

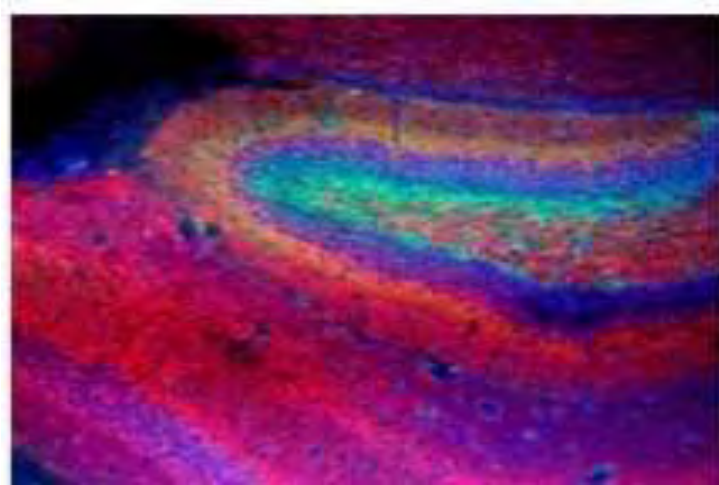


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διερεύνηση της οιστρογονικής δράσης του αλουμινίου σε
νευρικά κύτταρα SH-SY5Y



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ: ΜΙΧΑΛΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : ΔΡ. ANNA-ΜΑΡΙΑ Γ. ΨΑΡΡΑ

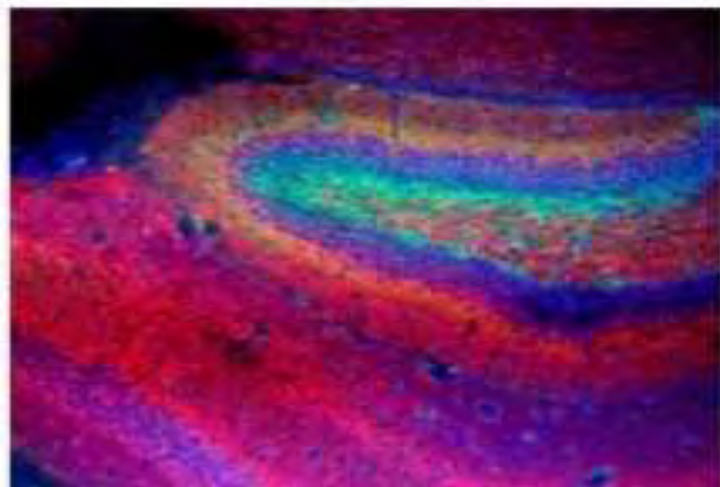


UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES



DEP. OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

Evaluation of aluminum's putative estrogenic activity in neural cell line SH-SY5Y



DIPLOMA THESIS OF THE STUDENT: MICHALOPOULOU MARIA

SUPERVISOR PROFESSOR: DR. ANNA- MARIA G. PSARRA

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.

Μπαλατσός Νικόλαος, Επ. Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.

Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ

Περίληψη

Μετά την ανακάλυψη του πρώτου υποδοχέα οιστρογόνων στις αρχές του '60 από τον Jensen και τους συνεργάτες του, κανείς δε πίστευε ότι η ανακάλυψη ενός δευτέρου υποτύπου το 1996, θα περιέπλεκε τόσο πολύ τους μηχανισμούς της οιστρογονικής σηματοδότησης.

Οι δύο υποδοχείς οιστρογόνων υπάγονται στους πυρηνικούς υποδοχείς στεροειδών ορμονών, παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους και με λειτουργία προσδετο-εξαρτώμενων μεταγραφικών παραγόντων ελέγχουν την ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος και των δευτερογενών φυλετικών χαρακτηριστικών. Ωστόσο, πέραν του αναπαραγωγικού, η δράση τους επεκτείνεται και σε άλλα συστήματα συμπεριλαμβανομένων του νευρικού, του καρδιαγγειακού, του ανοσοποιητικού, του μυοσκελετικού και του ενδοκρινικού. Διαταραχές της οιστρογονικής σηματοδότησης σχετίζονται με την παθοφυσιολογία ποικίλων ασθενειών όπως οι ορμονο-εξαρτώμενοι καρκίνοι, η οστεοπόρωση, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Έτσι, η ανάπτυξη συνθετικών μορίων που ρυθμίζουν στοχευμένα τη δράση των υποδοχέων οιστρογόνων καθίσταται μία πρόκληση για τη θεραπεία αυτών.

Πέρα από τα ενδογενή οιστρογόνα που είναι οι φυσικοί προσδέτες, των υπό εξέταση υποδοχέων, στο περιβάλλον συναντώνται σε αφθονία, μόρια που επηρεάζουν ποικιλοτρόπως την οιστρογονική σηματοδότηση και είναι τα επονομαζόμενα ξενοοιστρογόνα. Εκπρόσωπο αυτών αποτελεί και το γνωστής γενετοξικής δράσης υδροξυ-χλωριούχο αργίλιο (ACH), η έκθεση στο οποίο φαίνεται να σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνων του μαστού και νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η νόσος του Alzheimer. Ωστόσο, η μοριακή βάση των προαναφερθέντων δράσεων δεν είναι αποσαφηνισμένη και προσεγγίζεται μόνο υποθετικά.

Έτσι λοιπόν, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της πιθανής δράσης του υδροξυ-χλωριούχου αργιλίου (ACH) στην ανθρώπινη νευρική κυτταρική σειρά, SH-SY5Y. Δεδομένης του βιβλιογραφικού όγκου, που στηρίζει τη νευροπροστατευτική δράση των οιστρογόνων μέσω συμμετοχής σε αντι-αποπτωτικούς, αντι-φλεγμονώδεις και αντι-οξειδωτικούς μηχανισμούς, μελετήθηκαν μόρια που εμπλέκονται στα παραπάνω. Έτσι, παρουσία ACH, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του δεύτερου υποτύπου οιστρογονικού υποδοχέα, μείωση των επιπέδων αντι-αποπτωτικών μορίων και αντι-οξειδωτικών μορίων, αύξηση προ-αποπτωτικών μορίων και απέλευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια. Η άγνοια ωστόσο γύρω από τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο μεταλλοοιστρογόνα, και εν προκειμένω το ACH, προκαλούν τα παραπάνω, χρήζει περαιτέρω έρευνας, με σκοπό τόσο την κατανόηση της δράσης των οιστρογονικών υποδοχέων στο πολυσύνθετο νευρικό σύστημα όσο και την ανάπτυξη ιστοειδικών ρυθμιστών των ERs.

Abstract

The presence of an estrogen binding receptor protein was first reported in the early sixties by Ewood Jensen and his colleagues. However, in 1996, an additional receptor was cloned from rat prostate. This novel receptor was designated ER β and consequently the originally cloned ER was renamed ER α .

These highly homologous receptors act as ligand dependent nuclear transcription factors, and have a critical role in the development of the female reproductive organs and secondary sex characteristics. In addition to the reproductive system, estrogen receptors have important physiological roles in almost every other area of the body, including the nervous, immune, vascular, muscular, skeletal and endocrine systems. As expected, disruptions in ERs' signaling, therefore, is associated with multiple disorders, including cancer, cardiovascular diseases, hypertension, osteoporosis, neurodegenerative diseases and immune disorders in both males and females. As a result, specific modulation of estrogen receptors by ligands other than estrogen hormones represents an important therapeutic goal toward the treatment of a wide variety of human pathologies.

A large number of natural or synthetic chemicals present in the environment can interfere with estrogen signaling and are often called endocrine disrupting chemicals (EDCs) or xenoestrogens. Aluminium salts (e.g. ACH (aluminum chlorohydrate)) which are used as the active antiperspirant agent in underarm cosmetics are proposed to act as estrogen-like molecules. Although the effects of widespread, long term and increasing use of Al remain unknown, clinical studies show a link between aluminum's genotoxic profile and development of breast cancer and neurodegenerative diseases. Nevertheless, little is known about Al's interference with estrogen signaling and further studies are needed to identify the molecular basis of Al's abovementioned actions.

The aim of the present study is the characterization of the aluminum chlorohydrate's putative estrogenic action in the neural cell line, SH-SY5Y. Taking into account the well-established neuroprotective action of oestrogens against neuronal inflammation, oxidative stress and apoptosis, estrogen responsive molecules that play major roles in the abovementioned mechanisms, have been studied. Thus, it was found that aluminum chlorohydrate's presence, promotes anti-survival signals such as down-regulation of estrogen receptor beta and anti-apoptotic or anti-oxidant molecules and, that is accompanied with up-regulation of apoptotic molecules and CytC release from mitochondria. On the other hand, the exact molecular mechanisms by which, metalloestrogens, and ACH in particular, promote the above mentioned actions, remain to be elucidated. As a matter of fact, more studies are needed to take place, in order not only to understand estrogens' multileveled contribution to neuroprotective mechanisms, but to design tissue-specific estrogen receptors' regulators and to clarify the molecular mechanisms of aluminum actions which is of great importance due to the wide use of aluminum.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	1
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	10
1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ	11
1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ	12
1.3.1 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ERα και Erβ.....	12
1.3.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERs.....	15
A. ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	15
B. ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	17
C. ΣΥΝΔΕΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ & ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ: ΣΥΓΧΡΟΝΙΣΜΕΝΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ.....	18
D. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	20
1.3.3 ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	23
1.4. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	24
1.4.1 ΚΥΡΙΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	24
1.4.2 17β ΕΣΤΡΑΔΙΟΛΗ ΚΑΙ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	26
1.4.3 ΜΟΡΙΑ ΜΕ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ: ΦΥΤΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ, SERMs, SERDs.....	27
1.5 ΞΕΝΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	28
1.5.1 ΜΕΤΑΛΛΟΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	29
1.6 ALUMINUM CHLOROHYDRATE	30
1.6.1 ACH ΚΑΙ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ.....	31
1.7 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....	33
1.7.1 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΩΣ ΤΡΟΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΤΩΝ ΝΕΥΡΩΝΩΝ	33
1.7.2 ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΥΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ.....	34
A. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΘΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ.....	34
B. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΠΤΩΣΗΣ.....	37
C. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ.....	40
2. ΣΚΟΠΟΣ	43

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	44
3.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	44
3.2. ΥΛΙΚΑ.....	44
i. ΧΗΜΙΚΑ.....	44
ii. ΘΡΕΠΤΙΚΑ.....	45
iii. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	45
iv. ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	45
v. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	46
vi. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	46
vii. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ.....	47
3.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	47
3.3.1 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	47
I. ΑΠΟΞΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	47
II. ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	48
III. ΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	49
IV. ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΙΜΟ.....	49
V. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	50
VI. ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ CIS-FBS.....	52
3.3.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΙΩΝ.....	52
3.3.2. 1 ΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΥΧΩΝ (SONICATION) ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ (ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD).....	52
3.3.2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	53
3.3.2.3 ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ.....	54
3.3.2.4 BLOCKING ΜΕ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑ.....	54
3.3.2.5 ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ WESTERN BLOT.....	55
3.3.2.6 ΑΠΟΜΩΝΟΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ TRIZOL.....	56
3.3.2.7 ΠΕΨΗ ΜΕ DNAΣΗ.....	56
3.3.2.8 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT-PCR).....	56
3.3.2.9 REAL-TIME PCR.....	57
3.3.2.10 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΟΥ ΑΤΡ ΜΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΟΥΣΙΦΕΡΙΝΗΣ-ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ.....	58
3.3.2.11 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	59
3.3.2.12 ΣΧΕΔΙΑΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	60

3.3.2.13 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ.....	60
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
4.1 ΈΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ SY-SY5Y.....	61
4.2 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ ER α , ΤΟΥ ER β , ΚΑΙ ΤΟΥ BCL-2 ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ SH-SY5Y.....	62
4.3 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ ER β , ΤΟΥ BCL-2, ΤΗΣ pro CAS-9 ΚΑΙ ΤΗΣ proCAS-3 ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ SH-SY5Y.....	63
4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΡΓΙΛΙΟΥ ΣΤΑ ΕΠΙΓΕΔΑ ΜΟΡΙΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΩΝ ΚΑΙ ΚΥΤΟΣΟΛΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ SH-SY5Y.....	66
4.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΔΡΟΞΥ-ΧΛΩΡΙΟΥΧΟΥ ΑΡΓΙΛΙΟΥ ΣΤΑ ΟΛΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΤΡ ΤΗΣ ΣΕΙΡΑΣ SH-SY5Y.....	69
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	73

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

“Τα μικρά δεντράκια, πρέπει να στηρίζονται πάντα σ’ ένα ξύλο για να μην τα πάρει ο αέρας”. Η παραπάνω φράση του πατέρα μου, αποτελεί καλή αφορμή για να ευχαριστήσω, στο τέλος αυτής της πολυετούς προσπάθειας, όλους όσους έμπρακτα με στήριξαν.

Έτσι, αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, Κα Άννα-Μαρία Ψαρρά, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ Π.Θ., για την προσιτότητά της, την έμπρακτη και καθημερινή υποστήριξή της σε κάθε στιγμή αυτής της πορείας, τον επαγγελματισμό της, τον ουσιαστικό διάλογο και την αμοιβαία προσπάθεια που μας φέρνουν ένα βήμα πιο κοντά στην δυσπρόσιτη επιστημονική “αλήθεια”. Ευχαριστώ επίσης, τον Κο Μπαλατσό Νικόλαο, Επ. Καθηγητή Βιοχημείας ΤΒΒ Π.Θ., και την Κα Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορα Βιοχημείας ΤΒΒ Π.Θ., μέλη της τριμελούς επιτροπής, που βρίσκονταν κι αυτοί δίπλα στον καθημερινό αγώνα των σπουδαστών και των μελών του εργαστηρίου.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα του ΤΒΒ, Βύρωνα Γοργογιέτα, για την ανιδιοτελή βοήθειά του αλλά και τα μαθήματα που πήρα από την άψογη συνεργασία μαζί του, όπως είναι η ταπεινότητα του “αεί διδασκόμενος”, η δύναμη της κάλης κουβέντας και η χαρά του να μοιράζεσαι τη γνώση. Ευχαριστώ επίσης, όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, η παρουσία των οποίων έκανε το κλίμα ευχάριστο, ακόμα και σε δύσκολες στιγμές.

Αναντικατάστατο σίγουρα είναι να μοιράζεται κανείς με φίλους, στιγμές που περικλύουν κοινές αγωνίες, προβληματισμούς, δυσκολίες αλλά και καθημερινές χαρές. Έτσι, για όλα τα παραπάνω, ευχαριστώ τη Φλιάτουρα Βασιλική αλλά και όλες μου τις φίλες, Χρηστίδου Ουρανία, Παπασλατάνη Χριστίνα, Σουλτσιώτη Μαρία, Τσιλιπουνιδάκη Κατερίνα και Τρικαλινού Κωσταντίνα για τις στιγμές που μοιραστήκαμε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου που στήριξε ηθικά την όλη μου προσπάθεια, αλλά και στο σύντροφο μου Νίκο Σταυρόπουλο ο οποίος καθ’ όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας αλλά και εκπόνησης της διπλωματικής, ήταν “εκεί” για να δίνει δύναμη όταν στέρευε.

Συντομογραφίες	Επεξηγήσεις
A	Amper
α.α ,(a.a)	Αμινοξέα
Ab	Antibody
ACH	Aluminum Chlorhydrate: Υδροξυαλωριούχο αργίλιο
AD	Alzheimer's disease:
ADIOL	5-androsten-3β-17β-diol
AF 1	Activation Functions 1
AF 2	Activation Functions 2
APP	Amyloid Precursor Protein
CRE	cAMP Response Elements
CtBP	C-terminal Binding Protein
DBD	DNA Binding Domain
DES	Diethylestradiol
DHEA	Dehydroepiandrosterone
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
FBS	Fetal Bovine Serum
GF1	Growth Factor-1
GPx	Glutathione peroxidase: Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GR	Receptor Glucocorticoid
GSSG	Oxidized glutathione: Οξειδωμένη γλουταθειόνη
HREs	Hormone Response Elements
IGF-1	Insulin Like Growth Factor
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
IMM	Inner Mitochondrial Membrane: Εσωτερική Μιτοχονδριακή Μεμβράνη
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
LBD	Ligand Binding Domain
L.G	L- Glutamine
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
NHRs	Nuclear Hormone Receptors
ΝΣ	Νευρικό Σύστημα
OMM	Outer Mitochondrial Membrane: Εξωτερική Μιτοχονδριακή Μεμβράνη
PPARs	Peroxisome Proliferator-activated Receptors
PD	Parkinson disease
ROS	Reactive Oxygen Species
R.T	Room temperature
SERMs	Selective Estrogen Receptors Modulators
SHBG	Sex Hormone Binding Globulin
SOD	Superoxide Dismutase: Δισμουτάση του Υπεροξειδίου
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances: Ουσίες αντιδρώντες με το θειοβαρβιτουρικό οξύ

1.Εισαγωγή

1.1.Πυρηνικοί Υποδοχείς

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (Nuclear Receptors) συγκροτούν μια μεγάλη οικογένεια προσδετο-εξαρτώμενων μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στον έλεγχο πληθώρας κυτταρικών διεργασιών, περιλαμβάνουν τους πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών (NHRs: Nuclear Hormone Receptors) και τους ορφανούς πυρηνικούς υποδοχείς, ενώ ενδοκυτταρικά εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ή/και στον πυρήνα (Sever, Glass 2013).

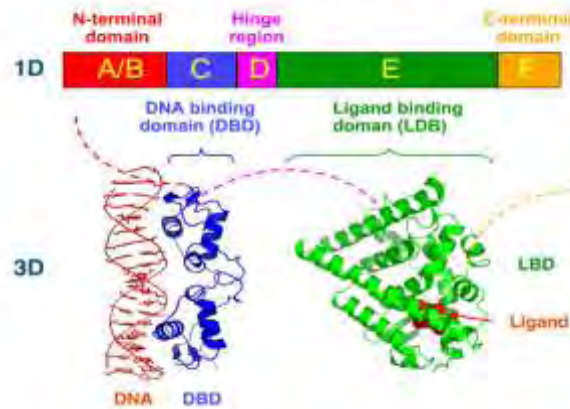
Την έναρξη της δράσης των πυρηνικών υποδοχέων σηματοδοτεί η σύνδεσή τους με λιπόφιλους προσδέτες ορμονικής φύσεως, οι οποίοι διαπερνούν τη λιπιδιακή διπλοστιβάδα μέσω παθητικής διάχυσης. Μετά τη σύνδεση με τους προσδέτες, οι ενεργοποιημένοι πυρηνικοί υποδοχείς, συνήθως συνδέονται σε cis ρυθμιστικά στοιχεία του DNA, τα στοιχεία απόκρισης ορμονών (HRE: Hormone Response Elements), ρυθμίζοντας κατ'αυτό τον τρόπο τη μεταγραφική ενεργότητα πληθώρας γονιδίων (Sever, Glass 2013). Όλοι οι πυρηνικοί υποδοχείς εμφανίζουν συντηρημένα δομικά χαρακτηριστικά και αποτελούνται από 5 βασικές περιοχές (**Εικ.1**):

- A/B: Περιλαμβάνει το ρυθμιστικό N-τελικό άκρο.
- C: Αποτελεί την περιοχή δέσμευσης στο DNA με τις δύο χαρακτηριστικές δομές δακτύλων ψευδαργύρου.
- D: Λειτουργεί ως μία εύκαμπτη δομική περιοχή συνδέοντας την DBD με την LBD.
- E: Περιοχή δέσμευσης του προσδέτη με μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον.
- F: Περιλαμβάνει το C-τελικό άκρο που συνεργατικά με το N-τελικό ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων.

Με βάση το μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης που ακολουθούν, διακρίνονται σε 4 βασικές κατηγορίες (Sever and Glass, 2013):

- Πυρηνικοί υποδοχείς Τύπου I: Μετά τη σύνδεσή τους με τον προσδέτη, οι υποδοχείς τύπου I μεταφέρονται στον πυρήνα όπου σχηματίζουν ομοδιμερή και συνδέονται, με ειδικές περιοχές του DNA που φέρουν ανάστροφες επαναλήψεις για να ρυθμίσουν εκεί τη μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου-στόχου. Σε αυτή την κατηγορία υπάγονται οι υποδοχείς των οιστρογόνων (ERs), οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών (GRs), της προγεστερόνης, των αλατοκορτικοειδών και των ανδρογόνων.
- Πυρηνικοί υποδοχείς Τύπου II: Ανεξαρτήτως της πρόσδεσης με φυσικούς προσδέτες, διατηρούνται στον πυρήνα και συνδέονται με το γενετικό υλικό ως ετεροδιμερή, προσδεδεμένοι σε ευθείες επαναλήψεις του DNA. Σε αυτή τη μορφή είναι προσδεδεμένοι με συγκαταστολές και αποσιωπώνται τα γονίδια-στόχοι. Η δέσμευση του φυσικού προσδέτη επάγει απελευθέρωση των συγκαταστολέων, στρατολόγηση συν-ενεργοποιητών και εκκίνηση της γονιδιακής έκφρασης. Εδώ περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων, οι PPARs (Peroxisome Proliferator-activated Receptors), Liver X receptors και οι υποδοχείς της βιταμίνης D (VDRs) (Sardre and Glass, 2013).
- Πυρηνικοί υποδοχείς Τύπου III: Προσομοιάζουν τους υποδοχείς του τύπου I με τη διαφορά να παρατηρείται στα HREs, καθώς εμφανίζουν ευθείες επαναλήψεις και όχι ανάστροφες.
- Πυρηνικοί υποδοχείς Τύπου IV: Προσδένονται ως μονομερή (Sardre and Glass, 2013).

Structural Organization of Nuclear Receptors



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της δομικής οργάνωσης των πυρηνικών υποδοχέων. Πάνω: Η πρωτοταγής δομή ενός πυρηνικού υποδοχέα όπου διακρίνονται οι διάφορες δομικές περιοχές. Κάτω: Η τριτοταγής δομή των περιοχών DBD και LBD συνδεδεμένων με το DNA και τον προσδέτη αντίστοιχα. Οι δομές ανήκουν στον υποδοχέα οιστρογόνων.

1.2 Υποδοχείς Στεροειδών Ορμονών και Στεροειδείς Ορμόνες

Μελετώντας τους πυρηνικούς υποδοχείς στο σύνολό τους, συναντούμε και μία υποκατηγορία αυτών, τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών όντας και αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες, εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα, στην κυτταρική μεμβράνη, και όπως είναι αναμενόμενο η δομή τους παρουσιάζει ομολογία με αυτή των υποδοχέων της ίδιας οικογενείας (**Εικ.2**). Περιλαμβάνουν δύο κύριες ομάδες, τους υποδοχείς οιστρογόνων και τους υποδοχείς 3-κετοστεροειδών (υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών, αλατοκορτικοειδών, προγεστερόνης και ανδρογόνων).

Φυσικοί προσδέτες των υποδοχέων στεροειδών ορμονών δεν είναι άλλοι από τα γνωστά παράγωγα της χοληστερόλης, τις στεροειδείς ορμόνες που διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες, τα κορτικοστεροειδή (αλατοκορτικοστεροειδή και γλυκοκορτικοειδή) και τις ορμόνες του φύλου (οιστρογόνα, ανδρογόνα, προγεστερόνη).

Απουσία στεροειδών ορμονών οι υπό εξέταση υποδοχείς παραμένουν ως ανενεργό σύμπλοκο (απο-υποδοχείς) με ανοσοφιλίνες και πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Hsp90, Hsp70, Hsp56) οι οποίες βοηθούν στην αποφυγή λανθασμένων μορφών αναδίπλωσης (Fiochetti et al., 2012). Με την είσοδο μέσω διάχυσης, της λιπόφιλης στεροειδούς ορμόνης στο κύτταρο, και με την πρόσδεσή της στον υποδοχέα, ο τελευταίος αποδεσμεύεται από τις Hsp λόγω αλλαγής στη στερεοδιαμόρφωσή του. Η απελευθέρωση από τις Hsp, αφήνει εκτεθειμένη την αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού καθώς και την DBD (Sever and Glass, 2013, Yang et al., 2004). Ακολουθεί διμερισμός του υποδοχέα και μετατόπιση του διμερούς αυτού στον πυρήνα. Εκεί, με την πρόσδεσή του στα HREs ο υποδοχέας στεροειδών ορμονών ασκεί τη γενωμική του δράση αφού η στρατολόγηση επιπλέον ρυθμιστικών παραγόντων με ικανότητα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, του επιτρέπουν να ρυθμίσει άμεσα τη μεταγραφική ενεργότητα των εκάστοτε γονιδίων-στόχων του.



Εικόνα 2: Ομολογία στις αλληλουχίες των LBDs επιλεγμένων στεροειδών και πυρηνικών υποδοχέων. Η 2^η δομή μετά κρυσταλλογράφησης εμφανίζεται με πράσινο (α-έλικες) και γαλάζιο (β-πτυχωτά φύλλα). Αμινοξικά κατάλοιπα που συμμετέχουν στη δέσμευση της ορμόνης και στο διμερισμό φαίνονται με μωβ και κίτρινο αντίστοιχα (Tanenbaum et al., 1998).

Πέρα από την κλασική γενωμική τους δράση, οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών διαθέτουν επίσης την ικανότητα πρόκλησης μιας αμεσότερης δράσης, της μη γενωμικής. Η τελευταία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση σηματοδότησης μέσω πυροδότησης μονοπατιών που οδηγούν σε άμεσες αποκρίσεις. Προκειμένου να παραμείνει εύρυθμη η ορμονική δράση στους ιστούς-στόχους, οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο και μέσω ανατροφοδοτικού μηχανισμού υφίστανται προσδετο-επαγόμενη καταστολή.

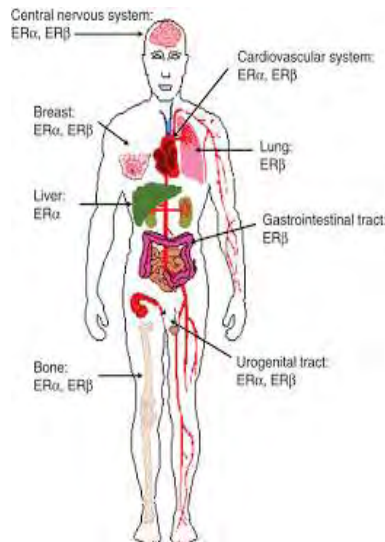
1.3. Υποδοχείς Οιστρογόνων

Διανύοντας το ταξίδι με τους υποδοχείς στεροειδών περνάμε στο είδος που θα μας απασχολήσει, και δεν είναι άλλο από τους πολυμελετημένους υποδοχείς οιστρογόνων οι οποίοι λειτουργώντας και αυτοί, κυρίως ως προσδετο-εξαρτώμενοι μεταγραφικοί παράγοντες, ασκούν τη δράση τους κατά βάση στο αναπαραγωγικό σύστημα.

Οστόσο οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs: Estrogen Receptors) συμμετέχουν έκδηλα σε πληθώρα διεργασιών όπως η διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και εμπλέκονται επίσης σε παθολογικούς φαινοτύπους συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του μαστού και του ενδομητρίου, της οστεοπόρωσης και ορισμένων καρδιαγγειακών νόσων. Έτσι, η μελέτη της οιστρογονικής σηματοδότησης καθίσταται επιτακτική αρχικά για την αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων ασκούν τη δράση τους και κατ' επέκταση για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας των ασθενειών που συμμετέχουν.

1.3.1 Υποδοχείς Οιστρογόνων ERα και ERβ

Οι δύο υπότυποι των υποδοχέων οιστρογόνων, ERα και ERβ, είναι κατανεμημένοι σε ολόκληρο το ανθρώπινο σώμα και οι ιστοί όπου ασκούν επίδραση, είναι ανάμεσα σε άλλους, ο μαστός, το ενδομήτριο, το ήπαρ, ο εγκέφαλος, τα οστά και το μυοκάρδιο (**Εικ.3**). Η ανακάλυψη του δεύτερου υποδοχέα οιστρογόνων, του ERβ, και αρκετών ισομορφών αυτού, επιβεβαίωσε την πολύπλοκη φύση της οιστρογονικής σηματοδότησης και συνηγόρησε στην διερεύνησης της οιστρογονικής δράσης σε ιστούς που δεν εκφράζουν τον ERα (Heldring et al., 2007).



Εικόνα3.Κατανομή των υποδοχέων οιστρογόνων (ERα και ERβ) στο ανθρώπινο σώμα (www.bio.cmu.org)

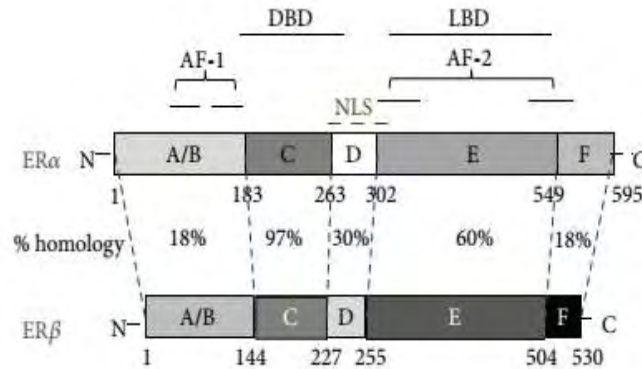
Οι ανθρώπινοι ERα και ERβ κωδικοποιούνται από δύο γονίδια που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, το *ESR1* (Estrogen Receptor 1) και το *ESR2* (Estrogen Receptor 2) των γενετικών τόπων 6q25.1 και 14q23-24.1, αντίστοιχα.

