεται παρουσία ICI, συμβαδίζει με τις παρατηρήσεις από την Western blot ανάλυση, υποδηλώνοντας μία οιστρογονική δράση του ACH.

Η μεταβολή στα επίπεδα mRNA της καταλάσης, πιθανόν να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα μία και δεν συνάδει με την νευροεκφυλιστική δράση του αργιλίου.

## 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο υποδοχέας των οιστρογόνων ανήκει στην κατηγορία των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών και μέσω της δράσεως του, εμπλέκεται σε πάρα πολλά μονοπάτια που είναι αναγκαία για την εύρυθμη λειτουργία του κυττάρου και ολόκληρου του οργανισμού. Εντοπίζεται σε δύο κύριες ισομορφές, ER $\alpha$  και ER $\beta$ , οι οποίες και φαίνεται να έχουν αντίθετες δράσεις (Hodges-Gallagher et al. 2008). Ο ρόλος της οιστρογονικής σηματοδότησης έχει φανεί να διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σε ορισμένες μορφές καρκίνου αλλά και άλλες διαταραχές μεταξύ των οποίων και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Συγκεκριμένα, ο ER $\beta$ , ενεργοποιημένος από την 17- $\beta$  οιστραδιόλη, δρα νευροπροστατευτικά, επάγοντας (άμεσα ή έμμεσα) μια σειρά από αντιοξειδωτικά και αντιαποπτωτικά μόρια, όπως το MnSOD και το Bcl-2 αντίστοιχα.

Κατά την μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας, έλαβαν χώρα μία σειρά πειραμάτων που είχαν ως σκοπό τη διερεύνηση της οιστρογονικής δράσης αλάτων αργιλίου (ACH), σε νευρικά κύτταρα (κυτταρικές σειρές SH-SY5Y και N2A).

Στο πρώτο μέρος της μελέτης, εφόσον έγινε σαφές ότι οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήσαμε είναι απαλλαγμένες από προσμείξεις μυκοπλάσματος, πραγματοποιήθηκε δοκιμή παροδικής διαμόλυνσης με σκοπό την εύρεση βέλτιστων συνθηκών, οι οποίες θα χρησίμευαν σε επόμενο βήμα. Παρατηρώντας τις εικόνες και συγκρίνοντας την ένταση της χρωστικής σε όλο το κύτταρο και στον πυρήνα, φαίνεται ότι τα νευρικά κύτταρα N $_2$ A είναι πολύ εύκολο να διαμολυνθούν παροδικά. Η ένταση της χρωστικής υποδηλώνει το πόσο πολύ ή λίγο εκφράστηκε σε πρωτεΐνη, το υπο μελέτη γονίδιο του πλασμιδίου, με το οποίο μολύναμε τα κύτταρα. Σύμφωνα με την **Εικόνα 2.**, υψηλά επίπεδα διαμόλυνσης έχουμε στις συνθήκες με την λιποφεκταμίνη, όμως λόγω τοξικότητας που προκαλεί στα κύτταρα, την απορρίψαμε. Ανάμεσα στις συνθήκες με CaCl $_2$  x3 και CaCl $_2$  x5, φαίνεται να υπερισχύει η δεύτερη. Όμως, παρατηρήσαμε κάποια διαφοροποίηση στη μορφολογία των κυττάρων, πιθανόν λόγω υψηλής αλατότητας. Έτσι, καταλήξαμε στη βέλτιστη συνθήκη, η οποία είναι η διαμόλυνση με CaCl $_2$  x3.

Το επόμενο βήμα ήταν η διαμόλυνση των N $_2$ A με τους πλασμιδιακούς φορείς  $\beta$ -gal, ERE-luc, pSG5 ER $\alpha$  και pSG5 ER $\beta$  για τη διερεύνηση της επίδρασης της οιστραδιόλης και του ACH στη δραστηριότητα των οιστρογονικών υποδοχέων. Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε αρκετές φορές πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων που παρατέθηκαν πιο πάνω. Σύμφωνα με το **Σχήμα 1.**, παρατηρούμε ότι το ACH πιθανόν να δρα ανταγωνιστικά στην από E $_2$  επαγόμενη ενεργοποίηση της δραστηριότητας του ER $\alpha$ , αλλά όχι του ER $\beta$ . Η ορθότητα της παρατήρησης αυτής, λόγω μεγάλων διακυμάνσεων των τιμών, μένει να επανεξεταστεί.