Ωστόσο, καθώς υπάγονται στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, οι υποδοχείς οιστρογόνων αποτελούνται από κοινές συντηρημένες περιοχές με διακριτό δομικό και λειτουργικό ρόλο (Περιοχές A/B,C,D και E/F). Το N-τελικό άκρο (Περιοχή A/B) δεν είναι τόσο συντηρημένο και αποτελεί τη πιο μεταβλητή περιοχή τόσο στην αλληλουχία όσο και στο μήκος. Εμπλέκεται σε διαμοριακές αλλά και σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις και εμπεριέχοντας την περιοχή AF-1 (Activation Function-1), συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργότητα. Δεύτερη, βρίσκεται η κεντρική και πιο συντηρημένη περιοχή, η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και τη δέσμευση στο DNA (DBD:DNA Binding Domain)(Περιοχή C). Η περιοχή αυτή, επιτρέπει το διμερισμό του υποδοχέα και τη δέσμευσή του, μέσω δύο δομών δακτύλων ψευδαργύρου (Zinc Finger), σε ανάστροφες εξαμερείς επαναλήψεις του DNA που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (EREs:Estrogen Response Elements). Έπεται η περιοχή D, η οποία εκτός του ότι συνδέει τις περιοχές C και E μεταξύ τους, συμμετέχει στο διμερισμό του υποδοχέα αλλά και στη σύνδεσή του με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Στο C-τελικό άκρο (Περιοχή E/F) βρίσκεται η περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (LBD: Ligand Binding Domain), που περιλαμβάνει επίσης την AF-2 περιοχή (Activation Function-2) και συνεργατικά με το N-τελικό άκρο ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων (Heldring et al., 2006).

Τόσο ο ERα όσο και ο ERβ εκτός από το N-τελικό τους άκρο, μοιράζονται υψηλό βαθμό αλληλουχικής ομοιότητας, έχουν παρόμοια συγγένεια με την E2 και δεσμεύονται στα ίδια στοιχεία του γενετικού υλικού(**Εικ.4**).

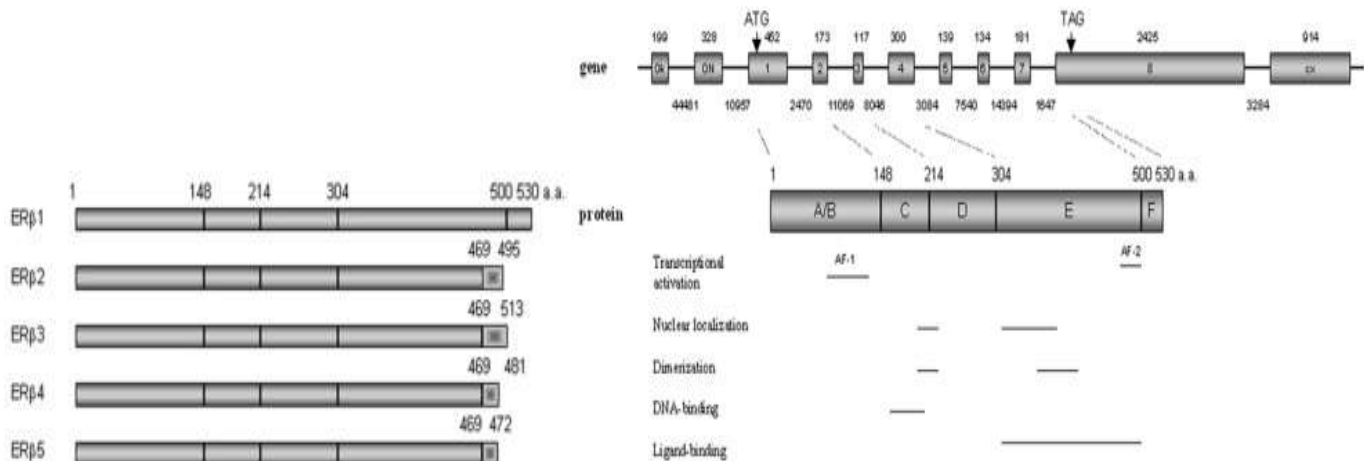
Η μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα διευκολύνεται από δύο διακριτές περιοχές ενεργοποίησης, την ιδιосуστάτα ενεργή AF-1 (Activation Function- 1), και την προσδετο-εξαρτώμενη AF-2. Η περιοχή AF-2, περιλαμβάνει μία υψηλά συντηρημένη αμφιπαθή έλικα (H12), η οποία είναι απαραίτητη τόσο για τη μεταγραφική ενεργότητα ολόκληρου του υποδοχέα, όσο και την αλληλεπίδρασή του με άλλους συνενεργοποιητές (Halletal. 2001). Οι δύο αυτές περιοχές, αλληλεπιδρώντας με πολλούς συνενεργοποιητές της μεταγραφής, μπορούν να δράσουν και

ανεξαρτήτως η μία της άλλης, ωστόσο ως επί τω πλείω δρουν συνεργατικά, ρυθμίζοντας από κοινού τη μεταγραφική ενεργότητα.



Εικόνα 4. Δομική οργάνωση των Υποδοχέων Οιστρογόνων. Οι ERs έχουν συντηρημένη δομή. Αποτελούνται από το N-τελικό άκρο που εμπλέκεται στην trans ενεργοποίηση (A/B περιοχές, AF-1), τη περιοχή δέσμευσης του DNA (DBD, Περιοχή C), τη συνδετική περιοχή D και το C-τελικό άκρο με τη περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (LBD: Ligand Binding Domain) και την AF-2. Τα ποσοστά υποδηλώνουν την ομολογία μεταξύ των δύο υποδοχέων. (Kerdivel et al., 2013)

Και για τους δύο υποτύπους, έχουν βρεθεί αρκετές ισομορφές. Οι ισομορφές του ERα, διαφέρουν κυρίως στην 5'UTR και όχι στην κωδική περιοχή (Heldring et al., 2007) ενώ για τον ERβ, οι ισομορφές προκύπτουν συν τοις άλλοις από εναλλακτικό μάτισμα των τελευταίων εξονίων ή από διαγραφή ενός ή περισσότερων εξονίων (Zhao et al., 2008). Ανάμεσα σε αυτά, στον άνθρωπο έχουν βρεθεί 5 full length transcripts, Erβ1-5, εκ των οποίων ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει ο ERβ2 που σχηματίζοντας ετεροδιμερές με τον ERα, επάγει την πρωτεοσωμική αποκοδόμηση του τελευταίου (Zhao et al., 2008) (Εικ.5).



Εικόνα 5: Δομή του γονιδίου ESR2 στον άνθρωπο, η πρωτεΐνη (ERβ) με τις λειτουργικές περιοχές της και οι ισομορφές του mRNA. Γονίδιο: Με κουτιά παρουσιάζονται τα εξόνια, με γραμμές τα ιντρόνια. Το μέγεθος (bp) κάθε εξονίου και ιντρόνιου, φαίνεται από τους αριθμούς πάνω από το κάθε κουτί και κάτω από κάθε γραμμή αντίστοιχα. Πρωτεΐνη: Οι αριθμοί απεικονίζουν το μέγεθος της πρωτεΐνης σε αα. Ισομορφές: Διαφορές στα C-τελικά άκρα ανάμεσα στις διάφορες ισομορφές (Zhao et al., 2008).

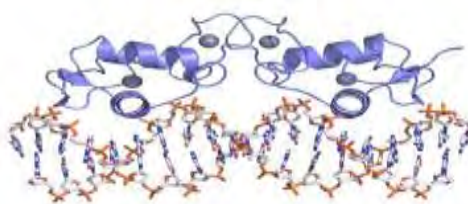
1.3.2. Μηχανισμοί Δράσης των ERs

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι υπάρχουν αρκετά μονοπάτια μέσω των οποίων οι ERs εμπλέκονται στη ρύθμιση βιολογικών διεργασιών (Heldring et al. 2007). Ας περιγράψουμε τα κυριότερα:

A) Γενωμική Δράση

- Προσδετο-εξαρτώμενη Άμεση Σύνδεση στο DNA

Μετά τη διάχυση του οιστρογόνου ενδοκυτταρικά και τη πρόσδεσή του στον ER, αυτός αποκτά μία στερεοδιαμόρφωση που επιτρέπει την αποδέσμευσή του από τις Hsp και το διμερισμό του. Σε ένα κλασσικό γενωμικό μονοπάτι όπως αυτο που περιγράφουμε, ακολουθεί μετατόπιση του διμερούς στον πυρήνα και πρόσδεσή του σε στοιχεία απόκρισης στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων. Τα EREs (Estrogen Response Elements) είναι ανάστροφες επαναλήψεις της παλίνδρομης αλληλουχίας 5'-AGGTCANNNTGACCT-3' (Εικ. 6).



Εικόνα 6. Κρυσταλλική Δομή του Συμλόκου DBD-DNA. Ο ER προσδέεται ως διμερές στην παλίνδρομη θέση δέσμευσής του. (Schwabe JW et al. 1993).

Μεγιστοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας επιτυγχάνεται μέσω της ανεξάρτητης προσδέτη AF-1 περιοχής, και της προσδετοεξαρτώμενης AF-2. Με στόχο τη περαιτέρω ρύθμιση στρατολογείται πληθώρα ρυθμιστικών συμπαραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των συμπλόκων αναδιάταξης της χρωματίνης, συνενεργοποιητών (p160/SRC, CBP, p300), συγκαταστολέων (NCoR, MTA1) αλλά και μορίων με διττή φύση (PELP-1). Η αλληλουχία του στοιχείου απόκρισης επηρεάζει σημαντικά όχι μόνο την αγχιστεία του υποδοχέα με το DNA αλλά και την ικανότητα δέσμευσης αυτών των συμπαραγόντων, αφού φαίνεται ότι τα EREs ασκούν αλλοστερική επίδραση στους ERs.

Ανάμεσα στο σύνολο των γονιδίων που υπόκεινται σε οιστρογονικό έλεγχο, και έχουν βρεθεί μέσω RT-PCR ή στυπώματος κατά Western/ Northern, λίγα είναι αυτά που διαθέτουν λειτουργικά EREs στη ρυθμιστική τους περιοχή. Αυτά περιλαμβάνουν μεταγραφικούς παράγοντες (*JUN*, *FOS*, *PGR*, *TP53*), ένζυμα (*CHAT*, *NQO1*, *CKB*), μόρια ενδοκυττάριας σηματοδότησης (*HRAS*, *BCL-2*, *BRCA1*), εκκρινόμενες πρωτεΐνες (*LTF*, *SCGB1A1*, *OVGP1*, *C3*, *AGT*), μεμβρανικές πρωτεΐνες (*SNAT2*, *VEGFA*), ορμόνες (*LHB*, *OXT*, *PRL*, *AVP*) και τέλος τη πρωτεάση CTSD. (Ikeda et al., 2015).

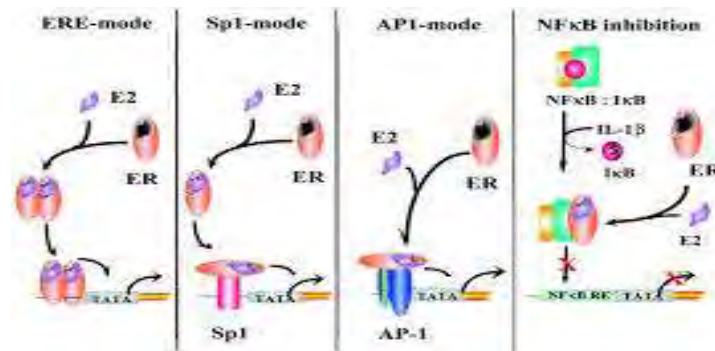
- Προδetoεξαρτώμενη Έμμεση Σύνδεση στο DNA

Η πρόσδεση ωστόσο σε EREs δεν είναι μονόδρομος για να ασκήσει ο υποδοχέας οιστρογόνων τη δράση του. Αυτό συμβαίνει διότι υπάρχει μια κατηγορία υποκινητών, η οποία στερείται αυτών των αλληλουχιών, και απαιτεί τη δέσμευση στο DNA, ενός δεύτερου μεταγραφικού παράγοντα που θα μεσολαβήσει για τη στρατολόγηση του ER (μεταγραφικό cross-talk) (Marino et al., 2006). Παραδείγματα τέτοιων μεταγραφικών παραγόντων είναι η Sp-1 (Stimulating protein-1), η AP-1 (activator protein-1) και ο NF-κB (nuclear factor-κB).

Ο μεταγραφικός παράγοντας Sp-1 αποτελεί τον κύριο μεσολαβητή της έμμεσης σύνδεσης του ER με το DNA και μέσω αυτού επάγεται η μεταγραφή πληθώρας γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες όπως ο υποδοχέας LDL, η ενδοθηλιακή συνθάση του οξειδίου του αζώτου (eNOS), ο c-fos, η κυκλίνη D1 και ο υποδοχέας του ρετινοϊκού οξέος. Ο ER και η DBD του, σταθεροποιούν τη σύνδεση του Sp-1 με τις πλούσιες σε GC αλληλουχίες του υποκινητή και συμβάλλουν στη στρατολόγηση συνενεργοποιητών (Marino et al., 2006). Οι ERs χρησιμοποιούν επίσης τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μέσω Ap-1 προκειμένου να επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων όπως αυτών της κολλαγενάσης, του IGFR (Insulin-Like Growing Factor Receptor), της οβαλβουμίνης και της κυκλίνης D1. Το σύμπλοκο Ap-1, αποτελούμενο από διμερή της πρωτεΐνης Jun και ετεροδιμερή Jun/Fos, σχετίζεται επομένως άμεσα με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (Marino et al., 2006).

Εν αντιθέσει με τον ERα, ο ERβ λόγω της απουσίας λειτουργικής AF-1, αδυνατεί να επάγει τη μεταγραφή στις θέσεις AP-1. Αντίθετες δράσεις εμφανίζουν επίσης και στη θέση Sp-1 με αποτέλεσμα, στην έκφραση του CD-1 για παράδειγμα, ο ERα να έχει επαγωγική δράση και ο ERβ, ανασταλτική (Marino et al., 2006).

Παρόμοιο παράδειγμα, είναι η αρνητική ρύθμιση των επιπέδων της κυτοκίνης IL-6, μέσω σύνδεσης του ERα με τον NF-κB. Η δέσμευση αυτή εμποδίζει την πρόσδεση του τελευταίου στον υποκινητή του γονιδίου της IL-6 και την έναρξη της μεταγραφής του (Marino et al., 2006).



Εικόνα 7. Προδetoεξαρτώμενη Γενωμική Δράση των ERs. Πραγματοποιείται μέσω EREs, Sp-1, Ap-1 και NF-κB (Βλ. κείμενο για λεπτομέρειες) (Nilson et al., 2001).

Στις παραπάνω γενωμικές οδούς το τελικό αποτέλεσμα θα κριθεί από τη στρατολόγηση συνενεργοποιητών και συγκαταστολέων, οι οποίοι μέσω του μοτίβου LLXXL αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς οιστρογόνων και δημιουργούν κατάλληλα το πεδίο για έναρξη ή όχι της μεταγραφής (Marino et al., 2006).

- Ανεξάρτητη Προσδέτη Άμεση Σύνδεση στο DNA

Τα σηματοδοτικά μονοπατιά που πυροδοτούν ορισμένοι πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες, όπως ο EGF και ο IGF-1, χαρακτηρίζονται από δράση κινασών και αλληπάλληλες φωσφορυλιώσεις, οι οποίες ενεργοποιούν τους υποδοχείς οιστρογόνων ή συγγενικούς τους παράγοντες, απουσία προσδέτη.

B) Μη Γενωμική Δράση

Εν αντιθέσει με τη γενωμική δράση που απαιτεί τουλάχιστον 2 ώρες για να εμφανιστεί, οιστρογονική δράση παρατηρείται λίγα μόλις λεπτά ή ακόμα και δευτερόλεπτα μετά την προσθήκη 17β-εστραδιόλης, του δραστικότερου φυσικού προσδέτη των ER. Αν συνυπολογίσουμε δε, και ότι το 1/3 των γονιδίων που υπόκεινται σε οιστρογονική ρύθμιση, δεν διαθέτουν EREs στις ρυθμιστικές περιοχές τους, οφείλει να υπάρχει κι άλλος τρόπος ρύθμισης μέσω ERs (Fiochetti et al, 2012).

Πράγματι, τα παραπάνω αποδίδονται σε ένα μη γενωμικό μηχανισμό οιστρογονικής σηματοδότησης γνωστό και ως "ταχεία δράση" όπου λαμβάνει χώρα ενεργοποίηση κινασών, φωσφατασών και αύξηση της ιοντικής ροής δια μέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Τέσσερα κύρια μονοπάτια που πυροδοτούνται μέσω μη γενωμικών δράσεων είναι αυτά των PLC/PKC, Ras/Raf/MAPK, PI3K/AKT και cAMP/ PKA, τα οποία με τη σειρά τους αλληλεπιδρούν με πολλά άλλα, για να εκτοξεύσουν συνολικά την πολυπλοκότητα της οιστρογονικής σηματοδότησης (Bjornstrom and Sjoberg, 2005), (Marino et al., 2006).

- **cAMP/ PKA** : Η ενεργοποίηση για παράδειγμα του μεταγραφικού παράγοντα CREB σε νευροβλαστωματικά κύτταρα, είναι αποτέλεσμα της γρήγορης δράσης των ERs, και μάλιστα εξαρτάται από το μονοπάτι cAMP/ PKA. Περιλαμβάνει την κίνηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης με σκοπό την παραγωγή cAMP. Αυτό έχει ως επόμενο βήμα στον ενδοκυτταρικό καταρράκτη μεταγωγής σήματος, να ενεργοποιηθεί η σηματοδότηση μέσω MAPK.
- **Ras/Raf/MAPK** : Πυροδότηση του μονοπατιού πραγματοποιείται και από τον υποδοχέα του IGF-1, ο οποίος ενεργοποιείται από την αλληλεπίδρασή του με το σύμπλοκο ERα-E2. Μετά την δέσμευση του προσδέτη στον ER, φωσφορυλιώσεις και σχηματισμοί συμπλόκων από παράγοντες που στρατολογούνται (Src, SHC, GRB2, SOS), ενεργοποιούν το Ras/Raf/MAPK μονοπάτι και μόρια που συμμετέχουν στη μεταγραφή (όπως ERK-1/2, JNK και η p38), για να κινητοποιήσουν τη μετατόπισή τους στον πυρήνα. Μέσω των διαδοχικών φωσφορυλιώσεων που προκύπτουν από το μονοπάτι των MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) αφενός αυξάνεται η μεταγραφική απόδοση του ER (μέσω φωσφορυλίωσης της Ser 118) και αφετέρου ενισχύεται η δραστηριότητα της AF-1 περιοχής του. Επικουρικά, μία κινάση στόχος των MAPK, η RSK (p90 Ribosomal-S6-Kinase), φωσφορυλιώνει τον ER στη Ser 167 αυξάνοντας και αυτή με τη σειρά της, τη μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα.
- **PI3K/Akt** : Τα αντιαποπτωτικά αποτελέσματα της δράσης των ERs επιτυγχάνονται μέσω της ενεργοποίησης των GPCRs και του μονοπατιού της Akt. Σε ενδοθηλικά κύτταρα, μέσω του Src/PI3K/AKT μονοπατιού, διαμεσολαβείται γρήγορη ενεργοποίηση της eNOS μέσω E2 και απελευθέρωση μονοξειδίου του αζώτου. Το σύμπλοκο ERα-E2 ενεργοποιεί τον υποδοχέα

του EGF μέσω κινητοποίησης G-πρωτεϊνών, Src, και μεταλλοπρωτεϊναισών, οδηγώντας σε γρήγορη ενεργοποίηση της PI3K/AKT σηματοδότησης.

Η ταχύτητα με την οποία εξελίσσονται οι παραπάνω δράσεις, απαιτεί παρουσία των ERs στην κυτταρική μεμβράνη και έτσι σήμερα έχουν αναγνωριστεί ο 7-TM GPR30 (Prossnitz and Barton, 2011).

Γ) Σύνδεση Γενωμικής & Μη Γενωμικής Δράσης : Συγχρονισμένη Ρύθμιση της Μεταγραφής

Εύκολα καταλαβαίνει κανείς, ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια μπορούν να συνδέουν τις προαναφερθείσες οιστρογονικές δράσεις, τη γενωμική και τη μη γενωμική. Έτσι, αφού πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζονται μέσω κινασών, πιθανότατα να είναι και στόχοι των μη γενωμικών οιστρογονικών δράσεων. Αυτός ο καινοφανής μηχανισμός που συνδιάζει τις γενωμικές με τις μη γενωμικές δράσεις και με τον οποίο οι ERs ρυθμίζουν τη μεταγραφή σε εναλλακτικά στοιχεία απόκρισης (response elements), δρα συνεργιστικά με τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που χαρακτηρίζουν την προσδετοεξαρτώμενη έμμεση οιστρογονική σύνδεση στο DNA. Ας δούμε μερικά παραδείγματα τέτοιας ρύθμισης:

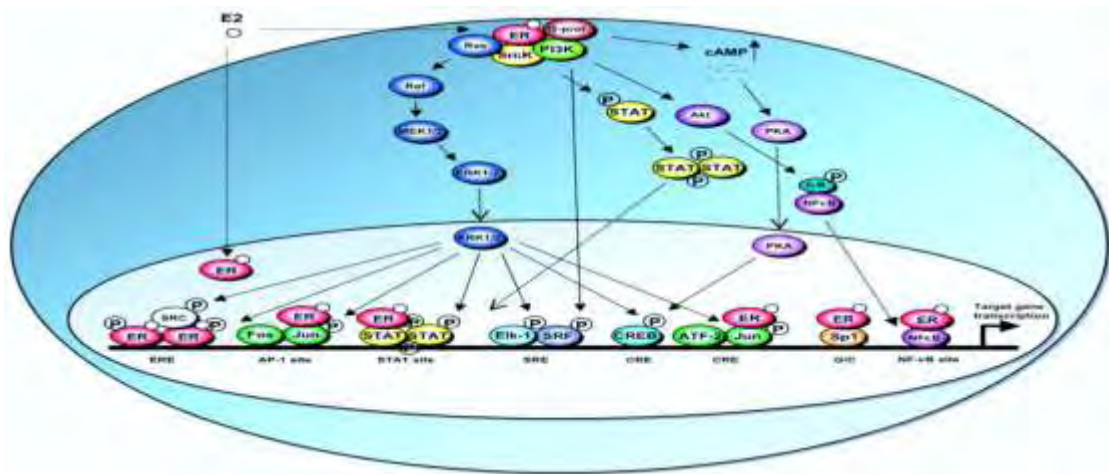
- Μεταγραφικός παράγοντας CREB [cAMP response element (CRE) binding protein]: Ο CREB είναι στόχος φωσφορυλίωσης και των MAP κινασών και της PKA μέσω cAMP. Τα δύο αυτά μονοπάτια, φαίνεται να ενεργοποιούνται από τη 17β-εστραδιόλη και να ενεργοποιούν τον παράγοντα CREB, ο οποίος επάγει την έκφραση των γονιδίων που περιέχουν CREs στις ρυθμιστικές περιοχές τους.
- Μεταγραφικός παράγοντας AP-1(Activator Protein-1): Στόχος του μονοπατιού των MAPK είναι και ο AP-1, του οποίου η ικανότητα δέσμευσης στο DNA και η μεταγραφική ενεργότητα ενισχύονται, μετά από προσθήκη 17β-εστραδιόλης.
- Μεταγραφικός παράγοντας NF-κB (nuclear factor-κB): Σε αντιστοιχία με τον παράγοντα CREB, ο NF-κB φωσφορυλιώνεται από την κίνηση Akt, και έτσι η επαγωγή του μονοπατιού PI-3 /Akt από 17β-εστραδιόλη, οδηγεί στην έκφραση των γονιδίων που έχουν θέσεις πρόσδεσης του NF-κB στα cis-ρυθμιστικά στοιχεία.

Αξιοσημείωτο είναι ότι και οι δύο υπότυποι των ER, είναι οι ίδιοι στόχοι φωσφορυλίωσης των MAP κινασών. Έτσι, οι μη γενωμικές οιστρογονικές δράσεις ρυθμίζουν τη λειτουργία των ίδιων των υποδοχέων δείχνοντας ότι με αυτό το τρόπο διευρύνουν τον κλασσικό τρόπο λειτουργίας τους.

“Το ένα χέρι νίβει το άλλο και τα δύο....τη Ρύθμιση της Μεταγραφής”

Οι υποδοχείς οιστρογόνων λοιπόν, όχι μόνο δρουν οι ίδιοι σαν ρυθμιστικοί παράγοντες, αλλά ρυθμίζουν επιπλέον και τη λειτουργία άλλων μεταγραφικών παραγόντων, μέσω δύο διακριτών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί,εναρμονισμένοι με τις κλασσικές γενωμικές δράσεις μέσω EREs, περιλαμβάνουν τόσο πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις στον πυρήνα όσο και πυροδότηση μονοπατιών με αφετηρία την κυτταρική μεμβράνη. Οφείλει να ληφθεί υπ’όψη ότι οι υποκινητές των γονιδίων ρυθμίζονται από πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων που δεσμεύονται σε διακριτές ρυθμιστικές περιοχές. Έτσι, μία σύγκλιση της γενωμικής και της μη γενωμικής οιστρογονικής δράσης σε πολλαπλά

στοιχεία απόκρισης, δίνει στους ERs τη δυνατότητα να συγχρονίζουν μαεστρικά τη μεταγραφή (Εικ.8) (Bjornstrom and Sjoberg, 2005).

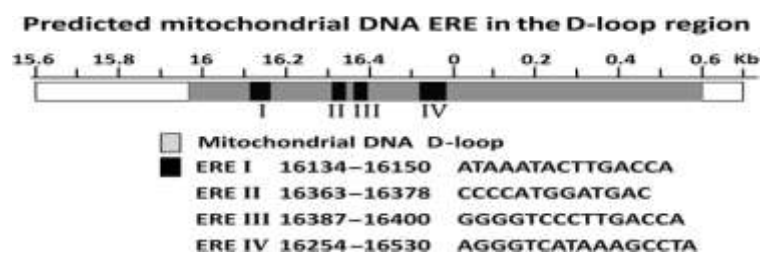


Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της πιθανής σύγκλισης, γενωμικής και μη γενωμικής οιστρογονικής δράσης, στον υποκινητή ενός γονιδίου στόχου (Bjornstrom and Sjoberg, 2005).

Δ) Μιτοχονδριακή Δράση

Το μιτοχόνδριο, είναι αναμφιβόλως εκείνο το κυτταρικό οργανίδιο που διατηρεί ομαλή την διεξαγωγή πληθώρας κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων του λιπιδιακού μεταβολισμού, της ιοντικής ομοιόστασης, της παραγωγής ενέργειας, της βιοσύνθεσης στεροειδών αλλά και της απόπτωσης (Arnold et al., 2012). Διαθέτωντας το δικό του γενετικό υλικό των 16.6 kb (mtDNA), οργανωμένο σε μία δίκλωνη/κυκλική και συμπαγή δομή, κωδικοποιεί με φειδώ 13 mRNA (άνευ ιντρονίων), 22 tRNA και 2 rRNA, μέσω 2 υποκινητών (P_L και P_H) της περιοχής D-loop, η οποία είναι και η μόνη μη κωδική στο σύνολο του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Chen and Russo, 2008).

Το 1996 από τους Sekeris et al, προτείνεται ότι το mtDNA εμπεριέχει αλληλουχίες που προσομοιάζουν στα EREs και εικάζεται η οιστρογονική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο μιτοχόνδριο, μέσω της κλασσικής γενωμικής οδού (Yang et al, 2004). Αργότερα, πιθανολογείται η παρουσία τεσσάρων τέτοιων αλληλουχιών στη περιοχή D-loop του mtDNA (Liao et al., 2015)(Εικ.9). Η εμφάνιση των ERs, και κυρίως του ERβ, στα μιτοχόνδρια ολοένα και περισσότερων ιστών (σπερματοκύτταρα, καρδιομυοκύτταρα, ωκύτταρα, υποκαμπικούς νευρώνες κ.α) και κυτταρικών σειρών (HepG2, SaOS-2, MCF-7), ταυτόχρονα με τη παρουσία πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων στο μιτοχόνδριο (p53, NF-κB, AP-1, CREB, wnt, c-src και c-myc), υποδηλώνει την οιστρογονική συμμετοχή στη ρύθμιση μιτοχονδριακών γονιδίων (Klinge et al., 2008).

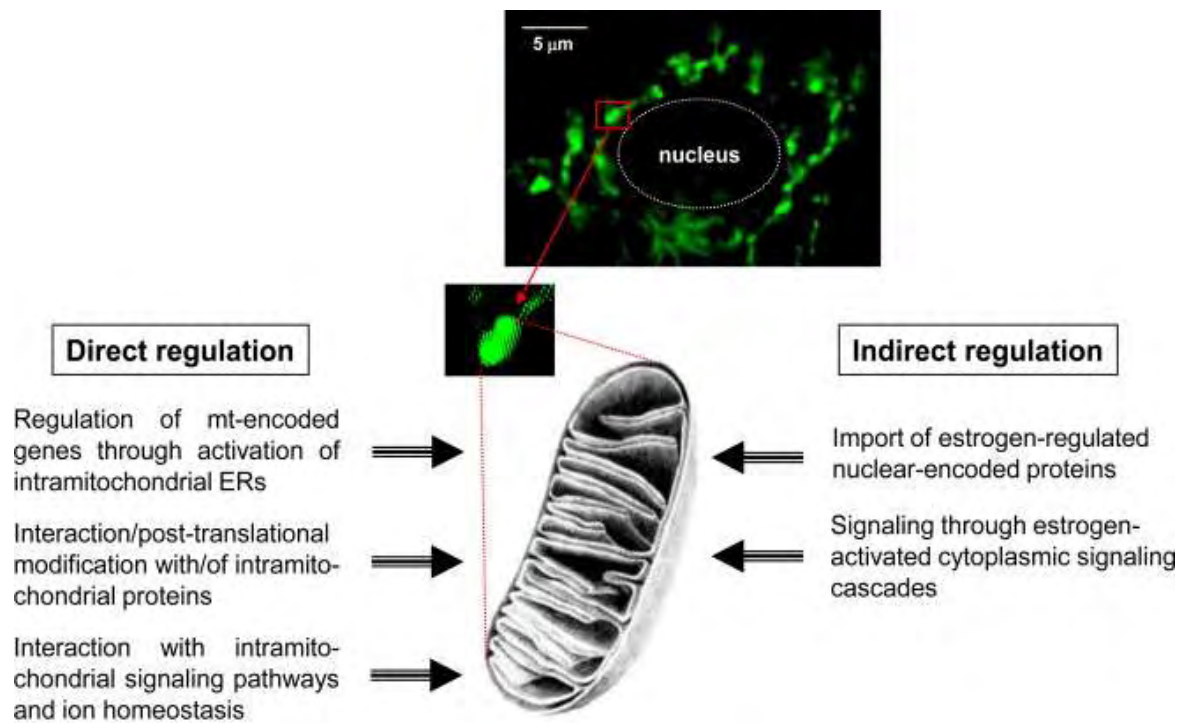


Εικόνα 9. Πιθανά EREs στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Liao et al., 2015).

Στη βιβλιογραφία, υπάρχει όγκος πειραματικών δεδομένων που υποστηρίζει τη συμμετοχή των οιστρογόνων και των ERs στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής δραστηριότητας. Ενδεικτικά αναφέρονται:

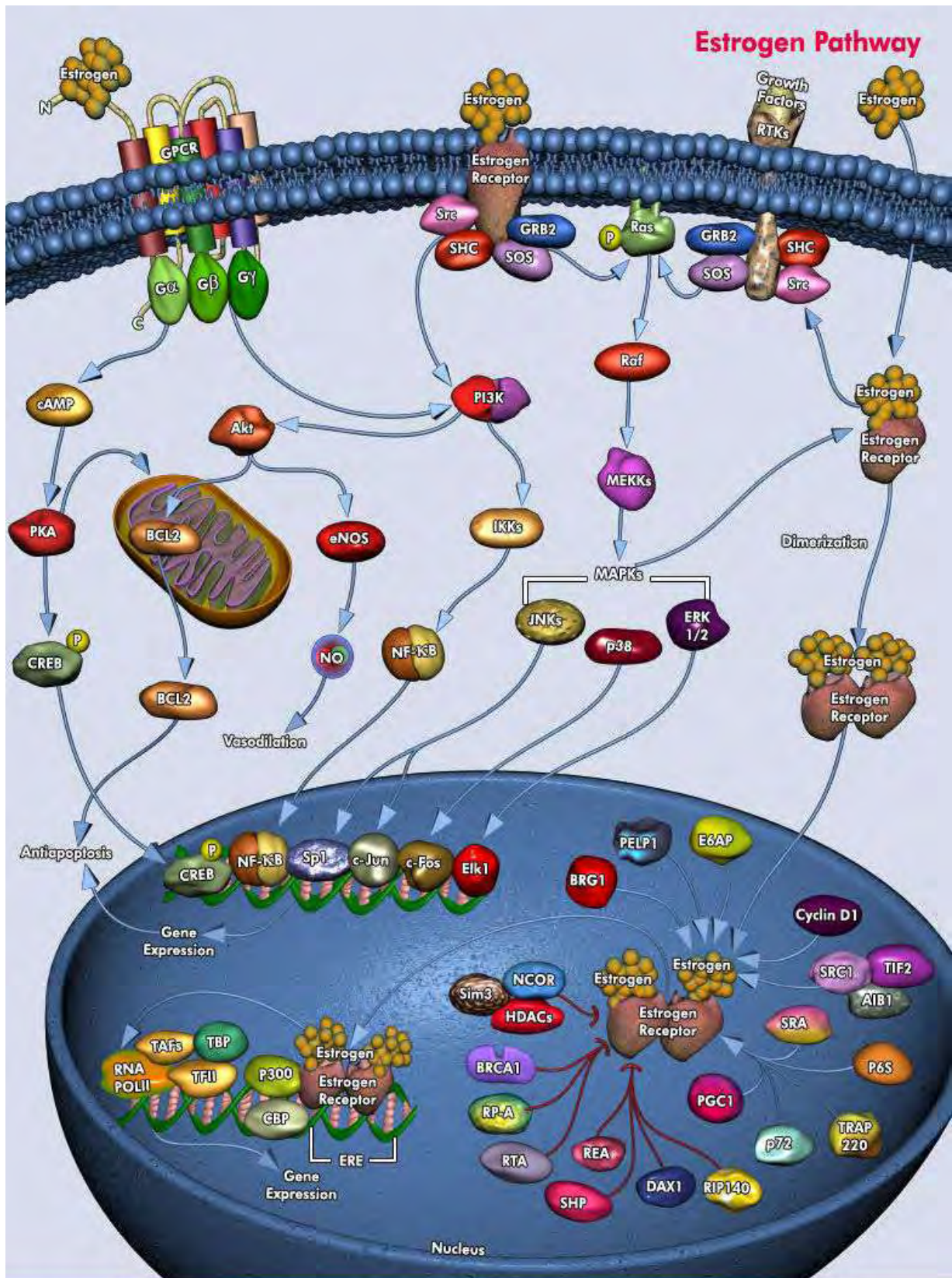
- ▲Μιτοχονδριακής σχάσης και ▼ σύντηξης λόγω ωθηκτομής (Arnold et al., 2012).
- Οιστρογονική ▲ Έκφρασης υπομονάδων των συμπλόκων MRC σε ποικίλους ιστούς και κυτταρικούς τύπους (Arnold et al., 2012).
- Η E2 ρυθμίζει μέσω ERs την έκφραση του NRF-1, ρυθμιστή μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων (Klinge, 2008).
- Αύξηση της μιτοχονδριακής MnSOD και GPx παρουσία E2 (Vina et al., 2005).
- Αρνητική ρύθμιση της μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού μέσω επαγωγής της αντι-αποπτωτικής Bcl-2 (Perillo et al. 2000).
- Σε μοντέλα ERKO, μιτοχόνδρια του μυοκαρδίου, παρουσίασαν ακανόνιστο σχήμα και κατανομή της IMM και της OMM (Arnold et al., 2012).

Δεδομένων των παραπάνω, πέρα από τις χαρακτηρισμένες οδούς στον πυρήνα ή το κυτοσόλιο, είναι πολύ πιθανό η μιτοχονδριακή δραστηριότητα να ρυθμίζεται και μέσω της ενδογενούς δράσης των ERs, καθιστώντας έτσι την οιστρογονική συμμετοχή στο εν λόγω οργανίδιο τόσο άμεση όσο και έμμεση (Arnold et al., 2012) (**Εικ.10**).



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση των πιθανών οδών μέσω των οποίων τα οιστρογόνα θα μπορούσαν να ελέγχουν άμεσα και έμμεσα τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα (Arnold et al., 2012).

Όλα τα παραπάνω, καταδεικνύουν ότι η οιστρογονική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι αναμφιβόλως μια πολύπλοκη, πολυπαραγοντική διαδικασία που περιλαμβάνει τις γενωμικές δράσεις, τις μη γενωμικές αλλά και τη σύγκλιση αυτών σε ορισμένα στοιχεία απόκρισης (Bjornstrom and Sjoberg, 2005). Το δε τελικό αποτέλεσμα κρίνεται συγχρόνως από μεταβλητές όπως είναι ο συνδιασμός των εκάστοτε μεταγραφικών παραγόντων, ο υποκυτταρικός εντόπισμός των ERs, τα επίπεδα συνενεργοποιητών και συγκαταστολέων, και το είδος του εξωκυττάριου ερεθίσματος. Έτσι, η οιστρογονική σηματοδότηση καθίσταται πολυεπίπεδη δεδομένου αφενός, του ότι οι παραπάνω συνιστώσες διαφέρουν στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, και αφετέρου, του ότι τα οιστρογόνα εγείρουν με τη σειρά τους διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια (Bjornstrom and Sjoberg, 2005).



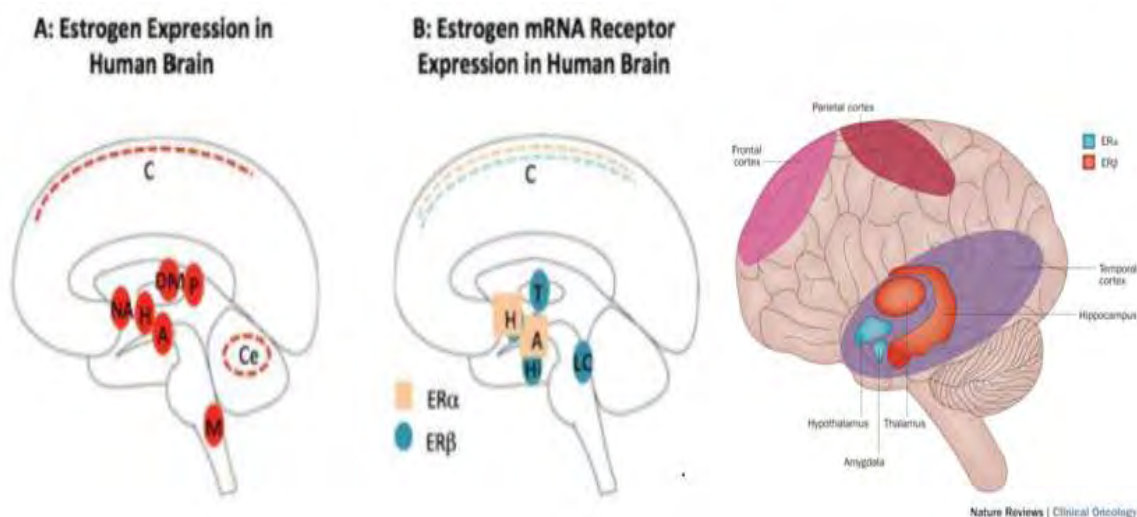
Sample & Assay Technologies

Εικόνα . Οιστρογονική σηματοδότηση. (Εικόνα από την επίσημη ιστοσελίδα της QIAGEN. http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=Estrogen_Pathway).

1.3.3.Οι υποδοχείς Οιστρογόνων στο Νευρικό Σύστημα

Είναι γνωστό ότι μέσω των υποδοχέων τους, οι στεροειδείς ορμόνες, συμπεριλαμβανομένων και των οιστρογόνων, ασκούν επιρροή στην ανάπτυξη και λειτουργία του νευρικού συστήματος, ενώ τόσο ο ERα όσο και ο ERβ, φαίνεται να έχουν νευροπροστατευτική δράση. Η πολύπλοκη φύση της λειτουργίας των ERs, επιβεβαιώνεται και από τη διαφορετική κατανομή τους στον ίδιο τον εγκεφαλικό ιστό.

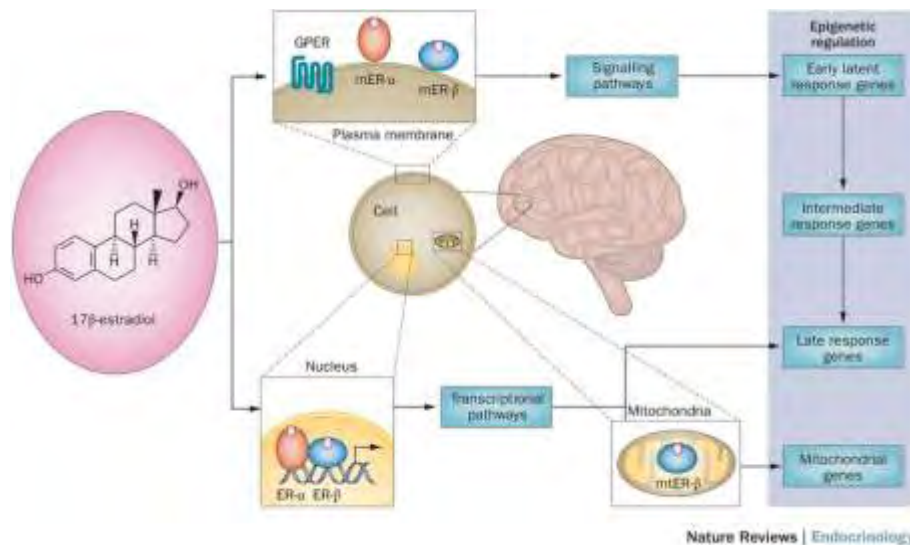
Παρόλο που τα επίπεδα έκφρασης των ERα και ERβ συνήθως αλληλεπικαλύπτονται, ο ERα εμφανίζεται σε περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με την αναπαραγωγική λειτουργία, ο ERβ πρωτοστατεί σε περιοχές που σχετίζονται με τη μνήμη, τη μάθηση, το στρες και την κατάθλιψη (Cu et al., 2012). Έτσι, αντίστοιχα ο ένας υπότυπος παρευρίσκεται κυρίως στον υποθάλαμο και την αμυγδαλή, ενώ ο άλλος στον υπόκαμπο, στον πρόσθιο φλοιό, στη μέλανα και στην παρεγκεφαλίδα (Fiochetti et al., 2012).



Εικόνα 11. Αλληλεπικάλυψη της Έκφρασης Οιστρογονικών Μορίων στις Διάφορες Περιοχές του Εγκεφάλου . A) Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι περιοχές που εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα την αρωματάση (καταλύει τη βιοσύνθεση οιστρογόνων) με in vivo PET imaging χρησιμοποιώντας τη [N-methyl-11C] νοροχολε. **B)** Έκφραση του mRNA των υποδοχέων οιστρογόνων στον ανθρώπινο εγκέφαλο. Μερικές περιοχές εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης για την α ισομορφή (ERα) (Υποθάλαμος, Αμυγδαλή), άλλες για τη β ισομορφή (ERβ) (Θάλαμος, Ιππόκαμπος και Υπομέλανας Τόπος), ενώ περιοχές όπως ο φλοιός εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης και για τους δύο υποτύπους. **C)** Απεικονίζονται τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων, ERα (μπλε χρώμα) and ERβ (κόκκινο), σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου. Επεξηγήσεις: A = Αμυγδαλή (Amygdala), C = Φλοιός (Cortex); Ce = (Cerebellum), H = Υποθάλαμος (Hypothalamus), DM = Ραχιαίος Πυρήνας του Θαλάμου (Dorsomedial Nucleus of the thalamus), NA = Επικληνής Πυρήνας (Nucleus Accumbens), P = (Pulvinar), T = Θάλαμος (Thalamus), Hi = Ιππόκαμπος (Hippocampus), and LC = Υπομέλανας Τόπος (Locus ceruleus (Dorsook et al., 2015) (Swart et al., 2015).

Το δίκτυο οιστρογονικών υποδοχέων λοιπόν, που περιγράφηκε εκτενώς στη προηγούμενη ενότητα, έχει απόκριση και λειτουργίες στον εγκέφαλο. Η πρόσδεση των οιστρογόνων στους μεμβρανικούς υποδοχείς (mER-α, mER-β and GPER), επιφέρει ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία ρυθμίζουν την έκφραση πρωίμων και ενδιάμεσων (αμέσως πρώιμων) γονιδίων στόχων. Αντίθετα, η πρόσδεση οιστρογόνων στους πυρηνικούς ERα και ERβ, ενεργοποιεί μεταγραφικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την έκφραση καθυστερημένων γονιδίων. Η ενεργοποίηση και η μετακίνηση του ERβ στον πυρήνα, φαίνεται να εμπλέκεται με

τη ρύθμιση της έκφρασης των μιτοχονδριακών γονιδίων. Επιπλέον, μέσω επιγενετικής ρύθμισης, τα οιστρογόνα μπορούν να μετριάσουν τη μεταγραφικά μονοπάτια που πυροδοτήθηκαν από γρήγορους μηχανισμούς ή από τον κλασικό μέσω πυρήνα. Αυτό το περίπλοκο δίκτυο, δίνει τη δυνατότητα στους ERs να συγχρονίσουν τα σήματα που δέχονται με τη δαιδαλώδη ενδοκυτταρική σηματοδότηση και να συντονίσουν ένα ευρύ φάσμα παραγόντων με σκοπό την εύρυθμη λειτουργία του νευρικού συστήματος (**Εικ.12**).



Εικόνα12. Σχέση του δικτύου των οιστρογονικών υποδοχέων με το νευρικό σύστημα.

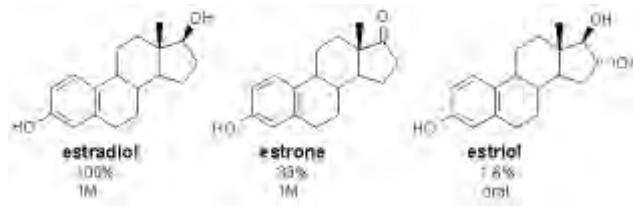
1.4. Οιστρογόνα

Μέσω των υποδοχέων τους που περιγράφηκαν εκτενώς παραπάνω, τα οιστρογόνα (= οἴστρος + γέννημι), που “γεννούν την επιθυμία”, είναι η κύριες ορμόνες του φύλου στις γυναίκες και έχουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διατήρηση, τόσο του αναπαραγωγικού συστήματος όσο και των δευτερογενών φυλετικών χαρακτηριστικών. Ωστόσο όμως, και στα δύο φύλα, ασκούν ισχυρή επιρροή και σε άλλα συστήματα όπως το καρδιαγγειακό, το μυοσκελετικό, το ανοσοποιητικό και το κεντρικό νευρικό. Δεν είναι παράδοξο λοιπόν, που φαίνεται να εμπλέκονται με τη παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένων των ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων (όπως αυτών του μαστού, των ωθηκών, και του ενδομητρίου), της οστεοπόρωσης, ορισμένων καρδιαγγειακών νοσημάτων και νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

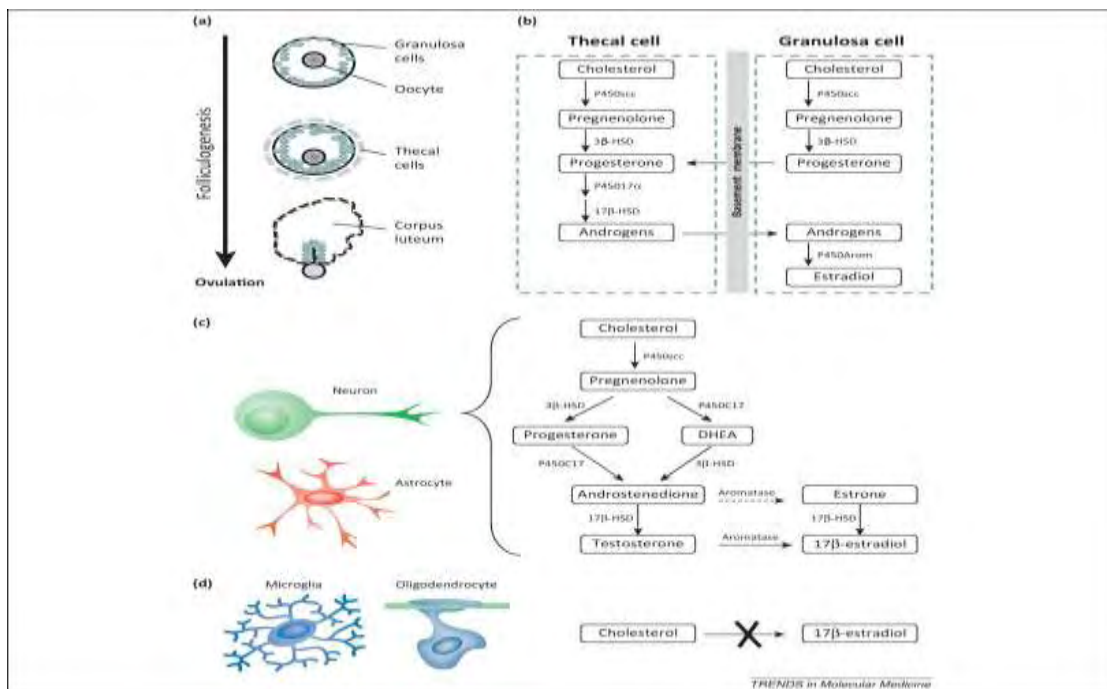
1.4.1. Κύρια Οιστρογόνα

Τα σημαντικότερα φυσικά ενδογενή οιστρογόνα είναι η 17β-εστραδιόλη(E2), η εστριόλη(E3) και η εστριόνη(E1) που παράγονται κυρίως κατά τα αναπαραγωγικά χρόνια, την εγκυμοσύνη και την εμμηνόπαυση, αντίστοιχα. Το κύριο και ισχυρότερο οιστρογόνο που συντίθεται από το σώμα είναι η E2. Τα άλλα δύο στεροειδή, αν και είναι προσδέτες υψηλής συγγένειας, ασκούν ηπιότερη οιστρογονική δράση καθώς είναι πολύ ασθενέστεροι αγωνιστές των ERs. Αν και αρχικά θεωρούνταν

ότι αυτοί οι δύο μεταβολίτες της E2 (δλδ. Η εστριόλη και η εστριόνη) είναι ανενεργοί, τώρα πιστεύεται ότι ίσως έχουν και ιστοειδικούς ρόλους (Heldring et Al., 2007).



Ενδογενώς, τα οιστρογόνα παράγονται κυρίως από τα κύτταρα του κοκκιώδους υμένα του ωοθηλακίου με τη βοήθεια των κυττάρων της εσωτερικής θήκης (**two cell theory of estrogen production**) (Εικ. 13), από το οχρωσωμάτιο, και σε μικρότερο βαθμό από το φλοιό των επινεφριδίων. Παραγωγή οιστρογόνων γίνεται στον πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, στους όρχεις σε ακόμα μικρότερο βαθμό και στο λιπώδη ιστό μετεμμηνοπαυσιακά μέσω αρωματάσεων που καταλύουν τη μετατροπή της τεστοστερόνης (Cui et al., 2013). Το ένζυμο που καταλύει το τελευταίο βήμα της βιοσύνθεσης των οιστρογόνων, είναι η αρωματάση, μέλος του κυτοχρώματος P450 που κωδικοποιείται από το *CYP19*, και η ιστοειδική της έκφραση εξαρτάται από ιστοειδικούς υποκινητές στη 5' ρυθμιστική περιοχή 93kb, του γονιδίου (Cui et al., 2013).



Εικόνα 13: Σύνθεση οιστρογόνων στο ωοκύτταρο και στον εγκέφαλο. α) Ωοθυλακιογένεση β) Η παραγωγή των οιστρογόνων ξεκινά με τη σύνθεση προγενολόνης από το P450_{scc} με πρόδρομο τη χοληστερόλη. Η προγενολόνη μετατρέπεται σε προγεστερόνη από την 3-β-υδροξυ-αφυδρογονάση των στεροειδών (3β-HSD). Η προγεστερόνη από την 17-α-υδροξυλάση και τη 17-β- HSD μετατρέπεται σε ανδρογόνα στα κύτταρα της εσωτερικής θήκης. Το τελευταίο βήμα, η μετατροπή των ανδρογόνων σε E2, καταλύεται στα κοκκιόκύτταρα από την αρωματάση. γ) Οι νευρώνες και τα αστροκύτταρα εκφράζουν όλα τα ένζυμα που χρειάζονται για τη σύνθεση των οιστρογόνων. δ) Μικρογλία και ολιγοδενδροκύτταρα αδυνατούν να παράγουν οιστρογόνα. Η χαμηλή ενεργότητα των ενζύμων παρουσιάζεται με διακεκομμένες γραμμές (Cui et al., 2013).

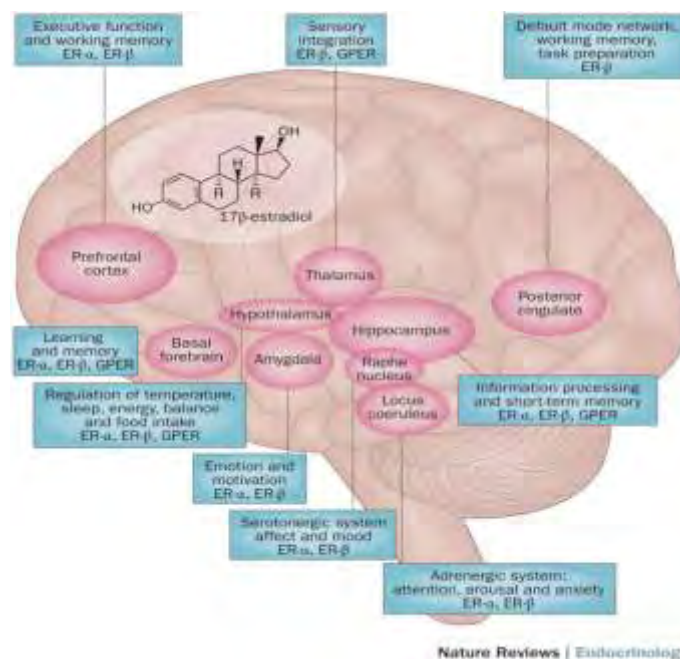
Η μεταφορά των οιστρογόνων μέσω της περιφερικής κυκλοφορίας γίνεται από τη σφαιρίνη δέσμευσης φυλετικών ορμονών (**SHBG**) και με την άφιξη στα κύτταρα-στόχους, καθώς είναι λιπόφιλα, διαπερνούν τη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα μέσω διάχυσης και μεταφέρονται ενδοκυτταρικά (Cui et al.,

2013) όπου λαμβάνει χώρα η πρόσδεση στους ERs. Η E2 συγκεκριμένα, παγιδεύεται σε μία υδρόφοβη περιοχή του ER, όπου τα S1/S2 β-πτυχωτά φύλλα λειτουργούν ως “πάτωμα” και η H12 α-έλικα ως “ταβάνι” (“mouse trap” model of ligand binding to nuclear receptors) (Farooq et al., 2015). Μετά την πρόσδεσή τους στους ERs ασκούν τη δράση τους, μέσω των μηχανισμών που παρουσιάστηκαν λεπτομερώς στην προηγούμενη ενότητα.

Τα οιστρογόνα είναι καλά χαρακτηρισμένα “μορφογόνα” καθώς ο ρόλος τους στη μορφογένεση είναι έκδηλος από τη παθολογική μορφολογία ιστών (όπως το ενδομήτριο, οι ωοθήκες, ο μαστικός αδένας, ο προστάτης, ο πνεύμονας και ο εγκέφαλος), ποντικών αERKO και βERKO. Στους υποκινητές ορισμένων γονιδίων, ιδιαίτερα σε αυτών που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, ο ERα και ο ERβ, έχουν αντίθετες δράσεις, γεγονός που καταδεικνύει ότι η συνολική πολλαπλασιαστική ικανότητα των οιστρογόνων (και ιδιαίτερα της E2), είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ της σηματοδότησης από τον ERα και τον ERβ (Heldring et al., 2007).

1.4.2 17β-Οιστραδιόλη και Νευρικό Σύστημα

Επικουρική στην καλά χαρακτηρισμένη δράση της E2 στους αναπαραγωγικούς ιστούς, είναι και δράση της στο ΝΣ, όπου δρα ως νευροτροφικός αλλά και ως νευροπροστατευτικός παράγοντας, και επηρεάζει τη μνήμη, τη διάθεση, την αίσθηση του πόνου και το συντονισμό της κίνησης. Αυτή η επίδραση ασκείται τόσο κατά την εμβρυική/ νεογνική περίοδο, όπου η E2 έχει οργανωτικό χαρακτήρα, όσο και κατά τα μεταγενέστερα στάδια της ζωής του ενήλικου ατόμου, όπου μέσω ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης, ρυθμίζεται η συναπτική νευροδιαβίβαση, η επιβίωση των νευρώνων και η διαφοροποίηση νευρώνων και γλοίας (Fiochetti et al., 2012). Οι μοριακοί μηχανισμοί, μέσω των οποίων, η E2 ασκεί τη νευροπροστατευτική της δράση, αφορούν στη ρύθμιση της απόπτωσης, του οξειδωτικού στρες, της φλεγμονής, την παρεμπόδιση του σχηματισμού β-αμυλοειδών πλακών και γίνεται λεπτομερής αναφορά σε επόμενη ενότητα.