Η μελέτη της οιστρογονικής επίδρασης αλάτων αργιλίου στη μεταβολή του υποκυτταρικού εντοπισμού του ERβ, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Σύμφωνα με την **Εικόνα 3.**, παρατηρήθηκε έντονη παρουσία του υποδοχέα περιυπερηνικά υπό τη δράση του ACH. Συγκρίνοντας, τη θέση του ERβ στο κύτταρο σε κάθε συνθήκη, διαπιστώνουμε ότι έλαβε χώρα μία μετακίνηση του υποδοχέα από το κυτταρόπλασμα προς τα μιτοχόνδρια. Το γεγονός αυτό, φανερώνει μία πιθανή αλληλεπίδραση του υποδοχέα με το ACH, η οποία προκαλεί την μετακίνησή του προς τα μιτοχόνδρια, υποδηλώνοντας το ρόλο που πιθανώς να διαδραματίζει το ACH σε μιτοχονδριακές λειτουργίες.

Η επίδραση της 17-β οιστραδιόλης και του ACH στα επίπεδα του ERβ και άλλων αντιοξειδωτικών και αντιαποπτωτικών μορίων, πραγματοποιήθηκε τόσο σε επίπεδο πρωτεϊνών όσο και σε επίπεδο mRNA. Σε επίπεδο πρωτεϊνών, σύμφωνα με το **Σχήμα 2.** και **3.** παρατηρούμε αρχικά, ότι οι μεταβολές των επιπέδων του ERβ στα N<sub>2</sub>A δεν συμπίπτουν με αυτά του ERβ στα SH-SY5Y, αλλά ούτε μεταξύ επιπέδων ERβ, αποκλειστικά σε SH-SY5Y. Τα επίπεδα της καταλάσης (αντιοξειδωτικό μόριο) στα N<sub>2</sub>A κύτταρα, φαίνεται να μη διαφοροποιούνται ιδιαίτερα, όμως δεν είχαμε τη δυνατότητα να σιγουρευτούμε, λόγω αδυναμίας κανονικοποίησης των επιπέδων.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η προκασπάση-3 ανήκει στην οικογένεια πρωτεασών που ονομάζονται κασπάσες και αποτελεί κύριο συστατικό του αποπτωτικού μηχανισμού στα θηλαστικά. Η κασπάση-3, ενεργοποιείται ύστερα από μία πρωτεολυτική διάσπαση από μια κασπάση-εναρκτή. (Μ.Ανδρικούλα, Γ.Βαρθολομάτος, 2001). Δεδομένου, ότι οι ενώσεις αργιλίου έχουν ενοχοποιηθεί για συσχέτιση με την παθολογία νευροεκφυλιστικών νοσημάτων υποθέτουμε ότι τα επίπεδα της προκασπάσης-3 θα είναι χαμηλά, παρουσία ACH. Στο **Σχήμα 3.** παρατηρούμε ότι παρουσία του ACH, τα επίπεδα της προκασπάσης είναι υψηλά, τα οποία εξηγούνται από το γεγονός ότι τα SH-SY5Y αποτελούν καρκινική κυτταρική σειρά, άρα διαθέτουν μηχανισμούς, οι οποίοι δεν αφήνουν το κύτταρο να οδηγηθεί προς απόπτωση και έτσι το ACH δεν ενεργοποιεί αποπτωτικούς μηχανισμούς υπό αυτές τις συνθήκες. Το Bcl-2 είναι ένα αντιαποπτωτικό μόριο, το οποίο αποτελεί άμεσο στόχο του ERβ. Όπως, έχει αναφερθεί και πιο πάνω, η οιστραδιόλη και τα παραγωγά της μέσω ERβ, επάγει το Bcl-2 προστατεύοντας τα νευρικά κύτταρα από την απόπτωση. Παρατηρούμε, ότι παρουσία οιστραδιόλης τα επίπεδα έκφρασης του Bcl-2 είναι ελαφρώς υψηλά, ενώ είναι μειωμένα παρουσία ACH και παρουσία ICI αίρεται αυτή η αναστολή, υποδηλώνοντας την πιθανότητα οιστρογονικής δράσης ACH.