Εικόνα 14. Νευρολογικές λειτουργίες που επηρεάζονται κατά τη μετάβαση στην εμμηνόπαυση (perimenopausal transition). Κατά τη μεταβατική περίοδο πριν την εμμηνόπαυση, προκύπτει μια σειρά νευρολογικών διαταραχών,

οι οποίες αφορούν διάφορες εγκεφαλικές περιοχές και τη λειτουργία που η κάθε μία εξηπυρετεί, συνθέτοντας ένα μωσαϊκό βλαβών που η φυσιολογική έκκριση οιστρογόνων θα απέτρεπε. Η E2 μέσω πυρηνικών, μεμβρανικών και μιτοχονδριακών υποδοχέων, οι οποίοι βρίσκονται τόσο σε νευρικά όσο και σε γλοιακά κύτταρα, επιδρά στα διάφορα νευρικά κυκλώματα που είναι κατανεμημένοι οι ERs. Δυσλειτουργία της οιστρογονικής σηματοδότησης, είτε λόγω διαφορετικών συγκεντρώσεων E2 είτε λόγω τροποποιήσεων των ERs, επηρεάζει την ενεργοποίηση των κυκλωμάτων αυτών και τη νευρική λειτουργία κατ' επέκταση. Έτσι, η μάθηση, η μνήμη, η ομοίωση της θερμοκρασίας, ο ύπνος και η όρεξη είναι μερικές από τις φυσιολογικές λειτουργίες που επηρεάζονται λόγω μειωμένης έκκριση E2 κατά την εν λόγω περίοδο.

1.4.3 Μόρια με οιστρογονική δράση: Φυτοοιστρογόνα, SERMs, SERDs

Κατανοώντας τη πολυπλοκότητα της οιστρογονικής σηματοδότησης και τη συμμετοχή των ERs στην παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών, αναγνωρίζεται η ανάγκη ανάπτυξης ουσιών με δυνατότητα επιλεκτικής ρύθμισης της δράσης τους. Έτσι, έχουν στραφεί τα “βλέματα” προς τους επιλεκτικούς ρυθμιστές των υποδοχέων οιστρογόνων (Selective Estrogen Receptor Modulators: SERMs) που δρουν είτε αγωνιστικά είτε ανταγωνιστικά στους ERs, ανάλογα με τον ιστό-στόχο (Farooq, 2015). Άξιος εκπρόσωπος της κατηγορίας είναι η ταμοξιφένη, με ρόλο ανταγωνιστή στο μαστό και αγωνιστή στη μήτρα.

Η διττή λειτουργία των SERMs, αποδίδεται στη δυναμική ισορροπία ανάμεσα στις δύο διαμορφώσεις που μπορεί να λάβει η H12 στη θέση δέσμευσης του προσδέτη (LBD). Απουσία συνεργοποιητών, η H12 καταλαμβάνει τη θέση LXXLL (ανταγωνιστική δράση στον ER). Καθώς τα επίπεδα των συνεργοποιητών αυξάνονται, η έλικα H12 εκτοπίζεται και καταλαμβάνει τη θέση που επιτρέπει στον “ επιλεκτικό ρυθμιστή” (SERM) να δρα αγωνιστικά (Farooq, 2015). Έτσι, το αποτέλεσμα εντέλει κρίνεται από τα επίπεδα συνεργοποιητών και συγκαταστολέων στον εκάστοτε ιστό.

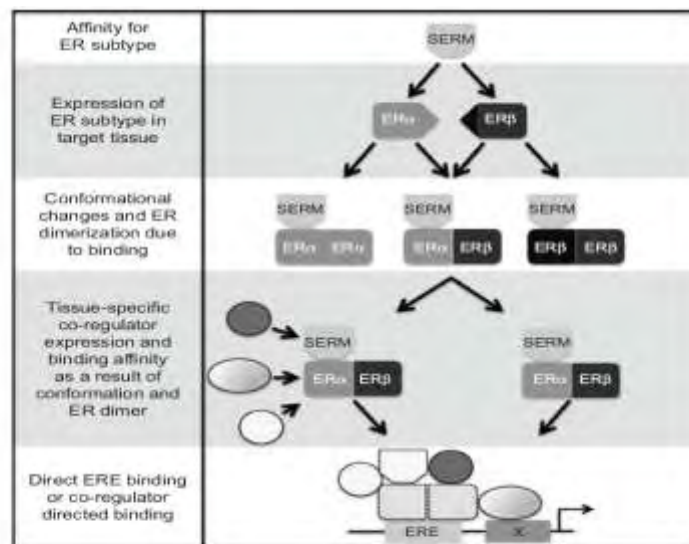


Figure 1 Model for SERM tissue specificity.

Notes: SERM tissue specificity depends on numerous factors: 1) SERMs have differential and specific affinity for ER subtypes; 2) ER subtypes are differentially expressed in target tissues and can be heterogeneously expressed in a particular tissue; 3) SERM binding induces specific conformational changes in ER that influence dimerization and binding to various co-factors that can determine resultant target gene (X) activation or repression; 4) Co-factors (i.e. activators and repressors) are differentially expressed in target tissues; and 5) ER-SERM complexes can bind directly to an ERE or be directed to bind other transcriptional motifs as a result of binding to various co-factors.

Abbreviations: ER, estrogen receptor; ERE, estrogen response element; SERM, selective estrogen receptor modulators.

Στο ίδιο μοτίβο, κινούνται και τα φυτοοιστρογόνα που είναι πολυφαινολικές, μη-στεροειδείς φυτικές ενώσεις, όμοιες δομικά με τη 17-β-οιστραδιόλη, και διακρίνονται σε α) λιγνίνες β) στυλβένια και γ) φλαβονοειδή. Μπορούν να προσαρμόζουν κι αυτά τη δράση τους, λειτουργώντας ως αγωνιστές ή ως

ανταγωνιστές των ERs, ανάλογα με το αν τα ενδογενή επίπεδα οιστρογόνων είναι χαμηλά ή υψηλά, αντίστοιχα (Czuczwar et al., 2017). Το φάσμα των υπό εξέταση μορίων, συμπληρώνουν και οι αρνητικοί ρυθμιστές των ERs (Selective Estrogen Receptor Downregulators : SERDs), που καταστέλλουν τη δράση των υποδοχέων κυρίως μέσω επαγωγής της πρωτεοσωμικής αποικοδόμησής τους (McDonnell et al.,2015).

1.5 Ξενοοιστρογόνα

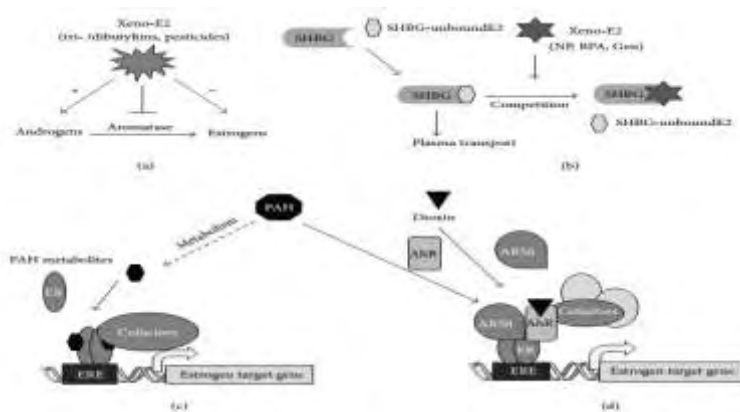
“Πώς μπορεί να σχετίζεται η διαιθυλστυλβεστρόλη (DES), ένα φάρμακο που συνταγογραφούνταν στη Γαλλία του '70 κατά των αποβολών, με το θέμα μας?”

Εκτός από τα ενδογενή οιστρογόνα, στο περιβάλλον συναντάμε και ενώσεις που μοιάζουν δομικά με αυτά (Albini et al., 2014) και έχουν την τάση είτε να μιμούνται μερικώς τις δράσεις τους είτε να δρουν παρεμβατικά στην οιστρογονική σηματοδότηση (Kerdivel et al.,2013). Ο λόγος γίνεται για τα ξενοοιστρογόνα τα οποία επηρεάζουν το ενδοκρινικό σύστημα ποικιλοτρόπως ανάλογα με την ικανότητά τους να ανταγωνίζονται τα ενδογενή, για θέσεις πρόσδεσης στους υποδοχείς (Albini et al., 2014). Η έκθεση της μήτρας στη “ θαυματουργή” DES που χορηγούνταν τότε στις γυναίκες, αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα ξενοοιστρογόνου, αφού αποδείχθηκε υπεύθυνη για τις σοβαρές δυσμορφίες και διαταραχές του αναπαραγωγικού συστήματος των παιδιών τους.

Τα περισσότερα ξενοοιστρογόνα ακόμα και σήμερα είναι προϊόντα ασύδοτης ανθρώπινης δραστηριότητας και προέρχονται από το νερό, φαρμακευτικά σκευάσματα, βιομηχανικά απόβλητα , εντομοκτόνα, πρόσθετα τροφίμων, καλλυντικά και προϊόντα περιποίησης. Η έκθεση σε ξενοοιστρογόνα κατά τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια έχει επιπτώσεις στα συστήματα που υπόκεινται σε οιστρογονική ρύθμιση (όπως το νευρικό και το αναπαραγωγικό) (Kerdivel et al. 2013) ενοχοποιώντας τα έτσι για την παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών. Τα ξενοοιστρογόνα μπορούν να επιδράσουν στο ενδοκρινικό σύστημα σε πολλά επίπεδα:

Αρχικά, μπορεί να στοχεύσουν ένζυμα του μεταβολισμού των οιστρογόνων όπως είναι η αρωματάση που καταλύει τη βιοσύνθεσή τους και η διαταραχή της από ορισμένα εντομοκτόνα επέφερε ανισορροπία στα επίπεδα οιστρογόνων/ανδρογόνων. Συνήθως , η επιρροή των ξενοοιστρογόνων στα ένζυμα είναι ανασταλτική, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την αναστολή τη σουλφοτρανσφεράσης από μεταβολίτες του PCB. Στο ίδιο επίπεδο, επηρεάζεται και η μεταφορά της ορμόνης μέσω ανταγωνισμού των ξενοοιστρογόνων για τις θέσεις πρόσδεσης της SHBG (sex hormone binding globulin) (Kerdivel et al., 2013).

Ο συνηθέστερος μηχανισμός δράσης των ξενοοιστρογόνων αφορά την ικανότητα δέσμευσης και επαγωγής των ER. Δεδομένης όμως, της διαφορετικής κατανομής των ERs στους ιστούς αλλά και της ανταγωνιστικής δράσης που έχουν οι ίδιοι μεταξύ τους, δεν αποσαφηνίζεται αν τα ξενοοιστρογόνα λειτουργούν αγωνιστικά ή ανταγωνιστικά. Ωστόσο, μπορούν να προκαλέσουν μεταβολές στη τριτοταγή δομή των υποδοχέων, επιδρώντας στη στρατολόγηση μεταγραφικών συμπαράγοντων. Τέλος, τα ξενοοιστρογόνα μπορούν να λειτουργήσουν παρεμβαίνοντας στη “γρήγορη”οιστρογονική σηματοδότηση (Kerdivel et al., 2013)(**Εικ16**).



Εικόνα 16. Παραδείγματα Αλληλεπίδρασης Ξενοοιστρογόνων και Οιστρογονικής Σηματοδότησης. α) Αναστολή της αρωματάσης που καταλύει το μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα **β)** Ανταγωνισμός για τις θέσεις πρόσδεσης της SHBG επηρεάζοντας τη μεταφορά των ορμονών στο πλάσμα **γ)** Μη φυσιολογική επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων λόγω ενεργοποίησης του ER και του aryl hydrocarbon receptor (AhR) αντίστοιχα **(Kerdivel et al. 2013)**.

1.5.1 Μεταλλοοιστρογόνα

Η ικανότητα ορισμένων μετάλλων να δεσμεύονται στους ERs και να προσομοιάζουν το σήμα των οιστρογόνων *in vivo* και *in vitro*, συνέβαλε στη συνειδητοποίηση ότι τα περιβαλλοντικά οιστρογόνα μπορούν να είναι επίσης, ανόργανης φύσης. Τέτοιου είδους ξενοοιστρογόνα, χαρακτηρίζονται μεταλλοοιστρογόνα και περιλαμβάνουν μέταλλα όπως είναι το αλουμίνιο, το αντιμόνιο, το αρσενικό, το βάριο, το κάδμιο, το δισθενές χρώμιο (Cr (II)), το κοβάλτιο, τον χαλκό, το μόλυβδο, τον υδράργυρο, το νικέλιο, το σελήνιο, τον κασσίτερο και το βανάδιο (Darbre 2006). Διακρίνονται στα μεταλλικά ανιόντα και στα δισθενή κατιονικά μέταλλα (Byrne et al. 2013).

Estrogenic class	Representative metals [65]		Potential metals
Metalloestrogens	<u>Aluminum</u>	Copper	<u>Silver</u>
	Antimony	Lead	<u>Zinc</u>
	Arsenite	Mercury	<u>Titanium</u>
	Barium	Nickel	(some evidence—needs more study)
	<u>Cadmium</u>	Selenite	
	Chromium (II)	Tin	
	Cobalt	Vanadate	

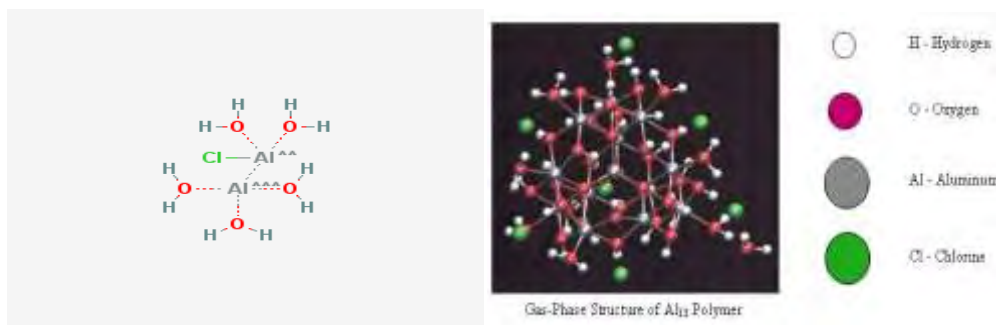
Πίνακας 1. Παραδείγματα μετάλλων με γνωστή ή πιθανή οιστρογονική δράση.

Όπως προαναφέρθηκε, ο ER είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, η δράση του οποίου στηρίζεται στη σχέση πρωτεΐνης-μετάλλου αφού η πρόσδεση στο DNA επιτυγχάνεται μέσω των δομών δακτύλου ψευδαργύρου (Zinc finger). Τα διάφορα μέταλλα που έχουν δράση μεταλλοοιστρογόνων έχουν την ικανότητα να παρεμβαίνουν στη δράση των ERs ποικιλοτρόπως. Ορισμένα μπορεί να πάρουν τη θέση του ψευδαργύρου, μεταβάλλοντας την ικανότητα του DBD να προσδέεται στα EREs, ενώ άλλα προσδέονται στο LBD αποτρέποντας την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με την 17β-οιστραδιόλη. (Darbre, 2006).

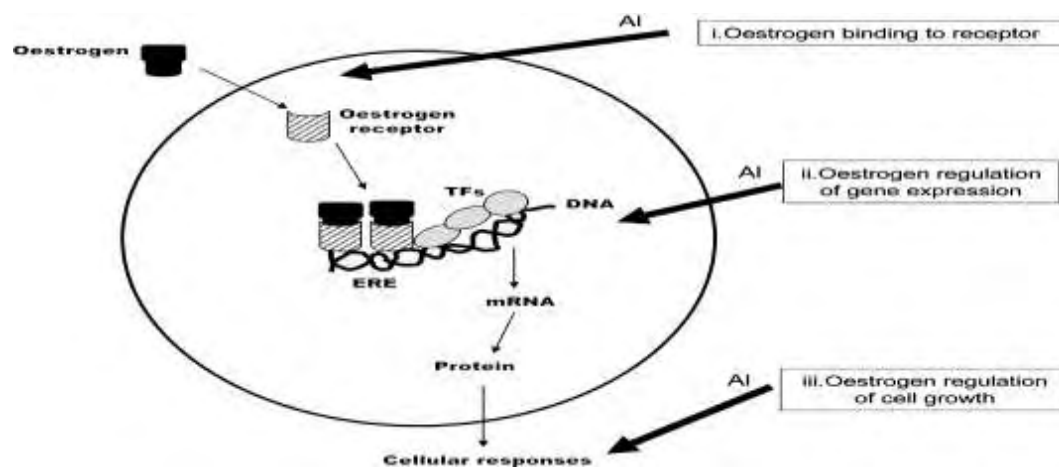
1.6 Aluminum Chlorohydrate (ACH)

Στην υποκατηγορία των μεταλλοιστρογόνων ανήκει και το υδρόξυ-χλωριούχο αργίλιο, η ιστρογονική δράση του οποίου, εξετάζεται στη παρούσα εργασία.

Ως ACH, περιγράφεται μια ομάδα αλάτων του αλουμινίου, με γενικό χημικό τύπο $Al_nCl_{(3n-m)}(OH)_m$. Παράγεται βιομηχανικά από την αντίδραση του αλουμινίου με το υδροχλωρικό οξύ, η χρήση του είναι ευρεία και έτσι, ο ανθρώπινος πληθυσμός μπορεί να εκτίθεται στις εν λόγω ενώσεις από τη διατροφή, φαρμακευτικά σκευάσματα, προϊόντα περιποίησης αλλά και το νερό.



Το ACH, είναι το κυριότερο ενεργό συστατικό των αποσμητικών (με συγκεντρώσεις από 10-25% w/v), και αναστέλλει την εφίδρωση. Η διαστολή λόγω όσμωσης που υφίστανται τα κύτταρα της επιδερμίδας από την έκθεση στα ιόντα αλουμινίου, έχει σαν αποτέλεσμα την απόφραξη των πόρων των ιδροτοπιών αδένων των κάτω από αυτή. Δεδομένης της συνήθειας των δυτικών κοινωνιών να εφαρμόζεται αποσμητικό μετά την αποτρίχωση, ο κίνδυνος απορρόφησης του άλατος αυξάνεται, λόγω μικροτραυματισμών ή αφαίρεσης της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας αμέσως μετά το ξύρισμα, καθιστώντας τη dermίδα εντελώς εκτεθειμένη στο ACH (Darbre, 2006). Το άλας απορροφάται από τη dermίδα και κατόπιν δίσταται στους παρακείμενους ιστούς καθώς και στο αίμα μέσω του οποίου μεταφέρεται στα διάφορα όργανα (Darbre et al., 2006).



Εικόνα18. Πιθανά σημεία εμπλοκής του Al στις μοριακές δράσεις των ERs. Το Al θα μπορούσε να επηρεάζει i) τη δέσμευση του ER με τους φυσικούς προσδέτες του, ii) την πρόσδεση του συμπλόκου ER- E2 στα EREs και iii) το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζονται από ERs για τον έλεγχο της κυτταρικής άυξηςης (Darbre et al., 2006).

Έτσι στο Al, με τη γνωστή γενετοξική του δράση, που προκαλεί αλλαγές στο γονιδίωμα και επιγενετικές τροποποιήσεις, αποδίδεται άμεση συμμετοχή στην παθοφυσιολογία του καρκίνου του μαστού (Darbre et al., 2006). Τα πειραματικά αποτελέσματα των παραπάνω στην κυτταρική σειρά MCF-7, προτείνουν εμπλοκή του ACH τόσο στο στάδιο της δέσμευσης του ER με τον προσδέτη του όσο και στη μετέπειτα ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Ωστόσο, παρόλο που για άλλα μέταλλα όπως το κάδμιο, το κοβάλτιο και το νικέλιο, οιστρογονική δράση έχει αναγνωριστεί, η μοριακή βάση της πιθανής οιστρογονικής δράσης του Al, προσεγγίζεται μόνο υποθετικά (Darbre et al., 2006) **(Εικ. 18).**

1.6.1 ACH και Νευρικό Σύστημα

Το ACH, λόγω του τρόπου και του ιστού που εφαρμόζεται αρχικά έχει κατηγορηθεί για την πρόκληση καρκινογένεσεων και ειδικότερα για τη συμμετοχή του στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Φαινόμενα γενετοξικότητας όμως, έχουν εμφανιστεί και σε άλλα συστήματα, εκ των οποίων και το νευρικό. Έτσι σήμερα, το Al θεωρείται μια καλά χαρακτηρισμένη νευροτοξίνη υπαίτια για την παθοφυσιολογία γνωστών νευροεκφυλιστικών ασθενειών (όπως η νόσος του Alzheimer και του Parkinson), με το σαφή μηχανισμό νευροτοξικότητας ωστόσο να παραμένει αινιγματικός.

Στο αίμα, το Al συνδέεται ως επί τω πλείω με την τρανσφερίνη και καθίσταται έτσι ικανό να διαπερνά το BBB μέσω ενδοκύττωσης με τη μεσολάβηση ενός υποδοχέα τρανσφερίνης (Bondy et al., 2013). Το παραπάνω γεγονός, σηματοδοτεί την έναρξη της τοξικής δράσης του Al στο ΚΝΣ, και μαζί με τη μετέπειτα συσσώρευσή του σε ευαίσθητες περιοχές όπως ο ιππόκαμπος και ο πρόσθιος φλοιός, θεωρείται η απαρχή της παθογένεσης νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Προκειμένου να ξεκαθαρίσει το θολό τοπίο γύρω από τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο το Al προκαλεί νευροτοξικότητα, παρατίθενται πολλαπλά σημεία συμμετοχής του Al σε βιοχημικές οδούς, για να καταλήξουμε στο ότι η δράση του υπό εξέταση στοιχείου είναι πολυεπίπεδη:

a) Al και επαγωγή Οξειδωτικού Στρες

- Το Al επιταχύνει την υπεροξείδωση των λιπιδίων που διαμεσολαβείται από Fe³⁺, επιφέρει αύξηση των οξυradicals, απώλεια της κυτταρικής ομοιόστασης και οξειδωτικό στρες. Τα παραπάνω παρατηρούνται σε γλιακά, αστροκύτταρα και μικρογλιακά κύτταρα.
- Το Al αναστέλλει την αντιοξειδωτική ενζυμική μηχανή άμυνας του κυττάρου (βλ. 1.7.2).
- Το Al τέλος, δεσμεύεται στα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια του εγκεφάλου που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και καθίστανται έτσι ευπρόσβλητα από ROS (Maya et al. 2016) (Εικ. 19)



Εικόνα 19. Διαγραμματική απεικόνιση της σχέσης Al, ROS, αντιοξειδωτικών ενζύμων, και υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Το Al, σε μια αντίδραση Fenton επάγει υπεροξειδωση των λιπιδίων ,με επακόλουθη παραγωγή ROS και σχηματισμό Fe³⁺. Το φορτίο του υπεροξειδίου εξουδετερώνεται από το Al³⁺ σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο Al-O₂ που αυξάνει την οξειδωτική ικανότητα του O₂ (Maya et al., 2016).

b) Al ως χολινοτοξικός παράγοντας

Παρουσία Al παρατηρείται αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) μετά από ισχυρή πρόσδεση στην ανιονική θέση του ενζύμου, διαταράσσοντας τη χολινεργική αλλά και την αδρενεργική νευροδιαβίβαση (Pohanka, 2014).

c) Al και φωσφορικές ομάδες

Καθώς το Al ενυπάρχει μόνο σε μία οξειδωτική κατάσταση, ως Al³⁺, παρουσιάζει μεγάλη αγχιστεία προς οργανικά και ανόργανα φωσφορικά, καρβοξύλια και αποπροτονισμένες ομάδες. Έτσι, το Al³⁺ πιθανόν να συνδέεται με τις φωσφορικές ομάδες των νουκλεοτιδίων και των τρι- ή δι-νουκλεοσιδίων, επεμβαίνοντας στην τοπολογία του DNA, τη γονιδιακή έκφραση και το μεταβολισμό αντίστοιχα (Maya et al., 2016).

d) Al και αμινοξέα

Το Al³⁺, σε σχέση με το Ca²⁺, το Zn²⁺ ή το Na⁺, έχει ισχυρό θετικό φορτίο και έτσι προσδένεται ισχυρά σε μεταλλοδεσμευτικά α.α (π.χ His, Tyr, Arg) ή φωσφορυλιωμένα α.α.

e) Al και γονιδιακή έκφραση

Το Al, πιθανότατα μετά την πρόσδεσή του σε μεταγραφικούς παράγοντες επεμβαίνει στη γονιδιακή έκφραση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, η πρόσδεση του Al στις περιοχές δακτύλων Zn του μεταγραφικού παράγοντα IIIA, εμποδίζοντας την πρόσδεσή του στον υποκινητή (Hanas 1996). Παράλληλα, χαμηλά επίπεδα των εν λόγω ιοντικών μετάλλων, “ ξεδιπλώνουν” ανεπανόρθωτα ετεροχρωματινικές περιοχές, ενώ σε υψηλότερα, μειώνεται ο ρυθμός της αντιγραφής (Maya et al 2016). Το Al όχι μόνο προκαλεί δίκλωνες ρήξεις στο DNA αλλά έχει και επιπτώσεις στα συστήματα επιδιόρθωσης του DNA, συμμετέχοντας έτσι στην ογκογένεση (Farasani et al. 2015)

f) Al και ομοιοσταση Ca²⁺

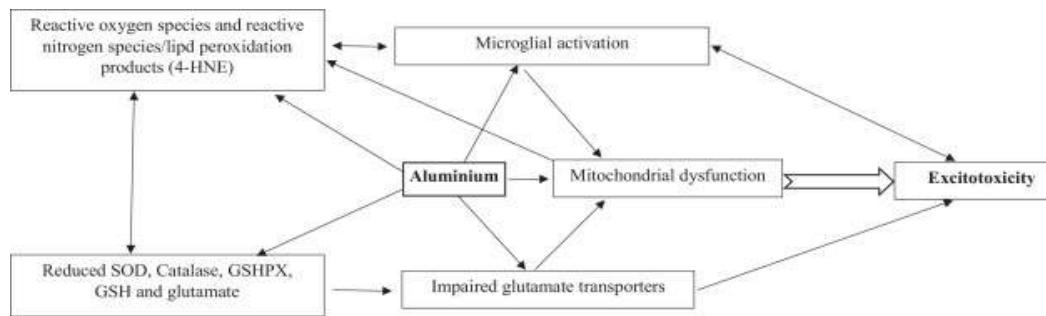
Το Al καθυστερεί το κλείσιμο των τασεο-εξαρτώμενων καναλιών Ca²⁺, μπλοκάρει την CaM-εξαρτώμενη ATPάση Ca²⁺/Mg²⁺ με αποτέλεσμα την απορύθμιση της σηματοδότησης PI-PLC ,το σχηματισμό λιγότερης IP3 και PKC, βραδύτερο ρυθμό απομάκρυνσης του Ca²⁺ από το κυτταρόπλασμα και διατάραξη της ζωτικής για την νευρωνική υγεία, ομοιοστάσης Ca²⁺. (Maya et al. 2016).

g) Al και απόπτωση

Η εμπλοκή του Al στα αποπτωτικά μονοπάτια φαίνεται να είναι ο κύριος κυτταροτοξικός του μηχανισμός. Παρουσία του, επάγεται απελευθέρωση του CytC από τα μιτοχόνδρια, ενδοκυτταρική μείωση της αντι-αποπτωτικής Bcl-2, μιτοχονδριακή μετατόπιση της Bax, ενεργοποίηση της Cas3, γεγονότα που σηματοδοτούν την απαρχή της απόπτωσης (Maya et al. 2016).

h) Al και φλεγμονώδεις αντιδράσεις

Πιθανόν μέσω της ενεργοποίησης του NFκ-B, το Al αυξάνει τα επίπεδα προφλεγμονοδών κυτοκινών όπως ο TNF-α και η IL-1α.



Εικόνα 20. Διαγραμματική αναπαράσταση των πιθανών μηχανισμών νευροτοξικότητας του Al (Maya et al 2016).