Σε επίπεδο mRNA, σύμφωνα με την **Εικόνα 5.**, παρατηρούμε ότι τα αντιοξειδωτικά μόρια καταλάση, Cu/ZnSOD δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες διακυμάνσεις, γεγονός το οποίο πιθανόν να συμβαίνει λόγω του ότι δεν είναι άμεσοι στόχοι του ERβ. Από την άλλη, το MnSOD παρουσιάζει μικρή μείωση των επιπέδων mRNA του, παρουσία ACH και δεδομένου ότι αποτελεί άμεσο στόχο του ERβ επιβεβαιώνει την υπόθεσή μας ότι το ACH εμφανίζει οιστρογονική δράση. Σχετικά με το Bcl-2, τα αποτελέσματα των επιπέδων mRNA δεν συμπίπτουν απόλυτα με τα επίπεδα των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα mRNA του Bcl-2, παρουσία οιστραδιόλης, γεγονός που δεν συνάδει καθόλου, ούτε με τα επίπεδα των πρωτεϊνών, ούτε με τη βιβλιογραφία που αναφέρει το

Bcl-2 άμεσο στόχο του ERβ. Αντίθετα, τα επίπεδα mRNA του Bcl-2 μειώνονται παρουσία ACH. Επίσης, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα mRNA του ERβ παρουσιάζουν φανερή μείωση παρουσία ACH, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία αλλά και συνάδει με τις μειώσεις των επιπέδων mRNA των MnSOD και Bcl-2. Μάλιστα η μείωση των επιπέδων mRNA της Bcl-2, η οποία αίρεται παρουσία ICI, συμβαδίζει με τις παρατηρήσεις από την Western blot ανάλυση, υποδηλώνοντας μία οιστρογονική δράση του ACH. Η παρατηρούμενη μείωση των επιπέδων Bcl-2 πιθανόν να οφείλεται σε πιθανή μείωση των επιπέδων του ERβ παρουσία ACH, κάτι το οποίο προκύπτει και σε ένα από τα τρία πειράματα ελέγχου των επιπέδων έκφρασης του ERβ που διεξήχθησαν.

Αναλογιζόμενοι τα αποτελέσματα που αποκτήσαμε και εισάγοντάς τα στην παθογένεση των νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, θα μπορούσαμε με κάθε επιφύλαξη, να συμπεράνουμε πως, το αργίλιο, μιμείται τα φυσικά οιστρογόνα προκαλώντας την υποκυτταρική μετακίνηση του ERβ και συγκεκριμένα τη μιτοχονδριακή μετατόπιση του υποδοχέα. Μένει να μελετηθεί κατά πόσο το ACH και γενικότερα τα άλατα αργιλίου ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων στόχων του ERβ και πολύ περισσότερο τον ίδιο τον ERβ. Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, φαίνεται ότι τα άλατα αργιλίου επηρεάζουν αρνητικά τα επίπεδα έκφρασης του ERβ, και κατά συνέπεια περιορίζουν τις επιθυμητές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, νευροπροστατευτικές δράσεις του ERβ και μάλιστα του μιτοχονδριακά εντοπιζόμενου, στα νευρικά κύτταρα. Η παρατήρηση αυτή ρίχνει φως στην κατανόηση των μηχανισμών επαγωγής νευροεκφυλιστικών νόσων από τις ενώσεις αργιλίου. Η μείωση των επιπέδων ERβ, ενδεχομένως και της δραστικότητάς του, παρουσία αργιλίου σε νευρικά κύτταρα πιθανόν να σχετίζεται με την επαγωγή και πρόοδο κάποιων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων.

Έχει ιδιαίτερη σημασία το γεγονός, ότι όλα αυτά τα δεδομένα, είναι αποτέλεσμα της εφαρμογής σχετικά μικρής συγκέντρωσης ( $10^{-7}M$ ) ACH και για χρονικό διάστημα τριών ημερών. Από τη μεριά της διεθνούς ιατρικής κοινότητας έχει σημανθεί συναγερμός για την σε βάθος χρόνου συσσώρευση του αργιλίου σε ιστούς, όπως οι πνεύμονες και το ΚΝΣ, γεγονός που συμβάλλει βαθμιαία αυξανόμενη τοξικότητά του. Για το λόγο αυτό, οι προσδιοριζόμενες στο αίμα συγκεντρώσεις είναι κατά πολύ μικρότερες σε σχέση με τις υπάρχουσες συγκεντρώσεις του αργιλίου στους διάφορους ιστούς, ατόμων που συστηματικά εκτίθενται.

Σε δεύτερο χρόνο, λοιπόν, απαιτείται η περαιτέρω μελέτη τόσο των μορίων που συμμετέχουν, όσο και των μηχανισμών που εμπλέκονται και των διακυτταρικών μονοπατιών που διαταράσσονται, προκειμένου ένα κύτταρο να χάσει την φυσιολογική του πορεία και να μπει σε μονοπάτια παθογένεσης, ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού ή εκφυλισμού.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **AG Manente**, D Valenti<sup>2</sup>, G Pinton, PV Jithesh, A Daga, L Rossi, SG Gray, KJ O'Byrne, DA Fennell, RA Vacca, S Nilsson, L Mutti and L Moro, (2013) , Estrogen receptor b activation impairs mitochondrial oxidative metabolism and affects malignant mesothelioma cell growth in vitro and in vivo, *Oncogenesis*, e72; doi:10.1038/oncsis
2. **Ali Pedram**, Mahnaz Razandi, Douglas C. Wallace, and Ellis R. Levin, (2006), Functional Estrogen Receptors in the Mitochondria of Breast Cancer Cells, *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 17, 2125–2137
3. **Ali Razmara**, Lorraine Sunday, Chris Stirone, Xiao Bo Wang, Diana N. Krause, Sue P. Duckles, and Vincent Procaccio, (2008), Mitochondrial Effects of Estrogen Are Mediated by Estrogen
4. **Amandine Grimm** & Yun-An Lim & Ayikoe Guy Mensah-Nyagan & Jürgen Götz & Anne Eckert, (2012), Alzheimer's Disease, Oestrogen and Mitochondria: an Ambiguous Relationship, *Mol Neurobiol* 46:151–160
5. **Ami P. Raval** , Raquel Borges-Garcia, William Javier Moreno, Miguel A. Perez-Pinzon, Helen Bramlett Periodic 17 $\beta$ -Estradiol Pretreatment Protects Rat Brain from Cerebral Ischemic Damage via Estrogen Receptor- $\beta$  Published: April 12, 2013 DOI: 10.1371/journal.pone.0060716
6. **Ana I. Rojo**, Marta Salinas, Daniel Martí n, Rosario Perona, and Antonio Cuadrado. Regulation of Cu/Zn-Superoxide Dismutase Expression via the Phosphatidylinositol 3 Kinase/Akt Pathway and Nuclear Factor- $\kappa$ B . Institute of Biomedical Investigation and Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Autónoma University of Madrid, 28029 Madrid, Spain
7. **Azcoitia I**, Sierra A, Garcia-Segura LM. Localization of estrogen receptor-b immunoreactivity in astrocytes of the adult rat brain. *Glia* 1999; 26:260–267.
8. **Bhat RV**, Budd Haeberlein SL, Avila J. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 2004;89:1313–1317. [PubMed: 15189333]
9. **Bhat RV**, Shanley J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW, Lee CM. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:11074–11079. [PubMed: 10995469]
10. **Bonnie J. Deroo** and Kenneth S. Korach, (2006), Estrogen receptors and human disease, *J. Clin. Invest.* 116:561–570
11. **Bonnie J. Deroo** and Adrian V. Buensuceso (2010), Minireview: Estrogen Receptor- $\beta$ : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology* 24: 1703–1714
12. **Cardona-Gomez GP**, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Res Rev* 2001;37:320–334. [PubMed: 11744097]
13. **Cardona-Gomez GP**, Mendez P, Garcia-Segura LM. Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. *Mol Brain Res* 2002;107:80–88. [PubMed: 12414126]
14. **Cardona-Gomez P**, Perez M, Avila J, Garcia-Segura LM, Wandosell F. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 2004;25:363–373. [PubMed: 15033165]