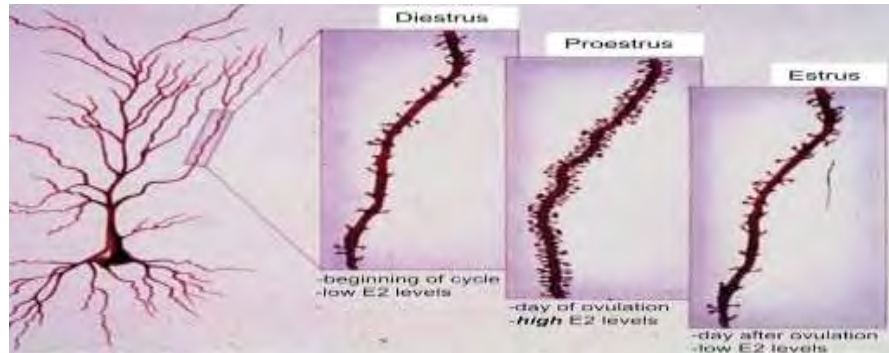
1.7 Οιστρογονική Συμμετοχή στο Νευρικό Σύστημα: Ανάπτυξη και Προστασία

Οι στεροειδείς ορμόνες, που συντίθενται και εκκρίνονται από τους περιφερικούς ενδοκρινείς αδένες, διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και ασκούν τη δράση τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Επιπλέον, ο εγκέφαλος εκτελεί εγγενώς *de novo* σύνθεση νευροενεργών στεροειδών, ανεξάρτητα από τους ενδοκρινείς αδένες της περιφέρειας (νευροστεροειδή). Αρκετές έρευνες έχουν καταδείξει τις νευροτροφικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες πολλών στεροειδών ορμονών όπως η πρεγνολόνη, η προγεστερόνη, η τεστοστερόνη και η 17-β εστραδιόλη. Οι στεροειδείς ορμόνες και τα νευροστεροειδή ασκούν τις βιολογικές δράσεις τους είτε μέσω της προαναφερθείσας κλασσικής γενωμικής οδού είτε μέσω αλλοστερικής ρύθμισης μεμβρανικών υποδοχέων όπως είναι οι NMDA υποδοχείς, οι υποδοχείς σεροτονίνης, οι υποδοχείς γλυκίνης, οι μουςκαρινικοί και οι νικοτινικοί υποδοχείς. Τα νευροστεροειδή επίσης, μπορούν να ενεργοποιήσουν άμεσα GPCRs ή να ρυθμίσουν έμμεσα τη πρόσδεση νευτοπεπτιδίων στους υποδοχείς τους.

1.7.1 Οιστρογόνα ως Τροφικοί Παράγοντες των Νευρώνων

Σε μία προσπάθεια διατήρησης ομαλής της νευροδιαβίβασης, προ- αλλά και μετα- συναπτικές περιοχές υφίστανται μια συντηρημένη διαδικασία ανακατασκευής. Η ανακατασκευή των συνάψεων δε συμβαίνει μόνο σε περιπτώσεις αξονικής βλάβης αλλά είναι μία συνεχής διαδικασία συγχρονισμένη μάλιστα με τα ορμονικά επίπεδα του έμμηνου κύκλου (Heldring et al., 2007).

Μεταφερόμενοι στο χρόνο κατά 40 χρόνια πίσω, συμπαρατηρούμε με τον Dominique Torran ότι η αύξηση και η ανάπτυξη των υποθαλαμικών νευρώνων ενισχύεται από τα οιστρογονικά επίπεδα. Πράγματι σήμερα γνωρίζουμε πως οιστρογονικά επάγεται αύξηση σε περιοχές όπως ο φλοιός, ο ιππόκαμπος, ο νωτιαίος μυελός και η υπόφυση (Heldring et al., 2007). Οι δράσεις αυτές των οιστρογόνων επιτυγχάνονται μέσω ρύθμισης ενδογενών νευροτροφικών ουσιών όπως i) ο αυξητικός παράγοντας των νεύρων (NGF) και οι υποδοχείς του σε χολινεργικούς νευρώνες, ii) ο TGF-β στον υποθάλαμο, iii) ο brain derived neurotrophic factor (BDNF) στο φλοιό, iv) οι υποδοχείς του NGF σε αισθητήριους νευρώνες, v) ο IGF και οι υποδοχείς του στον υποθάλαμο και vi) τα κυτταροσκελετικά γονίδια που απαιτούνται για την νευρωνική αύξηση. (Heldring et al., 2007)



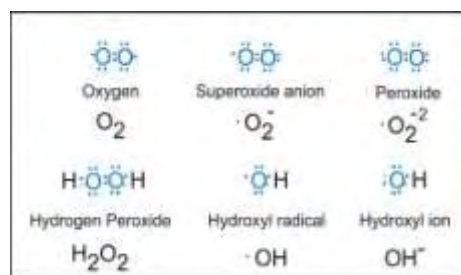
Εικόνα 21. Οιστρογονική ρύθμιση της πυκνότητας spine synapses σε πυραμιδικούς νευρώνες του υποκάμπτου. Στην αρχή του έμμηνου κύκλου (diestrus), όπου τα επίπεδα της E2 είναι χαμηλά, η πυκνότητα των ακάνθων είναι επίσης μειωμένη. Κατά την ωορηξία (proestrus), με την αύξηση των επιπέδων των οιστρογόνων, αυξάνονται κατ'ακολουθία και οι spine densities, ενώ την επομένη μέρα ο νευρώνας (estrous) επανέρχεται στο φυσιολογικό, έτοιμος για έναν νέο κύκλο (Hara et al., 2015).

1.7.2 Οιστρογονική Συμμετοχή σε Νευροπροστατευτικούς Μηχανισμούς

Η νευροπροστατευτική δράση των οιστρογόνων φαίνεται να καθορίζεται από την άμεση συμμετοχή τους στο τρίπτυχο φλεγμονή- απόπτωση-οξειδωτικό στρες και προκειμένου να κατανοηθεί, θα αναλύσουμε την οιστρογονική συμμετοχή σε καθεμία από αυτές τις διεργασίες ξεχωριστά.

A. Ρύθμιση του Οξειδωτικού Στρες

Ως δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS) ορίζονται οι ελεύθερες ρίζες και τα μόρια, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, με τάση να παράγουν ελεύθερες ρίζες κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Οι ελεύθερες ρίζες έχοντας μη δεσμικά ζεύγη ηλεκτρονίων, δεσμεύουν ηλεκτρόνια ή άτομα υδρογόνου και στην προσπάθειά τους να μεταβούν σε σταθερότερη ενεργειακή κατάσταση, επάγουν μια αλυσίδα τέτοιων αντιδράσεων (Tatrai et al., 2008).



Οι ROS παρότι προέρχονται από τις φυσιολογικές αερόβιες ενδοκυτταρικές διεργασίες, ιδιαίτερα στα μιτοχόνδρια, είναι ικανές να βλάψουν ζωτικά μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA. Έτσι, το κύτταρο διαθέτει αμυντικούς μηχανισμούς (ενζυμικούς και μη) προκειμένου να ανταπεξέλθει στις καθημερινά παραγόμενες ROS. Ένζυμα που συμμετέχουν στους εν λόγω μηχανισμούς είναι οι υπεροξειδικές δισμουτάσες (SODs), η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η περοξειρεδοξίνη και μόρια με αντιοξειδωτική δράση είναι η α-τοκοφερόλη και το ασκορβικό οξύ (Ishihara et al., 2015).

Αν οι παραπάνω μηχανισμοί δεν εξισορροπήσουν τα επίπεδα των φυσιολογικά παραγόμενων ROS τότε επέρχεται μία κατάσταση γνωστή σαν οξειδωτικό στρες με επακόλουθο κυτταρικό θάνατο (Ishihara et al., 2015).. Η οξειδωτική καταστροφή σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου θεωρείται ένας από τους αιτιολογικούς παράγοντες της γήρανσης αυτού καθώς και νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως του Parkinson και του Alzheimer (Tatrai et al, 2015).

Η συμμετοχή των νευροστεροειδών σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σχετίζεται άμεσα με τη νευροπροστατευτική τους δράση, και η 17-β οιστραδιόλη με τη σειρά της, φαίνεται να προστατεύει το Κ.Ν.Σ από οξειδωτική βλάβη. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων, ασκεί αυτού του είδους την αντιοξειδωτική της δράση αναλύονται παρακάτω:

- **Γενωμική Οδός**

- i. **Up-Regulation Αντιοξειδωτικών Ενζύμων:** Η αυξημένη έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι ο απλούστερος τρόπος με τον οποίο η E2 ασκεί αντιοξειδωτική δράση. Πιο συγκεκριμένα, κύριος στόχος, για να αποτραπεί οξειδωτική βλάβη των νευρώνων, είναι η SOD1 και η SOD2. Συν τοις άλλοις, επαγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων της Φάσης II (όπως είναι glutathione S-transferase (GST) and NADPH:quinone oxidoreductase) σε εγκεφάλους αρουραίων, λόγω της χρόνιας έκθεσης σε 17-β οιστραδιόλη, υποδεικνύει ότι πέρα από τη SOD κι άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα θα μπορούσαν να είναι στόχοι της E2.
- ii. **Μειωμένη Έκφραση της Συνθάσης του NO:** Κύτταρα της σειράς SK-N-MC με υπερέκφραση του ERα παρουσίασαν μειωμένα επίπεδα της NOS και κατ' επέκταση των τοξικών δραστικών ριζών υπεροξειδίου του νατρίου (ONOO-) που θα συσσωρεύονταν από τη μη ενζυμική μετατροπή του NO (Ishihara et al., 2015).

- **Μη Γενωμική Οδός**

- i. **Φωσφορυλίωση της ERK από E2:** Σε νευρικά κύτταρα της σειράς HT22 που υπερέκφραζαν ERα και ERβ και σε συνθήκες τοξικότητας λόγω β-αμυλοειδούς, παρουσιάστηκε μείωση της προστατευτικής δράσης της E2 όταν χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της MEK (PD98059). Φανερώνεται έτσι, ότι η ενεργοποίηση της ERK μέσω E2, συμμετέχει στη νευροπροστασία από οξειδωτική βλάβη.
- ii. **Φωσφορυλίωση της Akt από E2:** Λόγω φωσφορυλίωσης της Akt μέσω ERα, φωσφορυλιώνεται και απενεργοποιείται ο παράγοντας ενεργοποίησης της NOX2 NADPH oxidase, Rac1. Έτσι, μειώνονται τα επίπεδα υπεροξειδίων από τη NOX2 και η επακόλουθη νευρωνική βλάβη σε περιοχές του ιπποκάμπου.
- iii. **Ρύθμιση της Wnt σηματοδότησης:** Ο σχηματισμός του συμπλόκου ERα/GSK-3β/β-κατενίνη φαίνεται να ασκεί νευροπροστατευτική δράση ενάντια στην τοξικότητα που προκαλείται από το β-αμυλοειδές (Ishihara et al., 2015).

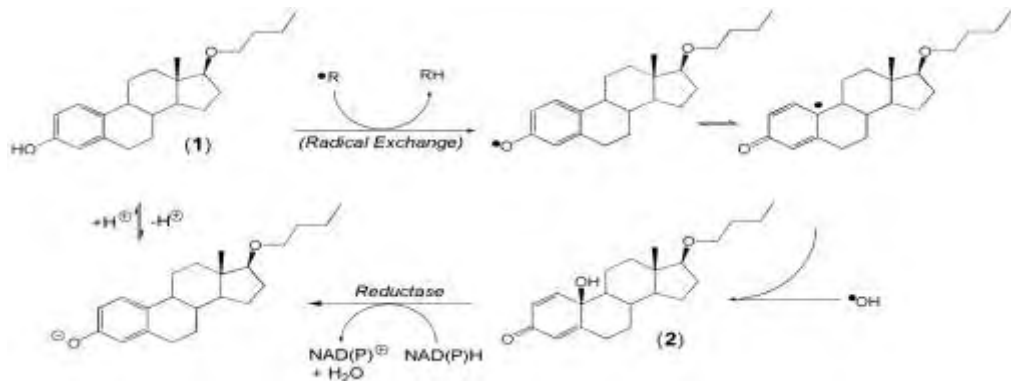
- **Μιτοχονδριακή Δραστηριότητα**

Ενδοκυτταρικά, τα μιτοχόνδρια είναι το κύριο σημείο παραγωγής ROS, καθώς το 1-5% του συνολικού οξυγόνου που καταναλώνει η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα ανάγεται ατελώς. Η E2 επηρεάζει τα μιτοχονδριακά ένζυμα ή τα αναπνευστικά σύμπλοκα για να μειώσει τα επίπεδα ROS, ενισχύοντας τη μιτοχονδριακή αποδοτικότητα. Ορισμένα παραδείγματα είναι μιτοχόνδρια αρουραίων στους οποίους χορηγούνταν 17-β οιστραδιόλη, που παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα οξειδάσης του κυτοχρώματος C και μιτοχόνδρια ERβ- knockout ποντικών

(mitochondrial ERβ is reduced in female Alzheimer's disease patients) που μετά από κατεργασία με πεπτίδια β-αμυλοειδούς παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα ROS (Ishihara et al., 2015).

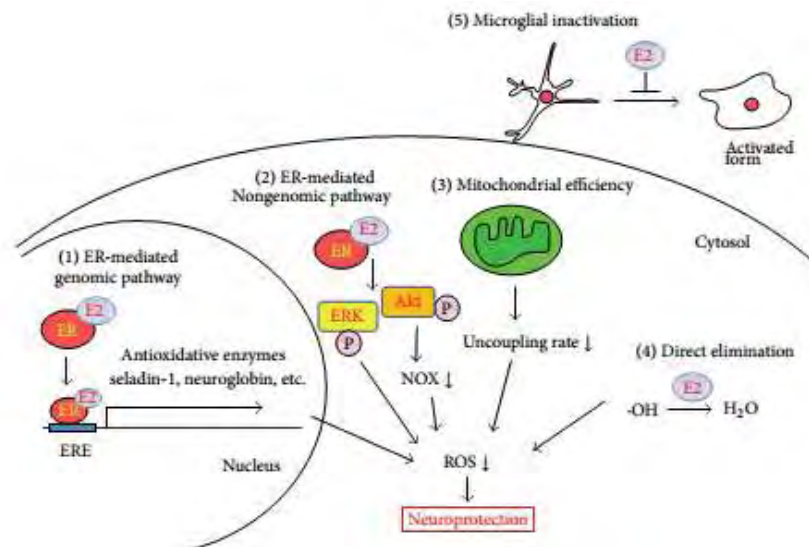
- **Άμεση Εξάλειψη των ROS**

Τόσο τα οιστρογόνα όσο και παράγωγα αυτών, με μία υδροξυλομάδα στη θέση C3 του A δακτυλίου, έχουν αντιοξειδωτική δράση και μπορούν να δράσουν νευροπροστατευτικά και ανεξαρτήτως ERs, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Ένας τέτοιος πιθανός μηχανισμός προτάθηκε χρησιμοποιώντας την 17β-butoxy-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, ένα συνθετικό παράγωγο της E2, σε ένα αντιοξειδωτικό κύκλο καταλυόμενο από ρεδουκτάσες. Με τη δέσμευση των OH· ο A-φαινολικός δακτύλιος οξειδώνεται και το συγγενές μη αρωματικό παράγωγο που έχει χάσει την αγκιστεία για τον ER, σε μία NADPH- εξαρτώμενη αναγωγική αρωματοποίηση, επανακτά την 17OBu-E2 (Εικ.) (Tatrai et al., 2008).



Εικόνα. Αντιοξειδωτικός κύκλος της 17OBu-E2.

- **Απενεργοποίηση Μικρόγλοιας** (βλ. παρακάτω)

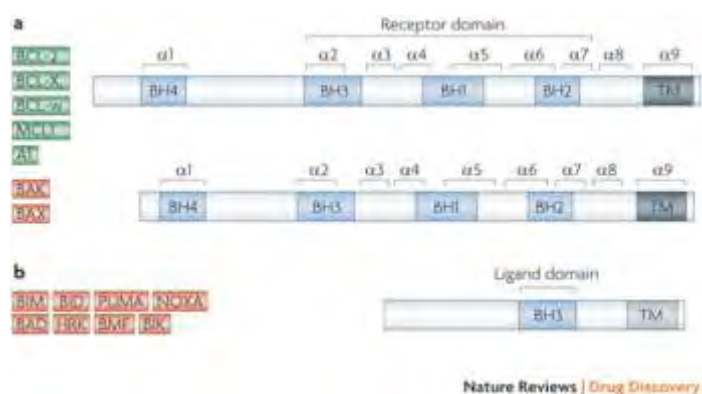


Εικόνα 22. Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί της 17-β Οιστραδιόλης στον εγκέφαλο. 1) Μέσω οιστρονικής σηματοδότησης ενεργοποιείται η έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων και άλλων λειτουργικών πρωτεϊνών. 2) Μέσω μη γενωμικής οδού τα οιστρογόνα ενεργοποιούν σηματοδότηση που οδηγεί στην επιβίωση του κυττάρου. 3) Η E2 επηρεάζει τα μιτοχονδριακά ένζυμα ή τα αναπνευστικά σύμπλοκα για να μειώσει τα επίπεδα ROS, ενισχύοντας τη μιτοχονδριακή αποδοτικότητα. 4) Απευθείας εξάλειψη των ROS ή άλλων δραστικών ριζών από την E2. 5) Η E2 καταστέλλει την παραγωγή ROS από μικρογλοιακά κύτταρα εμποδίζοντας την ενεργοποίησή τους. NOX, NADPH oxidase (Ishihara et al., 2015).

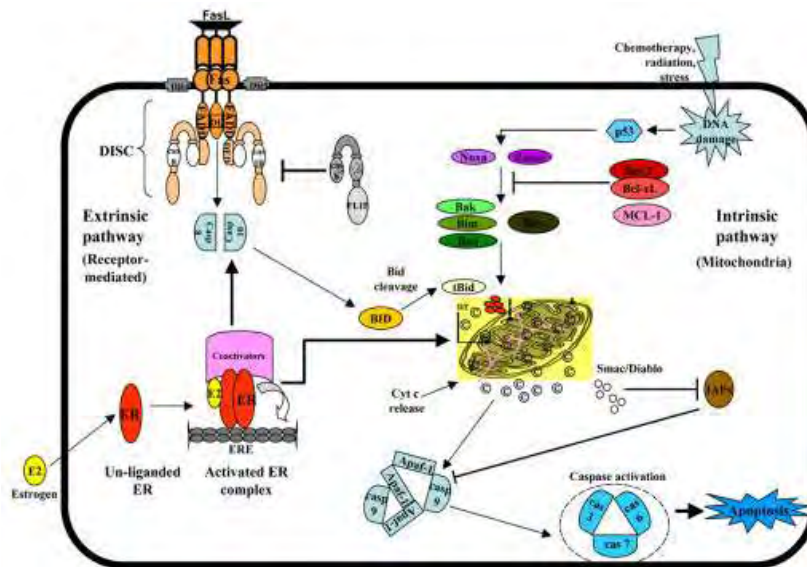
B. Ρύθμιση της Απόπτωσης

Πολλές νευρολογικές διαταραχές χαρακτηρίζονται από ραγδαία ή σταδιακή απώλεια νευρώνων λόγω απορρύθμισης φυσιολογικών διεργασιών όπως η απόπτωση. Η απόπτωση, μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο, συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών απομακρύνοντας κατεστραμμένα ή τραυματισμένα κύτταρα. Έτσι, ενώ η απόπτωση είναι απαραίτητη και στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης του ΝΣ, η απώλεια ώριμων νευρώνων οδηγεί σε λειτουργικές διαταραχές (Petroni et al. 2015).

Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που πυροδοτούν τις αποπτωτικές διεργασίες είναι δύο, το εξωτερικό και το εσωτερικό. Η εκκίνηση του εξωτερικού (προσδετοεξαρτώμενου) μονοπατιού λαμβάνει χώρα έξωκυττάρια με την ενεργοποίηση επιφανειακών υποδοχέων από προ-αποπτωτικού προσδέτες (π.χ CD95L/Fas). Της εν λόγω ενεργοποίησης ακολουθεί η πρόσδεση σε αυτούς της πρωτεΐνης FADD, η δημιουργία του συμπλόκου DISC, και η στρατολόγηση εκκινητήριων Cas 8 και 10 που απελευθερώνοντας πρωτεολυτικά ένζυμα στο κυτοσόλιο ενεργοποιούν τις δραστικές Cas 3, 6 και 7. Προϊόν διαφόρων τύπων κυτταρικού στρες είναι το εσωτερικό (μιτοχονδριακό) μονοπάτι στο οποίο οι ανταγωνιστικές δράσεις των προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl-2 ελέγχουν την απόπτωση ρυθμίζοντας τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απελεύθερωση του Cyt C. **(Εικ.23)**. Ειδικότερα μετά την ενεργοποίηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, αυτές μετακινούνται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη και αποδιοργανώνουν την λειτουργία των αντι-αποπτωτικών, αυξάνοντας τη διαπερατότητα της εν λόγω μεμβράνης (MOMP) **(Εικ.24)** (Lewis et al., 2009).



Εικόνα 23. Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2. Η οικογένεια αποτελείται από αντι-αποπτωτικά (πράσινο χρώμα) και αποπτωτικά μέλη (κόκκινο χρώμα). Εκτός αυτής της λειτουργικής διάκρισης υπάρχει και δομική διάκριση καθώς συναντάμε και μέλη που διαθέτουν μόνο τη περιοχή BH3. **a)** Τα μέλη που διαθέτουν τέσσερις BH περιοχές εμφανίζουν κοινή τριτοταγή δομή. Οι αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες έχουν ανταγωνιστική δράση με τις Bax, Bak την οποία ασκούν με απευθείας πρόσδεση. **b)** Τα μέλη που διαθέτουν μόνο τη BH3 περιοχή, ανταγωνίζονται τα αντι-αποπτωτικά, δεσμευοντάς τα με τη BH3.



Εικόνα 24. Τα δύο κύρια μονοπάτια που περιλαμβάνονται στη ρύθμιση της απόπτωσης (Lewis et al.2009)

Επιστρέφοντας στο θέμα που πραγματευόμαστε, η συμμετοχή των νευροστεροειδών σε αποπτωτικούς μηχανισμούς σχετίζεται άμεσα με τη νευροπροστατευτική τους δράση, και τα οιστρογόνα με τη σειρά τους, φαίνεται να προστατεύουν το Κ.Ν.Σ από βλάβη λόγω απόπτωσης. Η αντι-αποπτωτική δράση της E2 επιτυγχάνεται κυρίως με τη διατήρηση της ισορροπίας αντι-αποπτωτικών/προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών προς το μέρος των πρώτων, μέσω των παρακάτω μηχανισμών :

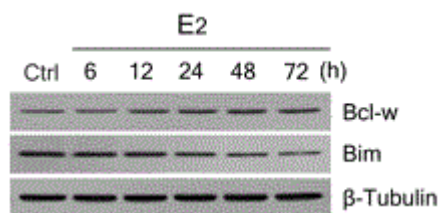
I. Θετική ρύθμιση των αντι-αποπτωτικών γονιδίων

- a) Αύξηση μέσω JNK σηματοδότησης της έκφρασης της αντι-αποπτωτικής *bcl-w*, η οποία είναι διαδεδομένη στο ΚΝΣ και έχει σημαντική δράση σε ώριμους νευρώνες ενήλικων ατόμων (Yao et al.2006).
- b) Θετική ρύθμιση της έκφρασης του αντι-αποπτωτικού *Bcl-2* στην κυτταρική σειρά MCF-7 μέσω δύο EREs στον υποκινητή του εν λόγω γονιδίου (Perillo et al., 2000).

II. Αρνητική Ρύθμιση των αποπτωτικών γονιδίων

Η E2 μπορεί να ρυθμίζει θετικά γονίδια μέσω EREs, οστώσω μέσω AP-1 η ρύθμιση είναι τόσο θετική (E2-ERα) όσο και αρνητική (E2-ERβ). Έτσι, δεδομένου ότι ο κύριος υπότυπος στο Κ.Ν.Σ είναι ο ERβ, η αντι-αποπτωτική δράση της E2 πιθανότατα μεσολαβείται από την καταστολή προ-αποπτωτικών γονιδίων μέσω AP-1 και συγκεκριμένα από την ενεργοποίηση της Cas-3 και της JNK σηματοδότησης (Sawada et al.2000). Έτσι, παρουσία E2 εμφανίζεται:

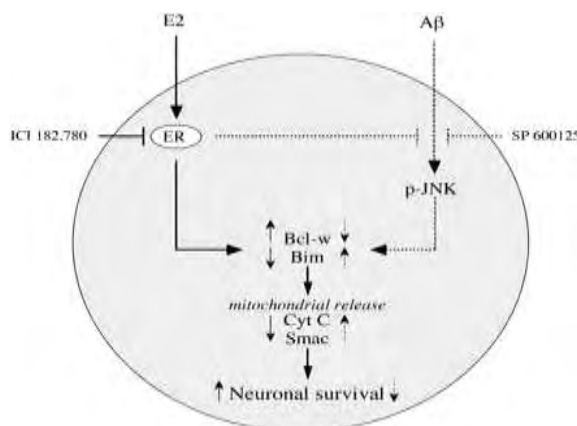
- a) Μείωση της έκφρασης της προ-αποπτωτικής *Bim* μέσω JNK σηματοδότησης (Yao et al.2006) .
- b) Αναστολή της έκφρασης προ- αποπτωτικών πρωτεϊνών όπως η Fas , η FADD και η Bax .
- c) Μικρή αλλά σταδιακή μείωση των μεταγράφων των προ-αποπτωτικών γονιδίων *bax* και *bnip3*.



Εικόνα 25. Οιστρογονική επίδραση στα πρότυπα έκφρασης των Bcl-w και Bim. Καλλιέργειες νευρώνων υπό συνθήκες 10nM E2 για 6-72 ώρες παρουσίασαν μετά από στύπωμα κατά Western αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Bcl-w και μείωση αυτών της Bim. Σαν control φόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η β-τουμπουλίνη (Yao et al 2007).

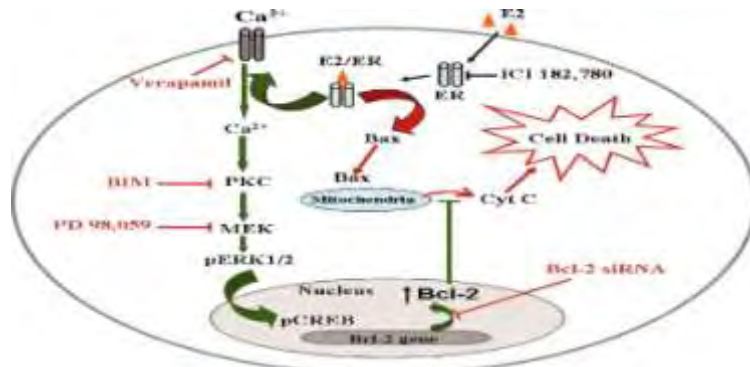
III. Επίδραση σε σηματοδοτικά μονοπάτια

- a) Μετά από έκθεση σε αμυλοειδές β ή E2 μπορεί να αναστείλλει την JNK σηματοδότηση μιμούμενη αναστολείς όπως ο SP600125. Η JNK σηματοδότηση επάγει το εσωτερικό αποπτωτικό μονοπάτι που περιλαμβάνει μειωμένη έκφραση Bcl-w, αυξημένη έκφραση Bim, επακόλουθη απελευθέρωση του CytC και smac πρωτεϊνων, και θάνατο του νευρώνα. Ωστόσο, καθώς ένας τέτοιος προστατευτικός μηχανισμός δεν ενεργοποιείται υπό φυσιολογικές συνθήκες, θα μπορούσε να ενεργοποιείται μετά από τραυματισμό (Εικ.26) (Yao et al., 2007).



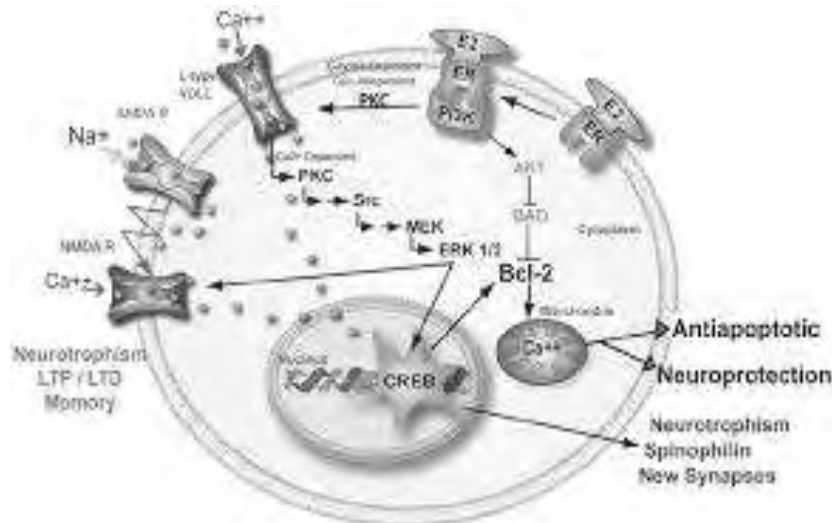
Εικόνα 26. Η νευροπροστατευτική - αντιαποπτωτική δράση της E2 περιλαμβάνει δύο συμπληρωματικά μονοπάτια. Υπό φυσιολογικές συνθήκες (μαύρα βέλη) εμφανίζεται αύξηση της αντι-αποπτωτικής Bcl-w και μείωση της προ-αποπτωτικής Bim αναστέλλοντας το μιτοχondριακό αποπτωτικό μονοπάτι. Υπό τοξικές συνθήκες, όπως η έκθεση σε αμυλοειδές Αβ (διακεκομμένα βέλη), αναστέλλεται η JNK σηματοδότηση που θα οδηγούσε σε αποπτωτικό θάνατο του νευρώνα (Yao et al 2007).