15. **Cheryl S. Watson**, Yow-Jiun Jeng, Jutatip Guptarak, (2011), Endocrine disruption via estrogen receptors that participate in nongenomic signaling pathways, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 127 , 44– 50
16. **Christoforou P**, Christopoulos PF, Koutsilieris M.,(2014), The role of Estrogen Receptor Beta in Prostate Cancer, *Molecular Medicine*
17. **Ciana P**, Ghisletti S, Mussi P, Eberini I, Vegeto E, Maggi A. Estrogen receptor alpha, a molecular switch converting transforming growth factor-alpha-mediated proliferation into differentiation in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2003;278:31737–31744. [PubMed: 12709435]
18. **Dodel RC**, Du Y, Bales KR, Gao F, Paul SM. Sodium salicylate and 17beta-estradiol attenuate nuclear transcription factor NF-kappaB translocation in cultured rat astroglial cultures following exposure to amyloid A beta(1–40) and lipopolysaccharides. *J Neurochem* 1999;73:1453–1460. [PubMed: 10501189]
19. **Fitzpatrick JL**, Mize AL, Wade CB, Harris JA, Shapiro RA, Dorsa DM 2002 Estrogen-mediated neuroprotection against -amyloid toxicity requires expression of estrogen receptor or and activation of the MAPK pathway. *J Neurochem* 82:674–682
20. **Hewitt SC**, Deroo BJ, Korach KS. Signal transduction. A new mediator for an old hormone? *Science* 2005;307:1572–1573. [PubMed: 15761144]
21. **Hsieh YC**, Yu HP, Suzuki T, Choudhry MA, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma hemorrhage. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:511–521. [PubMed: 16859701]
22. **J. G. CRAWFORD** (1998), Alzheimer's disease risk factors as related to cerebral blood flow: additional evidence, *Medical Hypotheses* 50, 25-36
23. **Jeffrey R**, Bender M, Page Haynes, Diviya Sinha, Kerry Strong Russell, Mark Collinge, David Fulton, Manuel Morales-Ruiz, William C. Sessa, Jie Cui, Yong Shen, and Rena Li, (2013), Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain, *Trends Mol Med.* 19(3): 197–209. Membrane Estrogen Receptor Engagement Activates Endothelial Nitric Oxide Synthase via the PI3-Kinase–Akt Pathway in Human Endothelial Cells
24. **Jennifer L. Fitzpatrick**, Amy L. Mize, Christian B. Wade, Julie A. Harris, Robert A. Shapiro and Daniel M. Dorsa, (2002), Estrogen-mediated neuroprotection against b-amyloid toxicity requires expression of estrogen receptor a or b and activation of the MAPK pathway, *Journal of Neurochemistry*, 82, 674–682
25. **Jorge A Roman-Blas**<sup>12</sup>, Santos Castañeda<sup>3</sup>, Raquel Largo<sup>1</sup> and Gabriel Herrero-Beaumont<sup>1\*</sup> Osteoarthritis associated with estrogen deficiency
26. **Julie M. Hall**, John F. Couse, Kenneth S. Korach , (2001), The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 276, No. 40, pp. 36869–36872
27. **L. Pietranera**, Maria Elvira Brocca, Paulina Roig, Analia Lima, Luis Miguel Garcia-Segura, Alejandro F. De Nicola, (2014), Estrogens are neuroprotective factors for hypertensive encephalopathy, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*

28. **Iain J. McEwan** and Ann M. Nardulli, (2009), Nuclear hormone receptor architecture - form and dynamics: The 2009 FASEB Summer Conference on Dynamic Structure of the Nuclear Hormone Receptors NRS , Vol. 7
29. **Leslie Hodges-Gallagher**, Z Cathleen D., Valentine Z., Suzy El Bader Z Peter J., Kushner,(2008), Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells, *Breast Cancer Res Treat* 109:241–250
30. **Linda Bjornstrom** and Maria Sjoberg,(2005), Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes *Mol Endocrinol*, 19(4):833–842
31. **Luciana Pietranera**, Maria Elvira Brocca, Paulina Roig, Analia Lima,Luis Miguel Garcia-Segurac, Alejandro F. De Nicola, (2014), Estrogens are neuroprotective factors for hypertensive encephalopathy, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*
32. **Lydia L. DonCarlos**<sup>1</sup>, Iñigo Azcoitia<sup>2</sup>, and Luis M. Garcia-Segura<sup>3</sup>. Neuroprotective actions of selective estrogen receptor Modulators. 1 Department of Cell Biology, Neurobiology and Anatomy, Stritch School of Medicine, Loyola University Chicago, 2160 South First Avenue, Maywood, Illinois 60153, USA.
33. **Mehta SH**, Dhandapani KM, De Sevilla LM, Webb RC, Mahesh VB, Brann DW. Tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator, reduces ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the ovariectomized female rat. *Neuroendocrinology* 2003;77:44–50. [PubMed: 12624540]
34. **Melissa M. Steward**, Akshayalakshmi Sridhar and Jason S. Meyer, (2013) *New Perspectives in Regeneration*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg Nibedita Gupta and Doris Mayer, (2013), Interaction of JAK with steroid receptor function, *JAK-STAT* 2:4, e24911.© Landes Bioscience
35. **Mendez P**, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain. *Mol Brain Res* 2003;112:170–176. [PubMed: 12670715]
36. **Mendez P**, Wandosell F, Garcia-Segura LM. Cross-talk between estrogen receptors and insulin-like growth factor-I receptor in the brain: cellular and molecular mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 2006;27:391–403. [PubMed: 17049974]
37. **Nina heldring**, Ashley pike, Sandra andersson, Jason matthews, Guojun cheng, Johan hartman, Michel tujague, Anders strom, Eckardt treuter, margaret warner, Jan-a ke gustafsson, (2007), Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets, *Physiol Rev* 87: 905–931, doi:10.1152/physrev.00026.2006.
38. **Noelia A-Gonzalez** and Andrés Hidalgo, (2014), Nuclear receptors and clearance of apoptotic cells: stimulating the macrophage's appetite, *Frontiers in immunology*, Volume 5, Article 211
39. **P.D Darbre**,(2005), Aluminium, antiperspirants and breast cancer, *Journal of Inorganic Biochemistry* 99, 1912–1919
40. **P. D. Darbre**, (2006), Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast, *J. Appl. Toxicol*; 26: 191–197