- b) Λόγω έκθεσης σε E2 αυξάνονται τα ενδοκυττάρια επίπεδα Ca^{2+} , επέρχεται φωσφορυλίωση της ERK και παρατηρείται τελικώς αύξηση της αντιαποπτωτικής Bcl-2. Συγχρόνως, η αύξηση Ca^{2+} επιφέρει και αποπτωτικά σήματα όπως η μετατόπιση της αποπτωτικής Bax στα μιτοχόνδρια, γεγονός που υποδηλώνει ότι η οιστρογονική δράση είναι δυσδιάστατη και το τελικό αποτέλεσμα πολυπαραγοντικό (Subramanian et al.2007)(Εικ.27).



Εικόνα 27. Διτή οιστρογονική δράση σε αποπτωτικά μονοπάτια ανθρώπινων μακροφάγων . Με πράσινο απεικονίζεται το αντι-αποπτωτικό μονοπάτι επαγωγής της Bcl-2, ενώ με κόκκινο το αποπτωτικό μονοπάτι μετακίνησης της Bax προς τα μιτοχόνδρια (*Subramanian et al.2007*).

- c) Οι ERs, αλληλεπιδρώντας με μεμβρανικούς υποδοχείς επάγουν PI₃K σηματοδότηση και ενεργοποιούν εντέλει τη κινάση Akt η οποία ρυθμίζει θετικά την ενεργότητα των αντι-αποπτωτικών μελών της Bcl-2 οικογένειας και αρνητικά των αποπτωτικών (Huffman et al 2006, Chipuk et al., 2010) (**Εικ.28**)



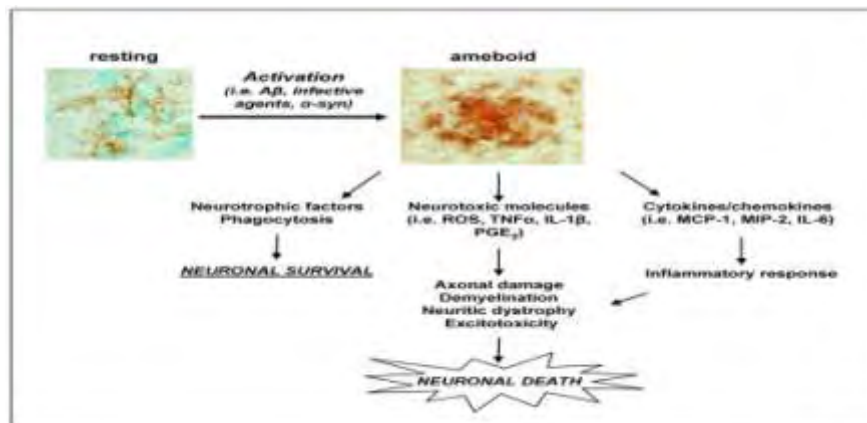
Εικόνα 28.Συνδιαστική Αντι-αποπτωτική δράση της 17β –οιστραδιόλης . Δέσμευση της E2 σε μεμβρανικούς υποδοχείς επιφέρει ενεργοποίηση της PI₃K, επακόλουθη αύξηση των επιπέδων Ca²⁺ τα οποία ενεργοποιούν την Src κινάση η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την ERK. Η κινάση ERK μεταναστεύει στο πυρήνα και ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης το παράγοντα CREB, ο οποίος επάγει την έκφραση αντι-αποπτωτικών γονιδίων (π.χ Bcl-2). Η αντιαποπτωτική δράση της E2 επεκτείνεται καθώς η ενεργή PI₃K ενεργοποιεί την Akt που τελικά αναστέλλει ανταγωνιστές της Bcl-2 (π.χ Bad) (*Chipuk et al., 2010*).

- d) Δεδομένου του ότι η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου(GSK-3) φωσφορυλιώνει και οδηγεί σε πρωτεολυτική αποικοδόμηση την αντι-αποπτωτική MLC-1 (Chipuk et al., 2010), μπορούμε να συμπεράνουμε η οιστρογονική αναστολή της GSK-3 (Gomez et al., 2004) είναι άλλος ένας τρόπος με τον οποίο οι ERs, συνηγορούν στην επαγωγή αντι-αποπτωτικών μονοπατιών.

Γ. Ρύθμιση της Φλεγμονώδους Απόκρισης

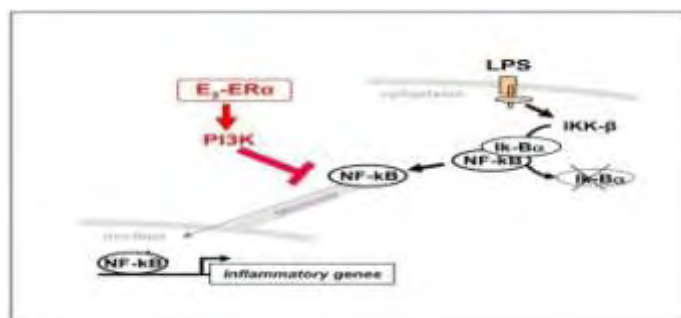
Η E2, μέσω της δράσης της σε μικρογλοιακά κύτταρα του Κ.Ν.Σ προστατεύει τους νευρώνες από εκτεταμένη φλεγμονώδη αντίδραση. Η μικρόγλοια αποτελεί πρωτεύοντα τύπο ανοσοποιητικών κυττάρων του Κ.Ν.Σ., που αποκρινόμενα σε εξωκυτάρια παθογόνα ή ενδοκυτάρια απόβλητα,

ενεργοποιούνται τάχιστα. (Ishihara et al., 2015). Η οργανωμένη αυτή απόκριση, περιλαμβάνει αλλαγή της χαρακτηριστικής αστεροειδούς μορφολογίας, μεγέθυνση του κυτταρικού σώματος και αλλαγές στον κυτταροσκελετό (Vegeto et al., 2008)(**Εικ28.**). Ωστόσο, μια εκτεταμένη ενεργοποίησή τους, πέραν της φυσιολογικής αμυντικής απόκρισης, προάγει την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων κυτοκινών και άλλων φλεγμονωδών μορίων όπως ο TNF-α, η IL-1β, το NO, και οι ROS. Κατ'αυτό τον τρόπο, η υπερ-ενεργοποιημένη μικρόγλοια φαίνεται να σχετίζεται με την παθογένεση του PD, του AD, της σχιζοφρένειας, της επιληψίας και της κατάθλιψης (Ishihara et al 2015, Vegeto et al 2008).



Εικόνα28. Ενεργοποίηση της μικρόγλοιας σχετίζεται με απώλεια νευρώνων (Vegeto et al.2008).

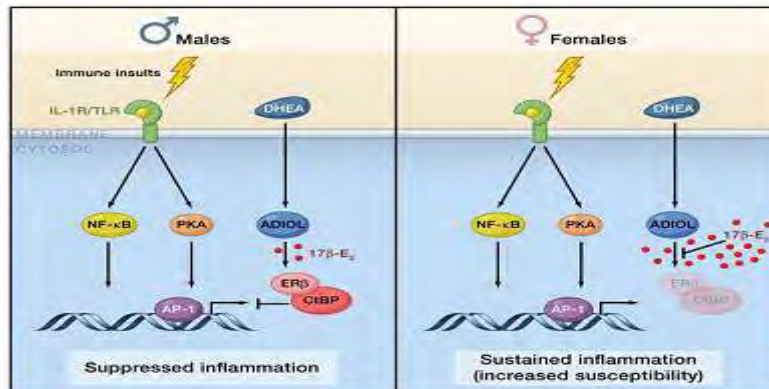
Τα εν λόγω κύτταρα καταστέλλουν την έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών αποκρινόμενα στην E2, μέσω ERα και ERβ που εκφράζονται κυρίως πυρηνικά (Ishihara et al 2015). Ο μηχανισμός πίσω από την αντιφλεγμονώδη δράση της E2 που προτάθηκε από τους Vegeto et al., είναι η παρεμπόδιση της μετατόπισης του μεταγραφικού παράγοντα p65 (μέλος της οικογένειας NF-κΒ) στον πυρήνα, όπου επάγει φυσιολογικά την μεταγραφή προ-φλεγμονωδών γονιδίων (**Εικ.29**). Το γεγονός αναστολής των παραπάνω παρουσία του αναστολέα των ER, ICI 182,780 , ενισχύει την υπόθεση της οιστρογονικής συμμετοχής στη διαδικασία.



Εικόνα 29. Πιθανός μηχανισμός δράσης της E2 σε στη μικρόγλοια. Η κυτταροπλασματική δραστηριότητα του ενεργοποιημένου ER, συμπεριλαμβανομένης και της επαγωγής της PI3K, αναστέλλει την ενδοκυτταρική μετατόπιση του NF-κΒ στον πυρήνα μέσω μικροσωλινίσκων. Ο λιποσακχαρίτης LPS, υπό άλλες συνθήκες, θα επέφερε αυξημένη σύνθεση προφλεγμονωδών διαβιβαστών και ενεργοποίηση των μικρογλοιακών κυττάρων (Vegeto et al 2008).

Ένας άλλος μηχανισμός που προτείνεται το 2011 από τους Saijio et al., μετά από παράγοντες όπως ο LPS, είναι η παρεμπόδιση της μεταγραφής των προφλεγμονωδών γονιδίων σε μικρόγλοια και αστροκύτταρα, μέσω ERβ. Ειδικότερα, ο ERβ που είναι προσδεδεμένος στους υποκινητές των εν λόγω γονιδίων μέσω AP-1, στρατολογεί τον συγκαταστολέα CtBP για να αδρανοποιήσει τη μεταγραφική μηχανή. Στα θυληκά άτομα παρουσία φλεγμονωδών σημάτων, ο ανταγωνισμός των στεροειδών

προσδεδών για τον ERβ μπορεί να επάγει φλεγμονή στο ΚΝΣ, εξηγώντας πιθανώς γιατί σε ασθενείς όπως η MS η προσβολή στις γυναίκες είναι συχνότερη (Gosselin, Rivest 2011) **(Εικ.30)**.



Εικόνα 30. Πιθανό μοντέλο της επιρροής που ασκούν στεροειδείς ορμόνες σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις του εγκεφάλου θυληκών και αρσενικών ατόμων. Φλεγμονώδη σήματα, επάγουν μέσω NF-κΒ και PKA, αντίστοιχη ενδοκυττάρια σηματοδότηση. Η ADIOL, προϊόν της ενζυμικής μετατροπής της DHEA από τη 17β-HSD, ενεργοποιεί τον ERβ για να δημιουργήσει σύμπλοκο με τον συγκαταστολέα CtBP, και να αποσιωπήσει τα προφλεγμονώδη γονίδια. Αντίθετο αποτέλεσμα προκύπτει παρουσία E2, η οποία ανταγωνίζεται την ADIOL εξηγώντας πιθανώς γιατί οι γυναίκες είναι πιο ευπρόσβλητες σε αυτοάνοσα νοσήματα, όπως η MS, σε σχέση με τους άνδρες **(Gosselin, Rivest 2011)**.

Επικουρικές αντι-φλεγμονώδεις δράσεις της E2 η αποσιώπηση προφλεγμονωδών γονιδίων μέσω καταστολής της ακετυλίωσης των ιστονών (Vegeto et al.2002).

Πίνακας 2. Γονίδια-στόχοι που εμπλέκονται στη νευροπροστατευτική δράση της E2 στο Κ.Ν.Σ (Ishihara et al. 2015)

Target gene (up or down)	Proposed Effects
SOD1 (↑)	ROS elimination
SOD2 (↑)	ROS elimination
GPx (↑)	ROS elimination
Catalase (↑)	ROS elimination
iNOS (↓)	Decreases in reactive radicals
nNOS (↓)	Decreases in reactive radicals
nNOS (↓)	Decreases in reactive radicals
GST (↑)	Elimination of ROS-derived reactive metabolites
NQO1 (↑)	Elimination of ROS-derived reactive metabolites
Seladin-1 (↑)	Antiapoptosis
Neuroglobin (↑)	Antiapoptosis, anti-inflammation
IL-6 (↓)	Anti-inflammation
IP-10 (↓)	Anti-inflammation
MMP-9 (↓)	Anti-inflammation
Cytochromecoxidase (↑)	Increasment of mitochondrial efficiency
Bax (↓)	Antiapoptosis

2. Σκοπός

Δεδομένης της πολυεπίπεδης οιστρογονικής ρύθμισης πληθώρας φυσιολογικών διεργασιών, αναμενόμενη είναι η εμφάνιση ποικίλων παθογενέσεων σε περίπτωση διαταραχής της. Ορμονοεξαργτώμενοι καρκίνοι, οστεοπόρωση, νευροεκφυλιστικές διαταραχές και καρδιαγγειακά νοσήματα είναι μόνο μερικές από τις ασθένειες που σχετίζονται με τη διατάραξη αυτής της εύρυθμης και αυστηρά ελεγχόμενης ρύθμισης. Συμπεριλαμβανομένης δε, και της αύξησης του προσδόκιμου ζωής είναι πιθανότερο γυναίκες μετεμμηνοπαυσιακά, αλλά και άνδρες, να “συμβιώσουν” για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα με τα δυσχερή συμπτώματα των προαναφερθέντων διαταραχών.

Η έκδηλη συμμετοχή των οιστρογόνων σε ζωτικές λειτουργίες του Ν.Σ και η πιθανή εμπλοκή ξενοοιστρογόνων στην εμφάνιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών που πλήττουν μη αναστέψιμα, εγείρει ερωτήματα που ταλανίζουν την παγκόσμια ιατρική κοινότητα και αφορούν την ανάπτυξη βελτιωμένων μεθόδων πρόληψης και ιστοειδικών θεραπευτικών προσεγγίσεων. Έτσι, μια έρευνα επίκεντρο της οποίας είναι η αποσαφήνιση της μοριακής βάσης της δράσης οιστρογονομιμητικών ουσιών, όπως είναι το πανταχού παρόν υδροξυχλωριούχο αργίλιο, είναι αν μη τη άλλω καιρία, αναμφιβόλως επωφελής, και εξαιρετικού επιστημονικού ενδιαφέροντος.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, ο σκοπός της παρούσης διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της πιθανής οιστρογονικής δράσης αλάτων αργιλίου (ACH) στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά νευρικών κυττάρων SHSY-5Y, διερευνώντας την εμπλοκή αυτών στη ρύθμιση μορίων με πρωταγωνιστικό ρόλο στις νευροπροστατικές οδούς της φλεγμονής, του οξειδωτικού στρες και της απόπτωσης.

Για την εξυπηρέτηση των παραπάνω σκοπών, η πειραματική προσέγγιση αποτελείται από 3 κυρίως σκέλη:

1. Το πρώτο μέρος της πειραματικής προσέγγισης αφορά στον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης μορίων (με μεθόδους ανοσοαποτύπωσης κατά Western) που εμπλέκονται σε μηχανισμούς απόπτωσης, φλεγμονής και οξειδωτικού στρες και τα οποία βρίσκονται υπό τον έλεγχο οιστρογονικών αποκρίσεων. Η συγκριτική μελέτη των επιπέδων τους, γίνεται παρουσία E2, ACH, ICI182,780 και συνδυασμού αυτών.
2. Στο δεύτερο μέρος, υπό τις ίδιες συνθήκες με παραπάνω (C, E, EA, I, IE, IA), εξετάζονται μέσω απομόνωσης του συνολικού RNA και Real-Time PCR, επιλεκτικά, τα μεταγραφικά επίπεδα των παραπάνω μορίων, προκειμένου να εξεταστεί ενδεχόμενη σύμπτωση με τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.
3. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται υποκυτταρική κλασμάτωση, απομόνωση μιτοχονδρίων της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y, και εξετάζονται (με μεθόδους ανοσοαποτύπωσης κατά Western), μόρια που συμμετέχουν σε αποπτωτικούς και αντι-οξειδωτικούς μηχανισμούς.

Τέλος, συμπληρώνοντας το φάσμα της πιθανής οιστρογονικής δράσης του υδροξυχλωριούχου αργιλίου πραγματοποιείται μέτρηση του συνολικού ενδοκυττάρου ATP, προκειμένου να εξεταστεί κατά πόσο η εν λόγω ουσία, εμπλέκεται σε μιτοχονδριακούς μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας.

3. Πειραματικό Μέρος

3.1. Οργανολογία

- Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYS™
- Laminar Flow Hood Tel Star AV-30/70
- Incubator: New Brunswick (an Eppendorf Company) Galaxy 170S
- Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: Entrofriger- BLII/ PSSelecta®
- 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.BKodak

3.2. Υλικά

i. Χημικά

- ACH 50% (Sigma)
- Acrylamide/Bis acrylamide 40 % (Bio-Rad)
- APS (Sigma)
- Bradford protein assay (Bio-Rad)
- DMSO (Sigma)
- DTT (SERVA)
- ECL A +ECL B (Pierce)
- E2(Sigma)
- FBS Gibco® (Life Technologies - Invitrogen) *
- ICI (SIGMA)
- L-Glutamine (Life Technologies - Invitrogen)
- Na₂HPO₄ (Merck)
- NaCl (Panreac)
- NaHCO₃ (Merck)
- NaOH (Merck)
- 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)
- Ισοπροπανόλη (Scharlau)

- Μάρτυραςμοριακώνμεγεθών Pageruler™ Prestained Protein Ladder (ThermoScientific Fermentas)
- Μεθανόλη (Merck)
- Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Whatman (Protran)
- Πενικιλίνη-Στρεπταμυκίνη (Invitrogen)
- Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων ×5 ή LysisBuffer ×5 (Promega)

ii. Θρεπτικά Υλικά

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

Περιεκτικότητες των θρεπτικών μέσων: 10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S

iii. Διαλύματα

PMSF 200 mM (2ml)	Διάλυση 0.07 grPMSF σε 2 mL ισοπροπανόλης, διαμοιρασμός σε aliquots των 200 μL και αποθήκευση στους -20 °C.
Sonication Buffer	20 mM Tris pH 7.5, 0.5 % TritonX-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA Αποθήκευση στους 4 °C. Σε 1 mL από το παραπάνω διάλυμα προσθήκη 0.5 μl PMSF 20 mM (20 °C) και 2 μlDTT 1 M (20 °C). Η DTT χρησιμεύει ως αναγωγικός παράγοντας.
Διάλυμα Bradford	Stock 5x. Χρήση σε C _{τελ} 1x, αραιώνοντας με ddH ₂ O. Αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του δμ Bradford, 1:1000.
SampleBuffer 4x	1 M Tris pH 6.8, 10 % γλυκερόλη, 10 % SDS, 5 % β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 % κυανούνη της βρωμοφαινόλης. Αποθήκευση στους -20 °C. Η β-μερκαπτοαιθανόλη αναγάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και καταργεί την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών.
Tris 20 mM pH 7.5	Μίξη σε erpendorf (1.5 mL) 20 μL stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 (4 °C) με 980 μl ddH ₂ O. Αποθήκευση σε R.T
Tris-HCl 1.5M pH 8.8 (200 ml)	Διάλυση 36,342 grTris σε dH ₂ O. Ρύθμιση pH στο 8.8 με προσθήκη HCl 12 N. Συμπλήρωση του όγκου με dH ₂ O. Αποθήκευση στους 4 °C
TEMED	Χρήση χωρίς αραιώση. Αποθήκευση στους 4 °C.
APS 10 %	Διάλυση 100 mg APS σε 1 ml ddH ₂ O. Αποθήκευση στους -20 °C. Κατά τη χρήση παραμένει σε πάγο (4 °C).
Running Buffer 10x	30,3 gr Tris base και 144,00 gr γλυκίνης, διαλύονται σε όγκο 1 L ddH ₂ O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος. Αποθήκευση σε R.T.
RunningBuffer1x	Αραίωση 100 mL R.B. 10x σε 900 ml dH ₂ O (αναλογία 1:9). Προσθήκη SDS σε αναλογία 0.1 %. Αποθήκευση σε R.T.
Transfer Buffer 10x	10 % Running Buffer 10x, 20 % MeOH και 0.05 % SDS. Συμπλήρωση με dH ₂ O. Αποθήκευση στους 4 °C.
PBS 10x	91 mM Na ₂ HPO ₄ , 17 mM NaH ₂ PO ₄ και 1500 mM NaCl. Αποθήκευση σε R.T
PBS-T 1x	Αραίωση του stock buffer PBS 10x αραιώνεται dH ₂ O ή ddH ₂ O. Προσθήκη Tween-20 σε αναλογία 1 %. Αποθήκευση σε R.T
Sodium Phosphate buffer	Παρασκευή ρυθμιστικού δμ φωσφορικού νατρίου 0.1 M pH 7.5 με

solution	ανάμειξη κατάλληλων όγκων από τα stock δμ μονοβασικού NaH_2PO_4 0.2 M και διβασικού Na_2HPO_4 0.2 M. Τα stock δμ παρασκευάζονται με διαλύτη το H_2O , κάνοντας τους κατάλληλους υπολογισμούς για τη μάζα της χημικής ένωσης που απαιτείται.
Διαλύματα για εμφάνιση σήματος	Χρήση δύο σκευασμάτων της Kodak, ένα δμ ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα δμ μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Παρασκευή με ανάμειξη 1 : 3,5 v/v από το αντίστοιχο δμ (fixer ή developer) σε dH_2O .
Loading Buffer	Για 10 ml : 0,0125 grbromophenolblue, 0,0125 grxylenecyanol, σε 1 ml γλυκερόλη 100% και μέχρι τα 10 ml dH_2O . Αποθηκεύεται στους 4 °C.
TAE 50×	Για 1l: 242,2 grTris σε 600 ml ddH_2O , αργή προσθήκη 57,1 ml υγρού οξικού οξέος και 100 ml EDTA 0,5 M, pH = 8. Συμπλήρωση με ddH_2O μέχρι τον επιθυμητό όγκο.
BufferA	Hepes-KOH 20mM pH 7.5, KCl 10 mM, MgCl_2 1,5 mM, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 0,1 mM και σουκρόζη 250 mM.
BufferB	Tris 20mM pH 7.5, μαννιτόλη 0,21 mM, EDTA 2,5 mM και σουκρόζη 0,07 mM
RIPA Buffer	Tris/HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, NP-40 1% και Na-deoxycholate 0,25%. Φυλάσσεται στους 4 °C και όταν στον όγκο RIPA που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για το εκάστοτε πείραμα, προστίθενται αναστολείς πρωτεασών

iv. Πρωτογενή Αντισώματα

- Αντίσωμα έναντι ERα από κόνικλο, ERα G20 (SantaCruz)
- Αντίσωμα έναντι ERβ από κόνικλο, ERβH150 (SantaCruz)
- Αντίσωμα έναντι β- ακτίνης από επίμυ (Sigma)
- Αντίσωμα έναντι α-τουμπουλίνης από επίμυ
- Αντίσωμα έναντι Casp 3 από κόνικλο (Abcam)
- Αντίσωμα έναντι Casp 9
- Αντίσωμα έναντι Bcl 2 από επίμυ (SantaCruz)
- Αντίσωμα έναντι Bax
- Αντίσωμα έναντι Bcl-xl
- Αντίσωμα έναντι ERβ (IHC) MCA, (Serotec)
- Αντίσωμα έναντι CytC
- Αντίσωμα έναντι Trx2
- Αντίσωμα έναντι SDH

v. Δευτερογενή Αντισώματα

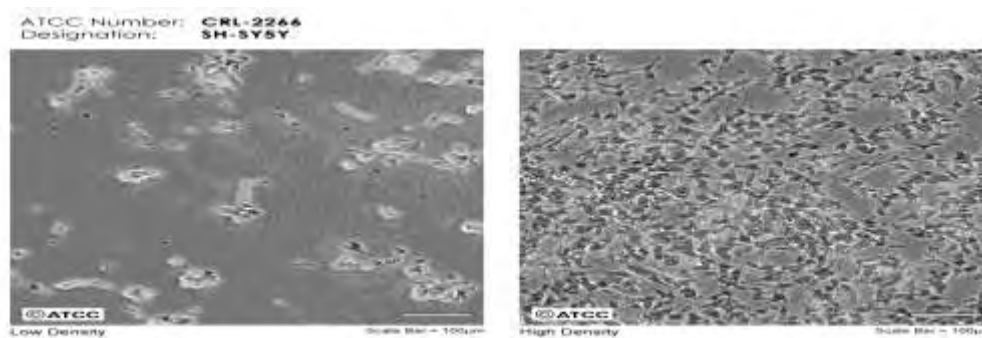
- Αντίσωμα έναντι mouse IgG-HRP (Jackson Laboratories)
- Αντίσωμα έναντι rabbit IgG-HRP (Pierce Antibodies)
- Αντίσωμα έναντι goat IgG-HRP (Pierce Antibodies)

vi. 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)
- Πιπέττεςορολογικές -Serological (2, 5, 10 και 25 mL)
- Ρύγχοι (0.2-10 μ L, 20-200 μ L και 100-1000 μ L)
- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) 60mm και 150x20mm
- Αυτόματος πιπεταδόρος

vii. Κυτταρικές Σειρές

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματική εργασίας έγινε χρήση της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y (**Εικ.**) με χαρακτηριστικά που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**. Η εν λόγω σειρά προέρχεται από ανθρώπινα νευροβλαστωματικά κύτταρα και θεωρείται ντοπαμινεργική, χολινεργική, γλουταμινεργική και αδενοσινεργική (Su et al. 2012). Τα νευρικά χαρακτηριστικά της σειράς χάνονται καθώς αυξάνεται ο αριθμός των "passage" και δεν συνίσταται η χρήση τους μετά τα 20. Τέλος, επιστρέφοντας στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος, η σειρά εκφράζει και τους δύο υποτύπους ER καθώς και μια ισομορφή του ER α τον, delta 7-ER α (Su et al., 2012).



Εικόνα 31. Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y σε χαμηλή και υψηλή *confluency*. Εικόνα από την επίσημη ιστοσελίδα της εταιρίας (<http://www.lgcstandards-atcc.org>).

Πίνακας3. Χαρακτηριστικά της κυτταρικής σειράς SH-SY5Y.

Χαρακτηριστικά	
Organism	Homo sapiens, human
Tissue	bone marrow
Disease	Neuroblastoma
Age	4 years
Gender	Female
Morphology	Epithelial
Product Format	Frozen

3.3. Τεχνικές

3.3.1. Τεχνικές Κυτταροκαλλιέργειας

I. Απόψυξη κυττάρων

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

Προετοιμάζονται 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, βγάλε, και τοποθετήσει με λασκαρισμένα τα καπάκια, στο hood, όλα τα θρεπτικά, μετακινούμαστε στο hood όπου η διαδικασία περιλαμβάνει:

- Προσθήκη 4 ml DMEM 4,5 g/mol Glucose σε δοκιμαστικό σωλήνα Falcon των 15 ml (1).
- Σε μία νέα φλάσκα καλλιέργειας, ανοίγουμε ελαφρώς το καπάκι. Τοποθέτηση κάθετα στο hood.
- Εξαγωγή του cryovial από την κατάψυξη και τοποθέτηση εντός υδατόλουτρου κρατώντας το (το νερό θα πρέπει να μην έρχεται σε επαφή με το καπάκι αλλά να καλύπτει συγχρόνως τον όγκο των παγωμένων κυττάρων).
- Αναμονή 3-4 min, έως ότου υγροποιηθεί το περιεχόμενο και μείνει μικρή ποσότητα πάγου.
- Γρήγορη εξαγωγή από το υδατόλουτρο, σκούπισμα, ψέκασμα με EtOH και τοποθέτηση στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminarflowhood).
- Άμεση τοποθέτηση του vial σε στατώ, γρήγορο και κάθετο άνοιγμα γρήγορα του καπακιού.
- Μεταφορά του περιεχομένου στον δοκιμαστικό σωλήνα (1) κάνοντας χρήση σιφωνιού των 2 ml.
- Φυγοκέντρηση του δοκιμαστικού σωλήνα (1) 5 min, 1000 rpm και σε θερμοκρασία $20-25^{\circ}\text{C}$.
- Γράφουμε τα στοιχεία στη φλάσκα: όνομα κυτταρικής σειράς, ημερομηνία παγώματος και ξεπαγώματος, passage.
- Αναρρόφηση του υπερκειμένου με γυάλινη πιπέτα Pasteur, με το πέρας της φυγοκέντρησης.
- Καλή επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος, σε 5 ml DMEM 1 g/mol Glucose (low Glucose).
- Μεταφορά του επαναδιαλυτοποιημένου περιεχομένου σε φλάσκα, με πιπέτα των 5 ή των 10 ml.
- Ήπια επαναδιαλυτοποίηση, κλείσιμο της φλάσκας, οριζόντια εξαγωγή από το hood.
- Τοποθέτηση της φλάσκας στο μικροσκόπιο προς εξέταση της μορφής των ξεπαγωμένων κυττάρων. Φυσιολογικά, τα νευρικά κύτταρα, πρέπει να είναι επιπλέοντα, πολλά, σχετικά μεγάλα, στρογγυλά, μαύρα και χωρίς συσσωματώματα.
- Τοποθέτηση εντός επωαστικού κλιβάνου, σε συνθήκες 37°C και 5.0 % CO_2 .

II. Θρυψινοποίηση

Κατά θρυψινοποίηση, η θρυψίνη επιδρά σπάζοντας δεσμούς μεταξύ των κυττάρων και προσκολλήσεις αυτών στην επιφάνεια της φλάσκας. Σε περιπτώσεις κορεσμού (πλήρους κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας), εμφάνισης πολλών και μεγάλων συσσωματωμάτων αλλά και πριν από τους

περισσότερους χειρισμούς που απαιτούν χρήση ή μεταφορά κυττάρων, η διαδικασία είναι αναγκαία. Θεωρούμε κάθε θρυψινοποίηση ως ένα passage και εκτελούμε το πρωτόκολλο:

- Απόψυξη θρυψίνης, θρεπτικών μέσων και τοποθέτησή τους σε υδατόλουτρο 37°C
- Αφαίρεση μέσω αναρρόφησης του θρεπτικού και τοποθέτηση 1-1,5 ml θρυψίνης.
- Κλείσιμο της φλάσκας και μέσω ήπιων κινήσεων, κάλυψη όλων των κυττάρων θα από θρυψίνη.
- Γρήγορος μικροσκοπικός έλεγχος και άμεση τοποθέτηση τη φλάσκας στον κλίβανο για 1- 2 min.

Βγάζουμε αμέσως μετά το πέρας (συνήθως 1min) και εξετάζουμε στο μικροσκόπιο: ιδανικά όλα τα κύτταρα (μεμονωμένα ή σε συσσωματώματα) επιπλέουν. Αν αυτό δεν συμβαίνει, ταρακουνούμε ελαφρώς τη φλάσκα, παρατηρούμε και επανατοποθετούμε για άλλα 60 sec στον κλίβανο. Δίνουμε ιδιαίτερη προσοχή στον χρόνο έκθεσης των κυττάρων στη θρυψίνη, γιατί η παρατεταμένη πρωτεόλυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροτοξική δράση. Ακολουθεί:

- Κάθετη τοποθέτηση της φλάσκας στο hood, προσθήκη 4 ml θρεπτικού μέσου, για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης, και μεταφέρα του περιεχομένου σε falcon των 15ml.
- Φυγοκέντρηση 5min, 1000rpm και 20-25 °C.
- Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε θρεπτικό μέσο για να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω τα κύτταρα ή να επανατοποθετηθούν στη φλάσκα ανάπτυξης.

III. Ψύξη Κυττάρων

Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Απόψυξη FBS, θρυψίνης, θρεπτικών και τοποθέτησή τους σε υδατόλουτρο 37°C.
- Σε δύο νέα σωλήνες cryovial γράφουμε τα στοιχεία των κυττάρων που πρόκειται να παγώσουμε (όνομα, ημ/νια, passage). Συνήθως παγώνουμε δύο- δύο cryovial αλλά αυτό εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των κυττάρων, αν και πόση ποσότητα ανακαλλιέργεια θα βάλουμε και λοιπά.
- Υπολογισμός του όγκου του FBS που χρειαζόμαστε (για δύο cryovial και ανακαλλιέργεια)
- Θρυψινοποίηση (βλέπε παραπάνω παράγραφο)
- Απόρριψη του υπερκειμένου με το πέρας της φυγοκέντρωσης.
- Διαλυτοποίηση στην ποσότητα του βόειου ορού που έχει υπολογιστεί προηγουμένως.
- Τοποθέτηση 0,9 ml FBS με τα κύτταρα σε κάθε cryovial.
- Επανατοποθέτηση του υπολοίπου διαλύματος στη φλάσκα, συμπλήρωση (έως τα 5ml) με θρεπτικό και τοποθέτηση της φλάσκας στον επωαστικό κλίβανο.
- Τοποθέτηση 0,1 ml DMSO (εξαιρετικά κυτταροτοξικό), άμεσάτα κλείσιμο του cryovial και αναδεύοντας συνεχώς πάνω- κάτω, μεταφορά σε κατάψυξη, το γρηγορότερο δυνατόν.
- Σημείωση σε κατάλληλο αρχείο, της θέσης του/ των cryovial.

IV. Καταμέτρηση και στρώσιμο κυττάρων

Για τους μετέπειτα χειρισμούς των κυττάρων (πχ. στρώσιμο σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6x και 24x wells), για να προστεθούν ουσίες, να μετρηθεί με ανοσολογικές μεθόδους η

κυτταρική απόκριση και λοιπά, απαιτείται μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού και ισόποση τοποθέτησή του σε wellplate. Έτσι, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:



- Θρυψινοποίηση και ει δυνατόν τέλεια επαναδιαλυτοποίηση με θρεπτικό μέσο.
- Μεταφορά 10μL από τα κύτταρα εντός της καλυπτρίδας στο αιμοκυτταρόμετρο neubaue.
- Τοποθέτηση της πλάκας neubaue στο μικροσκόπιο, εστίαση στα τεταρτημόρια και μέτρηση του συνολικού αριθμού κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο.
- Έστω A,B,Γ και Δ τα τέσσερα τεταρτημόρια, κινούμενοι δεξιόστροφα, και a, b, c και d ο συνολικός αριθμός των κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο αντίστοιχα.
- Υπολογίζεται προσεγγιστικά ο αριθμός των κυττάρων που διαθέτουμε ανά ml κάνοντας χρήση του τύπου: $N_{\text{διαθέσιμων κυτ.}} = \frac{a+b+c+d}{4} \times 10.000$
- Υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων των επιθυμητών κυττάρων κάνοντας χρήση του τύπου:

$$N_{\text{επιθυμητων κυτ.}} = \frac{N_{\text{κυτ.}}}{\text{well}} * N_{\text{well}}$$

- Υπολογίζεται ο όγκος του διαλύματος που περιέχει $N_{\text{επιθυμητών κυτ.}}$ κάνοντας χρήση του τύπου:

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

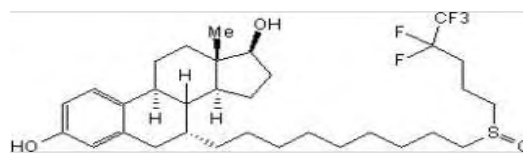
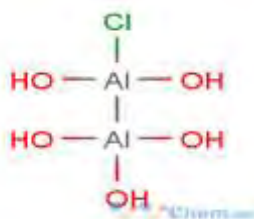
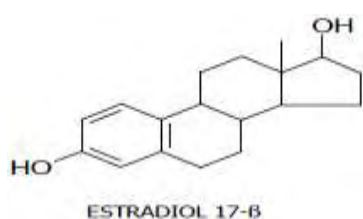
- Μεταφορά του $V_{\text{επιθυμητό}}$ σε νέο falcon και φυγοκέντρηση σε όμοιες συνθήκες (ο υπόλοιπος όγκος κυττάρων επιστρέφεται για ανακαλλιέργεια).
- Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε κατάλληλο V θρεπτικού ($\frac{\text{Όγκος θρεπτικού που προτείνεται}}{\text{well}} \times N_{\text{well}}$)
- Ισοκατανομή του παραπάνω διαλύματος στα wells.
- Κλείσιμο του plate και ευλαβική εκτέλεση περιφερικής κίνησης προκειμένου να είναι ομοιόμορφη η κατανομή των κυττάρων εντός των πηγαδιών. Προσοχή κατά την κίνηση αυτή, διότι λόγω στατικού ηλεκτρισμού τα κύτταρα τείνουν να συγκροτούν συσσωματώματα στο κέντρο.
- Μικροσκοπική εξέταση της εικόνας των κυττάρων και μεταφορά του well-plate στον επωαστικό κλίβανο.

V. Προσθήκη ουσιών και συλλογή κυττάρων

Ο κατ'εξοχήν λόγος που πραγματοποιήθηκαν τα παραπάνω (καταμέτρηση και στρώσιμο κυττάρων σε wellplates), είναι η μετέπειτα προσθήκη των υπό μελέτη ουσιών. Σε κάθε well προστίθεται διαφορετική χημική ουσία (ή διαφορετικός συνδιασμός ουσιών), σε κάποιο από τα wells δεν τοποθετείται καμία ουσία (control) ενώ σε κάποιο άλλο τοποθετείται η φυσική ουσία (ως θετικός μάρτυρας). Αφού τα κύτταρα επώάζονται με τις ουσίες για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, αυτές αφαιρούνται, και ακολουθεί συλλογή των κυττάρων με απώτερο σκοπό τη διερεύνηση της

ενδοκυτταρικής δράσης (σηματοδότηση, γονιδιακή έκφραση, πρωτεϊνικά επίπεδα κ.α) των εν λόγω ουσιών (συνέχεια εργασίας εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών).

Στην παρούσα διπλωματική υπό διερεύνηση είναι η δράση του υδροξυ-χλωριούχου αργιλίου (ACH) το οποίο όπως προειπώθηκε εισαγωγικά, φαίνεται να εμφανίζει οιστρογονική δράση. Έτσι, ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η E2 (17β-οιστραδιόλη) και ως αρνητικός μάρτυρας το ICI182,780 (fulvestrant), (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 ανταγωνιστής του υποδοχέα των οιστρογόνων.



Εικόνα32. Η προς μελέτη ουσία, θετικός (αριστερά) και αρνητικός μάρτυρας (δεξιά).

- Παρασκευή των επιθυμητών συγκεντρώσεων από τα stock που διατίθενται.
- Προετοιμασία 7 erpendorf ως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Eppendorf Tube	DMEM cis-Low glucose	E2	EtOH	ICI M	DMSO	ACH M	ddH ₂ O
Control	2 ml	-	2 μl	-	2 μl	-	2 μl
E2	2 ml	2 μl	-	-	2 μl	-	2 μl
ACH	2 ml	-	2 μl	-	2 μl	2 μl	-
E2+ACH	2 ml	2 μl	-	-	2 μl	2 μl	-
ICI	2 ml	-	2 μl	2 μl	-	-	2 μl
ICI+ E2	2 ml	2 μl	-	2 μl	-	-	2 μl
ICI + ACH	2 ml	-	2 μl	2 μl	-	2 μl	-

Αφού η προσθήκη της εκάστοτε ουσίας γίνεται μέσω διάλυσής της σε 2 ml DMEM (1:1000), οι τελικές συγκεντρώσεις των ουσιών (προκύπτουν από το νόμο της αραιώσης) με τις οποίες επώαστηκαν τα κύτταρα είναι οι παρακάτω:

E2	10 ⁻⁹ M
ACH	10 ⁻⁴ M
ICI	10 ⁻⁷ M

- Καλή ανάδευση του περιεχομένου των erpendorf και προσθήκη αυτού στα wells, αφού έχει μόλις αφαιρεθεί το προηγούμενο θρεπτικό μέσο.
- Επώαση των wells για 2-3 ή 4-5 ημέρες στις προτεινόμενες συνθήκες (37°C, 5% CO₂).

Μετά το πέρας των δεδομένων ημερών απομακρύνονται τα plates από τον κλίβανο και ακολουθεί απόξεση (harvesting) προς συλλογή των κυττάρων ως εξής:

- Προετοιμασία 7 νέων erpendorf (C, E2, ACH, E2+ACH, ICI, ICI+E2, ICI+ACH).

- Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου από τα wells.
- Άμεση πλύση με PBS 1X.
- Προσθήκη LysisBuffer 1X (70μl/well).
- Εξαγωγή του plate από τον χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών και τοποθέτηση για 30 min σε ψυχρό θάλαμο υπό ανάδευση.
- Απόξεση του περιεχομένου των wells με ειδικό εργαλείο ή με το τιπ της πιπέτας.
- Φυγοκέντρηση (15.000 rpm, 5min, 4 °C).
- Απόρριψη του υπερκειμένου PBS και φύλαξη του cell extract σε βαθειά κατάψυξη (-80°C).

VI. Κατεργασία με ενεργό Άνθρακα για Παρασκευή 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 εν λόγω λιπόφιλες ορμόνες του ορού είναι απαραίτητο να αφαιρεθούν ώστε να είναι δυνατή η αντικειμενική εκτίμηση της επίδρασής τους μόνο μετά από την εξωγενή προσθήκη, που πραγματοποιήθηκε για τους σκοπούς του πειράματος.

3.3.2 Τεχνικές εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών

3.3.2.1 Λύση με χρήση υπερήχων (Sonication) και μέτρηση συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου (Μέθοδος Bradford)

Κατά τη διαδικασία του sonication, στόχος είναι η κατά το δυνατόν μεγαλύτερη λύση των κυττάρων. Επαναλαμβάνουμε έτσι, 4 κύκλους όπου τα κυτταρικά περιεχόμενα εκτίθενται για 1 sec, στους υπερήχους που εκπέμπονται από την αντίστοιχη συσκευή (Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S). Οι κύκλοι απέχουν μεταξύ τους διάστημα ίσο με 1min και στο μεσοδιάστημα τα δείγματα διατηρούνται στον πάγο.

Ακολουθεί επώαση με Lysis Buffer για 20min και μέτρηση του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου, με τη μέθοδο Bradford για τον μετέπειτα υπολογισμό της ποσότητας από τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθεί κατά την ηλεκτροφόριση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Αρχή της μεθόδου Bradford είναι η 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. Αυτή η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα 595nm. Εκτελώντας τη μέθοδο, προχωρούμε στα παρακάτω:

- Ανάμειξη 2ml δμ Bradford 5x με 8ml dH₂O σε falcon για να προκύψει τελικό δμ Bradford 1x.
- Προσθέτουμε σε erpendorf εκχύλισμα κυττάρων (που διατηρούμε στον πάγο) και δμ Bradford 1x σύμφωνα με το πίνακα:

Τυφλό	C	E2	ACH	E2+ACH	ICI	ICI+E2	ICI+ACH
2ml δμ	2ml δμ	2 ml δμ B	2ml δμ	2ml δμ	2ml δμ	2ml δμ B	2ml δμ
2μl ddH ₂ O	2μl c.e	2μl c.e	2μl c.e	2μl c.e	2μl c.e	2μl c.e	2μl c.e

- Άμεσο vortex και επώαση για 20 min, σε σκοτάδι, και RT.
- Μηδενισμός με το τυφλό και φωτομέτρηση στα 595nm.
- Υπολογισμός της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος κάνοντας χρήση του τύπου $y = 0,0345x + 0,01$ όπως αυτός προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA, που έγινε στο εργαστήριο.
- Ανάλυση των δεδομένων με τη βοήθεια του προγράμματος excel, παρέχοντας τελικώς την ακριβή σύσταση των δειγμάτων για την ηλεκτροφόριση.

3.3.2.2 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης- Ηλεκτροφόρηση

Της παρασκευής της πηκτής πολυακρυλαμίδης προηγείται η παρασκευή των δειγμάτων που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν και θα περιέχουν τα εξής:

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

Οι υπόλοιποι όγκοι καθορίζονται από την ολική πρωτεϊνική συγκέντρωση του κυτταρικού εκχυλίσματος, ο δε τελικός όγκος είναι 80μl, ενώ κατά την παρασκευή τους τα δείγματα παραμένουν στον πάγο (4°C). Εν συνεχεία, ακολουθεί παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης ως εξής:

- Σωστό στήσιμο της κατασκευής του gel και έλεγχος για τυχόν διαρροές αυτής.
- Παρασκευή της γέλης διαχωρισμού (Separating Gel) περιεκτικότητας 10% ή 12% ως φαίνεται αντίστοιχα στα πινακάκια, και με τη σειρά που ακολουθείται:

ddH ₂ O	1,5 M Tris HCl pH= 8,8	SDS 10%	Bis Acr. 40%	Temed	APS 10%
2,425ml	1,25ml	50μl	1,25ml	2,5μl	25μl

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

Ει δυνατόν, η εισαγωγή των τριών τελευταίων συστατικών να είναι ταυτόχρονη.

- Ανάδευση και άμεση έγχυση μεταξύ των δύο τζαμιών.
- Τοποθέτηση ισοπροπανόλης στο κενό 2-3cm που δημιουργείται και θα υποδεχθεί αργότερα το gel προσκόλλησης, διατηρώντας υγρό το τζελ, κατά το χρόνο πήξης του (30min).
- Παρασκευή της γέλης προσκόλλησης (Stacking Gel) σταθερής περιεκτικότητας ως φαίνεται στον πίνακα και με τη σειρά που ακολουθείται:

ddH ₂ O	1,5 M Tris HCl pH= 6,8	SDS 10%	Bis Acr. 40%	Temed	APS 10%
2,025ml	0,21ml	25μl	0,25ml	2,5μl	12,5μl

Η εισαγωγή των τριών τελευταίων συστατικών να ακολουθεί της αφαίρεσης της ισοπροπανόλης που τοποθετήθηκε στο προηγούμενο βήμα και ει δυνατόν να είναι ταυτόχρονη.

- Ανάδευση και άμεση έγχυση μεταξύ των δύο τζαμιών με σκοπό να πήξει και παράλληλα να κολλήσει με το gel διαχωρισμού.
- Εισάγονται τα χτενάκια που θα δημιουργήσουν τα πηγαδάκια φόρτωσης και αφήνεται το gel να πήξει περίπου 30min.
- Ενεργοποίηση της συσκευής HeatBlocker και ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 95°C, αναμένοντας την ολοκλήρωση της αντίδρασης πολυμερισμού της ακρυλαμίδης.
- Στήσιμο της συσκευής ηλεκτροφόρισης, με τοποθέτηση της ειδικής κασετίνας και απόχυση εξωτερικά αυτής, διαλύματος ηλεκτροφόρισης.
- Με την πήξη του gel εξάγονται τα τζαμάκια και τοποθετούνται στη προαναφερθείσα κασετίνα εντός της συσκευής ηλεκτροφόρισης.
- Εξάγωγή των δειγμάτων από τον πάγο και τοποθέτηση στο HeatBlocker 5min ή 3min ανάλογα με το αν έχουν υποστεί ξανά θέρμανση ή όχι.
- Ελαφρό spin (3sec) των δειγμάτων, φόρτωση 5μl δείκτη γνωστού μοριακού βάρους και 20μl από το κάθε δείγμα.
- Προσεκτική τοποθέτηση του καπακιού με τα ηλεκτρόδια της συσκευής έτσι ώστε τα χρώματα των επαφών και των ηλεκτροδίων να ταυτίζονται.
- Ενεργοποίηση του τροφοδοτικού και ρύθμιση ρεύματος στα 0,02 mA.
- Εφαρμόζεται τάση, το gel αφήνεται να «τρέξει» για όσο χρόνο χρειαστεί.
- Απενεργοποίηση του τροφοδοτικού με το πέρας της διαδικασίας.

3.3.2.3 Εξισορρόπηση και ηλεκτρομεταφορά

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί η διαδικασία της εξισορρόπησης, η οποία περιλαμβάνει την δεκάλεπτη εμβάπτιση της μεμβράνης, των σφουγγαριών, των χαρτιών whatman (δοχείο 1), καθώς και του gel(δοχείο 2), στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς. Μετά το πέρας του δεκαλέπτου, στήνεται η κασετίνα στην οποία θα τοποθετηθούν τα περιεχόμενα των δύο δοχείων ως εξής:

- Ανοιχτή τοποθέτηση της κασετίνας, με την μαύρη πλευρά προς τα κάτω και την άσπρη προς τα πάνω.
- Τοποθετούμε στην κάτω πλευρά, ένα σφουγγαράκι και ένα χαρτί 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.
- Ευθυγραμμισμένη και προσεκτική τοποθέτηση της πηκτής πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.
- Προσεκτική τοποθέτηση εκ νέου δύο χαρτιών whatman, επιτυγχάνοντας τη πλήρη επαφή με τη μεμβράνη που θα αποτρέψει τον εγκλωβισμό του αέρα, τη δημιουργία φυσαλίδων και κατ' επέκταση τη δημιουργία κενών στη μεμβράνη.
- Η συσκευή ηλεκτρομεταφοράς βυθίζεται σε πάγο καθώς λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται από την εφαρμογή της τάσης και από το κύκλωμα που δημιουργείται κατά την ηλεκτρομεταφορά, ενδέχεται να καεί το gel και η μεμβράνη.
- Τοποθέτηση της κασετίνας με συγκεκριμένη φορά και απόχυση διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς στο δοχείο.
- Τοποθετείται το καπάκι με τα ηλεκτρόδια με τη σωστή φορά.

- Ενεργοποίηση του τροφοδοτικού και ρύθμιση της τάσης στα 0.35 A και του χρόνου στα 70min.

3.3.2.4 Blocking με γάλα και επώαση με 1^ο αντίσωμα

Με το πέρας της 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. Ακολουθεί blocking του οποίου σκοπός είναι η 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). Του blocking ακολουθεί η επώαση με το πρώτο αντίσωμα και οι δύο διαδοχικές διαδικασίες περιλαμβάνουν:

- Παρασκευή 8μl γάλακτος, ομογενοποιώντας 10 μέρη σκόνης γάλακτος σε 100 μέρη PBST 1x.
- Υπό ανάδευση επώαση της μεμβράνης στο παραπάνω 8μl για 60min, σε RT.
- Πλύση της μεμβράνης με PBSTx1.
- Σε cold room, υπό ανάδευση, overnight επώαση της μεμβράνης με ομαλώς αποψυχθέν πρώτο αντίσωμα.
- Συλλογή του αντισώματος με το πέρας του overnight.
- Πέντε, πεντάλεπτες, υπό ανάδευση πλύσεις της μεμβράνης με PBST 1x, που απομακρύνουν την περίσσεια αντισώματος για να μείνει στη μεμβράνη μόνο ό,τι έχει δέσει ειδικά (δηλαδή σε συγκεκριμένους επίτοπους που αναγνωρίζει και προσδένεται το αντίσωμα).

3.3.2.5 Προσθήκη 2^{ου} αντισώματος και εμφάνιση Western Blot

Με το πέρας του overnight, συλλέγουμε το πρώτο αντίσωμα και προχωρούμε σε πέντε, πεντάλεπτες, υπό ανάδευση πλύσεις της μεμβράνης με PBST 1x, που απομακρύνουν την περίσσεια αντισώματος για να μείνει στη μεμβράνη μόνο ό,τι έχει δέσει ειδικά (δηλαδή σε συγκεκριμένους επίτοπους που αναγνωρίζει και προσδένεται το αντίσωμα). Ακολουθεί προσθήκη με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι ειδικό έναντι κάποιων επιτόπων του πρώτου (συνήθως το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά σταθερές περιοχές επιτόπων IgG του πρωτογενούς αντισώματος και είναι ειδικό του ζώου από το οποίο έχει παραχθεί) και προσδεδεμένο με κατάλληλο προσδέτη (HRP), που επιτρέπει την ανίχνευσή του. Εν συνεχεία ακολουθεί:

- Υπό ανάδευση επώαση με το προαναφερθέν δεύτερο αντίσωμα σε R.T. για 60min.
- Απόχυση του δευτερογενούς αντισώματος.
- Τέσσερις πεντάλεπτες πλύσεις με PBST 1X.
- Τοποθέτηση της μεμβράνης σε γυάλινη επιφάνεια και επώασή της με διάλυμα των φωτοευαίσθητων ECLA και ECLB (1:1), για 3min σε σκοτάδι.
- Τοποθέτηση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης εντός πλαστικής διαφανούς μεμβράνης σε ειδική κασέτα που αποτρέπει τη διέλευση φωτός.
- Μεταφορά της κασέτας σε σκοτεινό θάλαμο εμφάνισης.
- Η διαδικασία περιλαμβάνει, την τοποθέτηση κατάλληλου μήκους film εντός τη κασετίνας και την επαφή του με τη μεμβράνη για τον απαιτούμενο χρόνο.

- Εξαγωγή του film από τη κασετίνα και εμβάπτισή του σε διάλυμα Developer υπό ανάδευση για περίπου 60sec.
- Πλύση του film ελαφρώς με H₂O και εμβάπτισή του σε διάλυμα Developer υπό ανάδευση για περίπου 60sec.
- Πλύση του film σε H₂O σ και εξέταση του αποτελέσματος της εμφάνισης.
Αν χρειάζεται , εκθέτουμε το film για διαφορετικό χρονικό διάστημα στη μεμβράνη, και επαναλαμβάνουμε τις παραπάνω διαδικασίες μέχρι να λάβουμε ικανοποιητικό αποτέλεσμα.

3.3.2.6 Απομόνωση ολικού RNA με Trizol

Το Trizol γενικά, είναι ένα φωτοευαίσθητο αντιδραστήριο που φυλάσσεται στους 4°C και χρησιμοποιείται στην απομόνωση του RNA, DNA και των πρωτεϊνών. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του ολικού RNA.

- Διαλυτοποίηση των δειγμάτων σε 0,5ml Trizol και επώαση 5min, σε RT.
- Προσθήκη 100μl CHCl₃ σε κάθε δείγμα, έντονη ανάδευση και επώαση 2-5min σε RT.
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15min, 4°C, 11.000rpm
- Σε νέα eppendorf, προσεκτική συλλογή της υδατικής φάσης, η οποία περιέχει το ολικό RNA (Σχηματισμός 3 φάσεων: Κάτω-Πρωτεΐνες/Λιπίδια, Μεσαία-DNA, Πάνω: RNA).
- Προσθήκη 250μl ισοπροπανόλης, καλή ανάδευση και επώαση για 5-10min σε RT.
- Φυγοκέντρηση για 10min, 4°C, 11.000rpm.
- Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος σε 1ml αιθανόλη 80%.
- Φυγοκέντρηση για 5min, 4°C, 8.000rpm.
- Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 15μl ddH₂O (extra clear) και αποθήκευση στους -80°C.

Για ποσοτικοποίηση των επιπέδων του ολικού RNA, ακολουθεί αραίωση 1μl RNA με 99μl ddH₂O, φωτομέτρηση στα 260nm και κανονικοποίηση στα 280nm.

3.3.2.7 Πέψη με DNάση

Για την απομάκρυνση του εναπομείναντος DNA που πιθανόν έχει παραμείνει στα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο RQ1 RNase-Free DNase (Promega), επιτυγχάνοντας με το σχηματισμό ελεύθερων 3' -OH άκρα, την αποικοδόμηση δίκλωνου αλλά και μονόκλωνου DNA: Κατά την αντίδραση, σε κάθε δείγμα πρέπει να υπάρχουν 2μg RNA. Εν συνεχεία, ακολουθεί:

- Προσθήκη στο κάθε δείγμα 1μl Reaction Buffer x10, 2μl DNase και ddH₂O για τελικό όγκο 10μl.
- Επώαση για 30min, στους 37°C.
- Προσθήκη 1μl RQ1 DNase Stop Solution προς τερματισμού της αντίδρασης.
- Θέρμανση για 10min, στους 65°C προς απενεργοποίηση της DNάσης.

3.3.2.8 Αντίστροφη Μεταγραφή (RT-PCR)

Η RT-PCR αποσκοπεί στην μετατροπή του RNA σε cDNA. Εδώ έγινε εφαρμογή του πρωτόκολλου SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) κινούμενοι ως εξής:

- Σε tube των 0,2ml, προσθήκη 1μl Random primers, 1μl dNTPs (mM), 2μg Total RNA, 12μl ddH₂O.
- Θέρμανση για 5 min, στους 65°C για 5 λεπτά και άμεση τοποθέτηση στον πάγο (chill on ice).
- Γρήγορο spin και επιστροφή των δειγμάτων στον πάγο.
- Προσθήκη 4 μl 5x First - Strand Buffer, 2μl DTT 1M και 1 μl RNaseOUT (40 μ/μl).
- Ήπια ανάδευση και επώαση για 2min σε RT.
- Προσθήκη 1μl από το ένζυμο SuperScript II RT, ανάδευση και επώαση για 10min σε RT.
- Θέρμανση στους 42°C για 50min κι έπειτα στους 70°C για 15min προς απενεργοποίηση της αντίδρασης.
- Αποθήκευση των νεοσχηματιζόμενων cDNA στους -20°C.

3.3.2.9 Real-Time PCR

Έγινε χρήση του πρωτόκολλου SYBR Select Master Mix (Applied Biosystem). Το Master Mix αποτελεί μίγμα AmpliTaq DNA πολυμεράσης (UP), SYBR GreenER χρωστικής, dNTPs, UDG ενζύμου και ρυθμιστικών διαλυμάτων. Συγκεκριμένα, κάθε tube γίνεται προσθήκη 10μl SYBR Green, 0,5μl εκκινητή F, 0,5μl εκκινητή R, 8μl ddH₂O και 1μl cDNA προς τελικό όγκο αντίδρασης 20μl.

Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και σχεδιάστηκαν από την ερευνητική μας ομάδα με τη βοήθεια του προγράμματος Primer3 Version 0.4.0, όπως αναλύεται σε παρακάτω ενότητα.