41. **P. S. Green**, James W. Simpkins: Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. Center for the Neurobiology of Aging and Department of Pharmacodynamics, University of Florida, Box 100487, JHMHC, Gainesville, FL 32611, USA
42. **Pedram A**, Razandi M, Levin ER. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol* 2006;20:1996–2009. [PubMed: 16645038]
43. **Peter J. Kushner**, David A. Agard , Geoffrey L. Greene , Thomas S. Scanlan Andrew K. Shiau, Rosalie M. Uht, Paul Webb, (2000), Estrogen receptor pathways to AP-1, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 74 ,311–317
44. **Prasenjit Dey**, Rodrigo P A Barros, Margaret Warner, Anders Strom and Jan-Åke Gustafsson, (2013), Insight into the mechanisms of action of estrogen receptor b in the breast, prostate, colon and CNS, *Journal of Molecular Endocrinology* 51, T61–T74
45. **R.L. Nussbaum, R.R. McInnes**, Ιατρική Γενετική, Thomson & Thomson, H.F. Willard
46. **Scharfman HE**, Macluskus NJ. Similarities between actions of estrogen and BDNF in the hippocampus: coincidence or clue? *Trends Neurosci* 2005;28:79–85. [PubMed: 15667930]
47. **Scharfman HE**, MacLuskus NJ. Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS. *Front Neuroendocrinol* 2006;27:415–413. [PubMed: 17055560]
48. **Schwend T**, Gustafsson JA. False positives in MALDI-TOF detection of ERbeta in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:707–711. [PubMed: 16563354]
49. **Singh M**, Setalo G, Guan X, Warren M, Toran AC 1999 Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci* 19:1179–1188
50. **Sohrabji F**, Lewis DK. Estrogen-BDNF interactions: implications for neurodegenerative diseases. *Front Neuroendocrinol* 2006;27:404–144. [PubMed: 17069877]
51. **Sohrabji F**, Miranda RC, Toran-Allerand CD. Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11110–11114. [PubMed: 7479947]
52. **Sortino MA**, Chisari M, Merlo S, Vancheri C, Caruso M, Nicoletti F, Canonico PL, Copani A. Glia mediates the neuroprotective action of estradiol on beta-amyloid-induced neuronal death. *Endocrinology* 2004;145:5080–5086. [PubMed: 15308615]
53. **Watters JJ**, Campbell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, Dorsa DM 1997 Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signaling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 138:4030–4033
54. **Xuan Liu**, Xiao-Lan Fan, Yan Zhao, Guang-Rui Luo, Xu-Ping Li, Rui Li and Wei-Dong Le, (2005), Estrogen Provides Neuroprotection Against Activated Microglia-Induced Dopaminergic Neuronal Injury Through Both Estrogen Receptor-a and Estrogen Receptor-b in Microglia, *Journal of Neuroscience Research* 81:653–665
55. **Μ.Ανδρικούλα**, Γ.Βαρθολομάτος, Ενδοκρινολογικό Τμήμα, Τομέας Παθολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Αιματολογικό Εργαστήριο-Μονάδα Μοριακής Βιολογίας, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 2001, review, Απόπτωση, Ο κυτταρικός θάνατος προϋπόθεση για τη ζωή.