Μόριο	Αλληλουχία	Εταιρία
ERβ	F: GCATGACAGATTCTACCACTCC R: AAGATGTAGAGCGGGCCTTT	Invitrogen
ERα	F: TGATCCTACCAGACCCTTCAGT R: CCAATCATCAGGATCTCTAGCC	Invitrogen
Bcl-2	F: GATTGTGGCCTTCTTTGAGTTC R: AGTCTTCAGAGACAGCCAGGAG	Invitrogen
GAPDH	F: CATGAGAAGTATGACAACAGCCT R: AGTCCTTCCACGATACCAAAGT	Invitrogen

Το θερμικό προφίλ που ακολουθείται έχει ως εξής:

UDG Activation	1 κύκλος	2 min, 52°C
AmpliTaq Fast DNA Polymerase Activation	1 κύκλος	2 min, 95°C

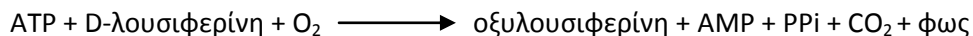
Denature	40 κύκλοι	15 sec, 95°C
Anneal / Extend		15 sec, 55°C 1 min, 72°C
Dissociation step	1 κύκλος	1 min, 95°C 30 sec, 55°C

Μελετήθηκαν τα επίπεδα mRNA των μορίων ERa, ERb, Bcl-2 και GAPDH ενώ η τελευταία χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Προς ελαχιστοποίηση σφαλμάτων, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε triplicates. Για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών στην αντίδραση συμπεριλήφθηκε αρνητικό control, NTC (No Template Control), δηλαδή αντίδραση που στερούνταν δείγματος cDNA.

3.3.2.10 Μέτρηση ενδοκυττάριου ATP με αντιδραστήριο Λουσιφερίνης-Λουσιφεράσης

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

Λουσιφεράση



Δεδομένου ότι το αντιδραστήριο δεν περιέχει ATP, το ένζυμο χρησιμοποιεί το κυτταρικό ATP για να καταλύσει την αντίδραση, με αποτέλεσμα η ένταση του φωτός να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ATP. Η παραγόμενη βιοφωταύγεια (φως) προσδιορίζεται μετά από μέτρηση των δειγμάτων σε λουμινόμετρο (Berthold Technologies, Lumat LB 9508) και εκφράζεται σε μονάδες RLU. Η παρακάτω πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται στον πάγο, προς αποφυγή υδρόλυσης του ATP και έχει ως εξής:

- Λύση του κυτταρικού εκχυλίσματος με προσθήκη 50-70μl lysis buffer και επώαση για 15min στον πάγο.
- Συλλογή 10μl προς κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω της μεθόδου Bradford.
- Προσθήκη ψυχρού TCA 2% σε όγκο 1:1, ώστε η τελική συγκέντρωση του TCA σε κάθε δείγμα να είναι 1% και επώαση για 15min στον πάγο.
- Φυγοκέντρηση για 15min, 4°C, 12.000rpm.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf και προσθήκη 1M Tris pH=8 σε αναλογία 1:1, προς εξουδετέρωση των διαλυμάτων.
- Ετοιμασία δοκιμαστικών σωλήνων, τόσοι όσοι ο αριθμός των δειγμάτων και επιπλέον ένας που θα χρησιμεύσει ως control.
- Προσθήκη 46μl ddH₂O, 4μl δείγματος και 50μl αντιδραστήριου Enliten ώστε V_{τελ} = 100μl.

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

3.3.2.11 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Πραγματοποιήθηκε PCR για τον έλεγχο της καθαρότητας των κυτταρικών σειρών. Τα δείγματα περιλαμβάνουν αρνητικό control (το οποίο στερούταν DNA), θετικό control (το οποίο περιείχε DNA μολυσμένης κυτταρικής σειράς) και δείγματα DNA από τις κυτταρικές σειρές. Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούν 2 erpendorfs, όπου το ένα στο mix της αντίδρασης περιλαμβάνει εκκινητές για το μυκόπλασμα και το άλλο εκκινητές ακτίνης για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

Μόριο	Αλληλουχία	Εταιρεία
μυκόπλασμα	F:GAAAGYGTGGGGAGCAAAYAGGATTAGATA R:CCRTGCACCACTGTCWHHHHBGWWAACCTC	Invitrogen
ακτίνη	F: GGAGCAATGATCTTGATCTT R:CGTTCGTCCGCATGGAGTCCT	Invitrogen

Το δείγματα παρασκευάζονται ως εξής:

Συστατικό	Όγκος	Τελική C
10x PCR buffer minus Mg	10 μl	1x
10 mM dNTPs mixture	2 μl	0,2 mM (έκαστο)
50 mM MgCl₂	3 μl	1,5 mM
Primer mix (10 μM έκαστο)	5 μl	0,5 μM
Taq DNA polymerase (5U/μl)	0,2-0,5 μl	1-2,5 units
Template DNA	1-10 μl	-
ddH₂O	έως τα 100 μl	-

Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 35 κύκλους σύμφωνα με το ακόλουθο θερμικό προφίλ:

Denature	94°C	45 sec
Anneal	55°C	30 sec
Extend	72°C	1 min 30 sec

Τα δείγματα είτε διατηρούνται στους 4°C, είτε ηλεκτροφορούνται σε gel αγαρόζης περιεκτικότητας 1-2% w/v, κατά την δημιουργία του οποίου προστίθεται χρωστική midori green προς παρακολούθηση

του μετώπου της ηλεκτροφόρησης. Τα προϊόντα της PCR φορτώνονται στο gel αγαρόζης, αφού ομογενοποιηθούν με DNA loading buffer (stock 6x) ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1x. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης γεμίζεται με TAE 1x και το τροφοδοτικό ρυθίζεται στα 100V.

3.3.2.12 Σχεδίαση εκκινητών για PCR και Real-Time PCR

Από την ηλεκτρονική βάση δεδομένων PubMed του NCBI εντοπίζεται η πλήρης αλληλουχία του cDNA του γονιδίου που μας ενδιαφέρει και με το πρόγραμμα Primer3 Version 0.4.0, σχεδιάζονται τα ζεύγη των εκκινητών. Προκειμένου να εξακριβωθεί η μοναδικότητα και η ειδικότητα των αλληλουχιών κάνουμε “nucleotide BLAST” (Blastn), με σκοπό τη διερεύνηση πιθανής συμπληρωματικότητας των αλληλουχιών που μας ενδιαφέρουν σε όλο το γονιδίωμα του υπό μελέτη οργανισμού *homo sapiens sapiens*. Εφόσον οι αλληλουχίες των εκκινητών πληρούν τα απαραίτητα κριτήρια, μέσω του προγράμματος Multiple Primer Analyzer της εταιρίας ThermoFisher, ελέγχεται αν οι δύο αλληλουχίες του ζεύγους εκκινητών σχηματίζουν ετεροδιμερή ή ομοδιμερή.

3.3.2.13 Μιτοχονδριακή Κλασμάτωση

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

- Αφαίρεση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.
- 1-2 εκπλύσεις με PBS 1x.
- Προσθήκη 8ml ομογενοποίησης (BufferA). Για κάθε 1 ml του BufferA που χρησιμοποιείται, προστίθενται 10 μl Protease Inhibitors, 2μl DTT και 0,5 μl PMSF.
- Συλλογή με το διάλυμα αυτό, και απόχυση σε ειδικό φιαλίδιο του Potter Elvehjem ομογενοποιητή.
- Ομογενοποίηση στα 2000rpm, όπου εφαρμόζονται 2 σετ των 10 φορών πάνω-κάτω με μεσοδιάστημα 1min.
- Συλλογή του κυτταρικού ελαιώματος και φυγοκεντρώμε για 5 λεπτά στα 2500 rpm, στους 4°C, προς απομάκρυνση πυρήνων, κυτταρικών μεμβρανών και άσπαστων κυττάρων.
- Φυγοκέντρηση του υπερκείμενου για 20min, 12000 rpm, 4°C (Το ίζημα περιέχει μιτοχόνδρια, λυσοσώματα κι ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ στο υπερκείμενο έχουν απομείνει χαμηλότερου μοριακού βάρους οργανίδια).
- Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε BufferB.

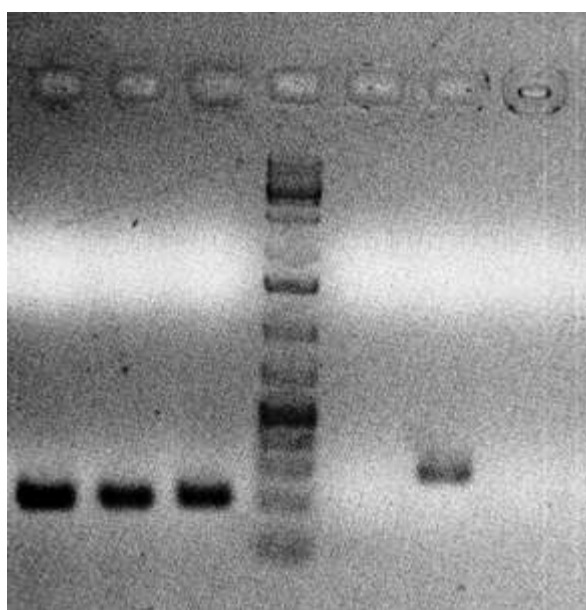
Η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές και το ίζημα που απομένει αποτελεί το μιτοχονδριακό κλάσμα και φυλάσσεται στους -80 °C. Το υπερκείμενο της δεύτερης φυγοκεντρήσης (12000 rpm) αποτελούσε το μετα-μιτοχονδριακό κλάσμα, το post-mitochondrial (PM) και αποτελούνταν από κυτταρόπλασμα και κυτταρικά οργανίδια. Ότι απομένει στο φιαλίδιο της

ομογενοποίησης, αποτελεί το total extract που περιέχει κυτταρικά οργανίδια, κυτταρόπλασμα, μεμβράνες και άσπαστα κύτταρα.

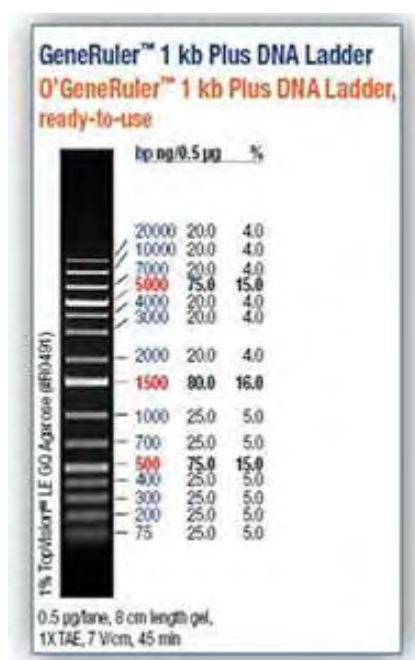
4. Αποτελέσματα

4.1 Έλεγχος Καθαρότητας της κυτταρικής σειράς SY-SY5Y

Σημαντικό για τις πειραματικές διεργασίες αλλά και για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων ο έλεγχος της καθαρότητας της κυτταρικής σειράς που χρησιμοποιήθηκε. Έτσι, εφαρμόζεται μέθοδος PCR με χρήση ειδικών εκκινήτων, σε απομονωμένο DNA από τη κυτταρική σειρά SY-SY5Y. Εφαρμόζοντας πρωτόκολλο που περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα, λάβαμε την εξής εικόνα:



-C(actin) +C(actin) SH(actin) -C +C SH

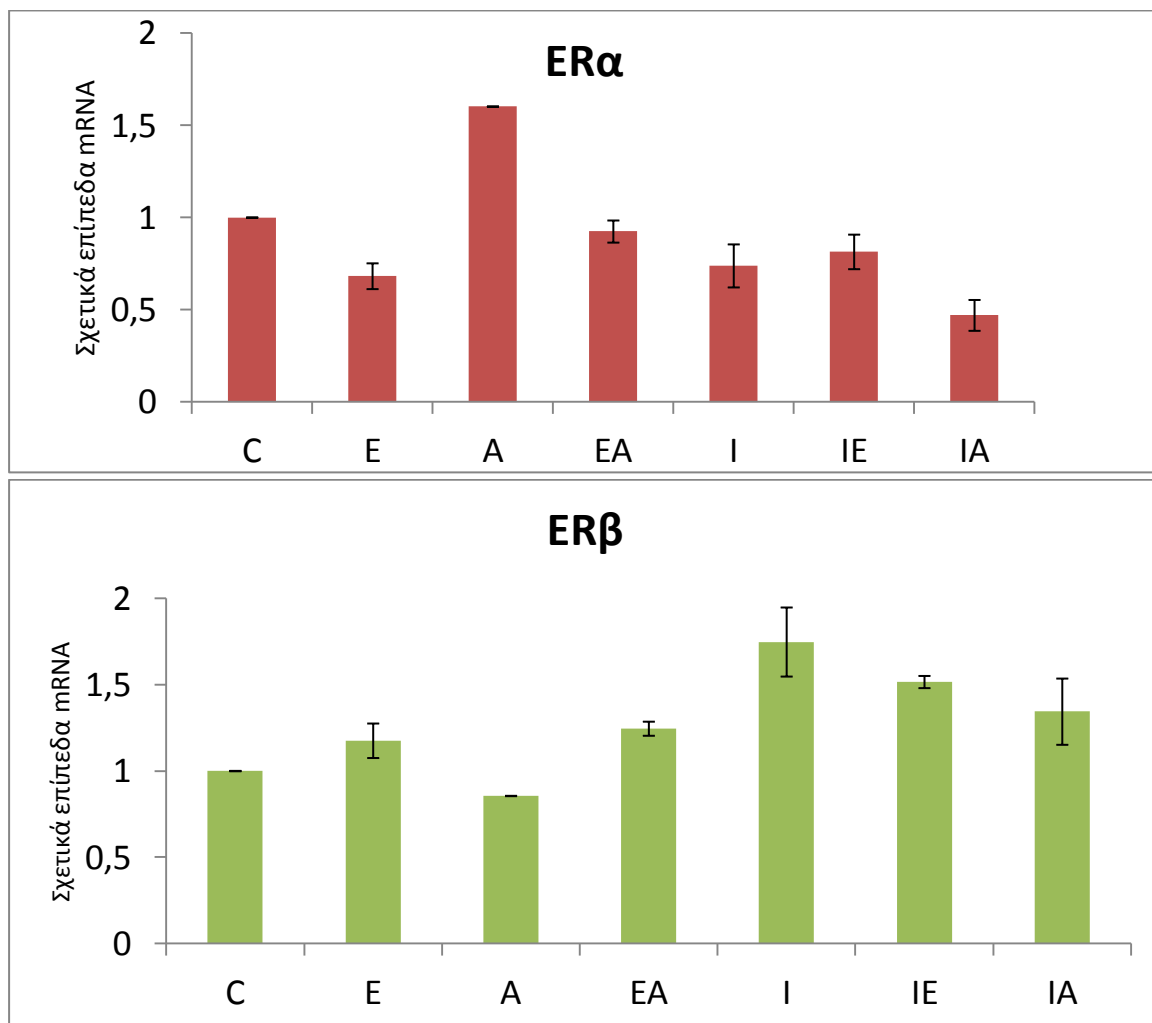


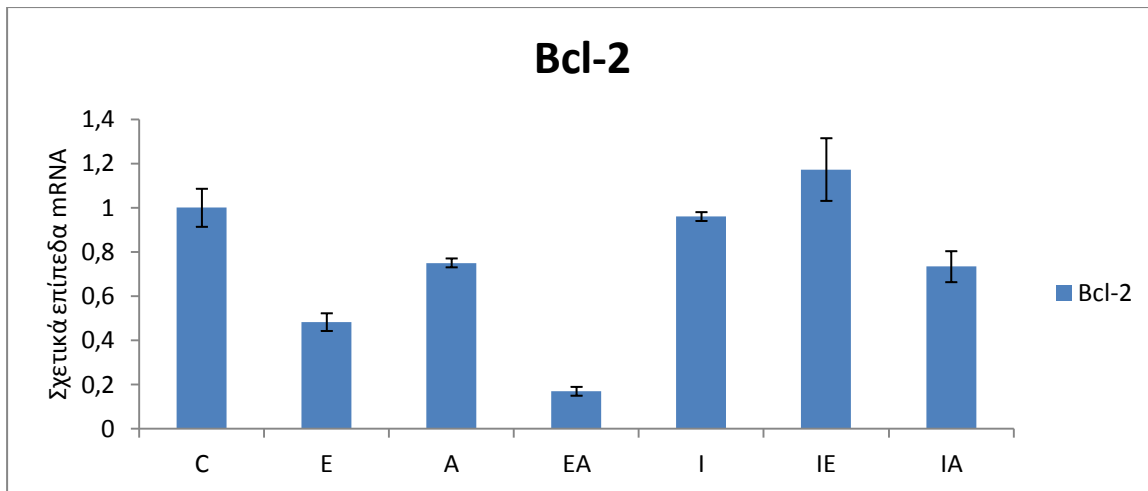
Σχήμα 1. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για ενίσχυση ακτίνης και μυκοπλάσματος στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y.

Το προϊόν της PCR του μυκοπλάσματος έχει μέγεθος περίπου 434-468 bp. Τα προϊόντα της PCR του δειγματος SH-SY5Y δεν παρουσιάζουν ζώνη DNA στο μέγεθος των βάσεων που παρουσιάζει το θετικό control και η σειρά στερείται μυκοπλάσματος. Τέλος, όλες οι κυτταρικές σειρές εμφανίζουν προϊόν στην αντίδραση ενίσχυσης της ακτίνης, συνεπώς η απομόνωση DNA ολοκληρώθηκε σωστά και το αποτέλεσμα της PCR θεωρείται αξιόπιστο.

4.2. Ποσοτική εκτίμηση της δράσης του ACH των επιπέδων mRNA των οιστρογονικών υποδοχέων και του Bcl-2 στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y

Η καλλιέργεια ξεκίνησε στρώνοντας 300.000 κύτταρα/well και μετά από 48h έγινε προσθήκη ουσιών όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα. Δεδομένου του ότι θα διερευνούταν επίπεδα μεταγράφων, η συγκομιδή των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με το πέρας δύο ωρών. Μετά την απομόνωση ολικού RNA, ακολούθησε πέψη με DNάση και εφαρμόστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Σε κάθε περίπτωση έγιναν 3 επαναλήψεις και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στο σχήμα 2:



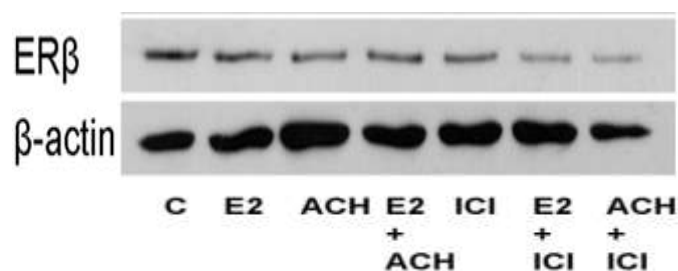


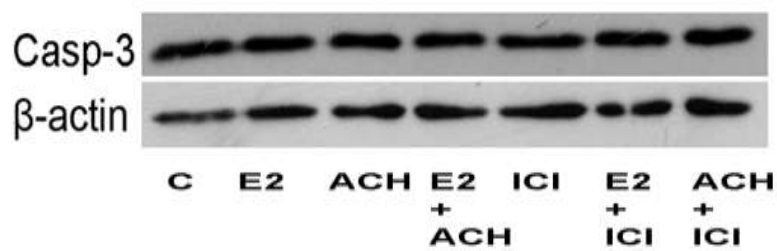
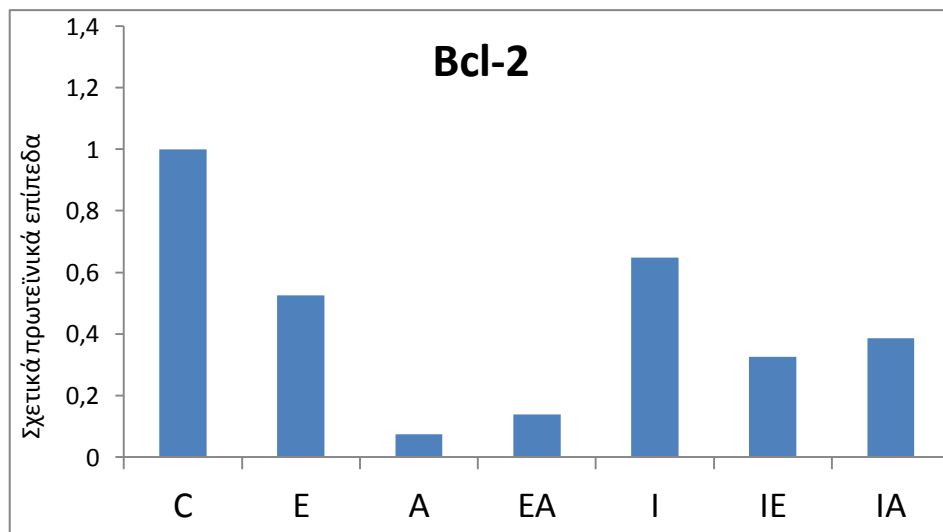
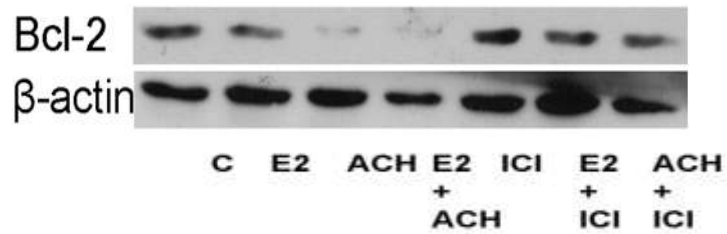
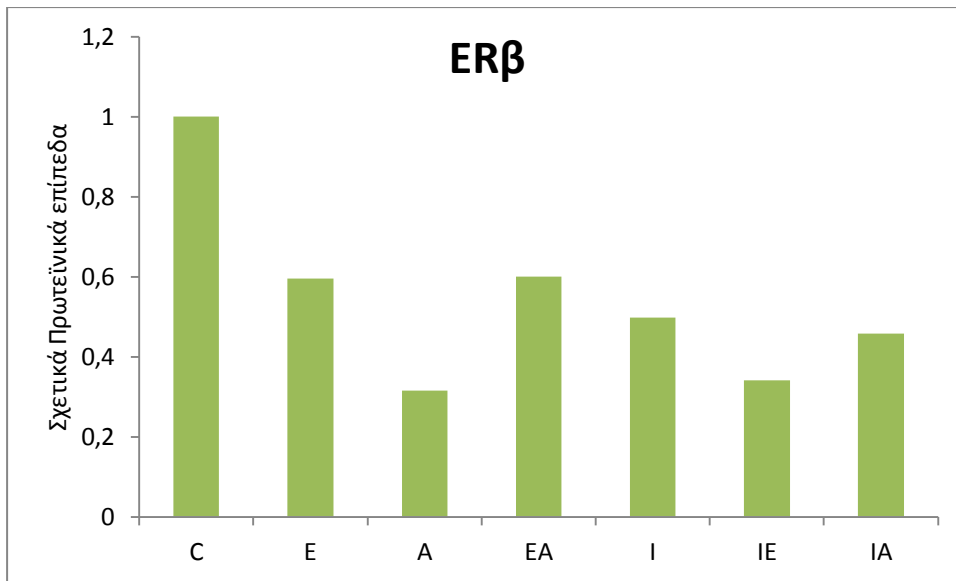
Σχήμα.2. Διερεύνηση των επιπέδων mRNA του ERα, του ERβ και του Bcl-2 στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y.

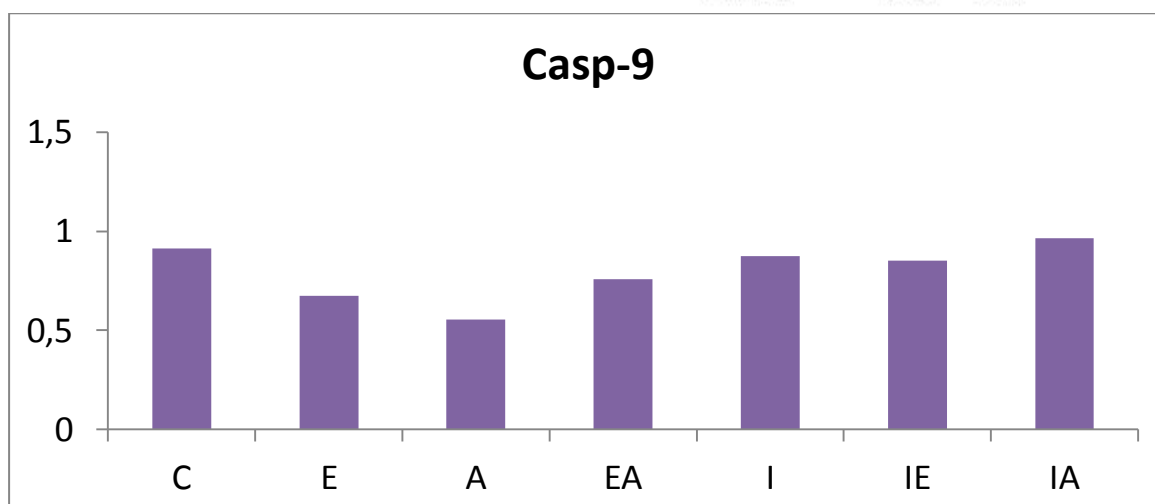
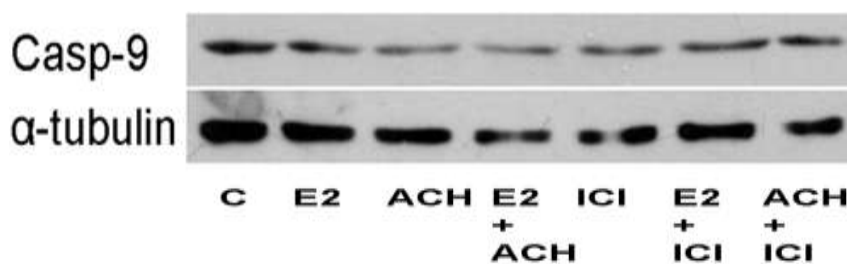
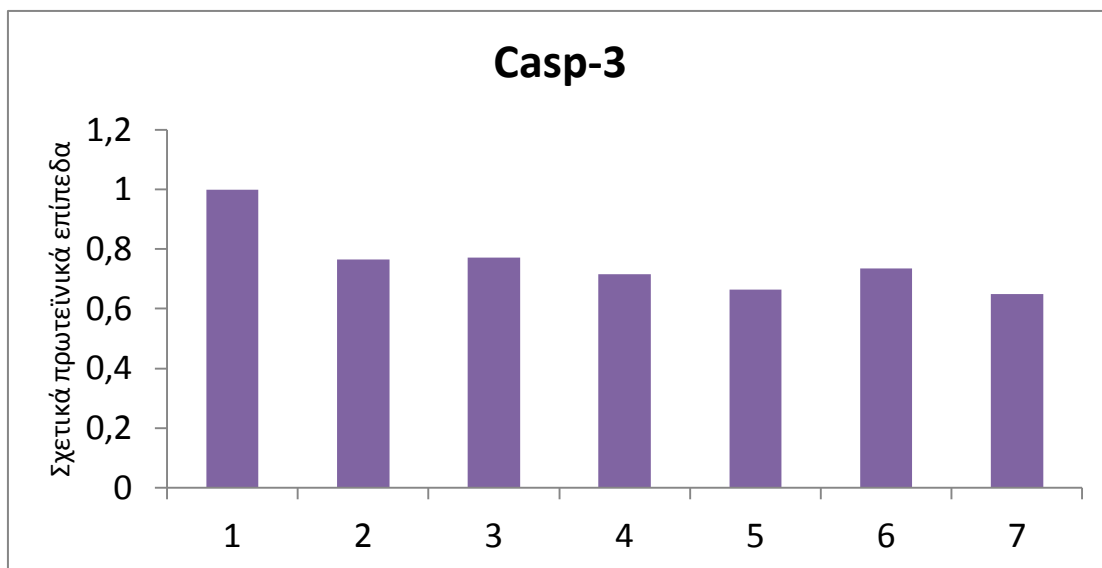
Στο Σχήμα 2, από τα δύο πρώτα διαγράμματα παρατηρείται διαφορετική έκφραση των δύο υποτύπων οιστρογονικών υποδοχέων, Υπό τις ίδιες συνθήκες του πειράματος, παρουσία ACH τα επίπεδα mRNA του ERα μειώνονται, ενώ του ERβ αυξάνονται σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA στα κύτταρα μάρτυρες. Οι παρατηρήσεις αυτές έρχονται σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα από αντίστοιχα πειράματα στην κυτταρική σειρά MCF-7, η οποία προέρχεται από τον καρκίνο του μαστού. Στο τρίτο διάγραμμα του σχήματος 2, παρατηρείται μείωση των μεταγραφικών επιπέδων του Bcl-2, παρουσία E2, ACH και συνδιασμού αυτών. Αντίθετα, μικρή αύξηση παρατηρείται συνδιασμού του ICI με E2 ή ACH. Η παρουσία του ICI, δε φαίνεται να επιφέρει διαφοροποίηση στα επίπεδα RNA του Bcl-2.

4.3. Ποσοτική και Ποιοτική των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ, του BCL-2, της CAS-9 και της CAS-3 στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y

Για τις 7 διαφορετικές συνθήκες (C, E,A, EA, I, IE, IA,) χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία των 60 mm ενώ τη Day0 στρώθηκαν 4×10^5 cells/plate. Μετά από 48h πραγματοποιήθηκε προσθήκη ουσιών με 10^{-9} M E2, ACH 10^{-4} M, ICI 10^{-7} M και συνδιασμού αυτών, σε ειδικό υλικό ανάπτυξης των κυττάρων απουσία ορμονών. Κυτταρικά εκχυλίσματα ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE), μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και εξετάστηκε η παρουσία και οι διακυμάνσεις στην έκφραση των παρακάτω μορίων.





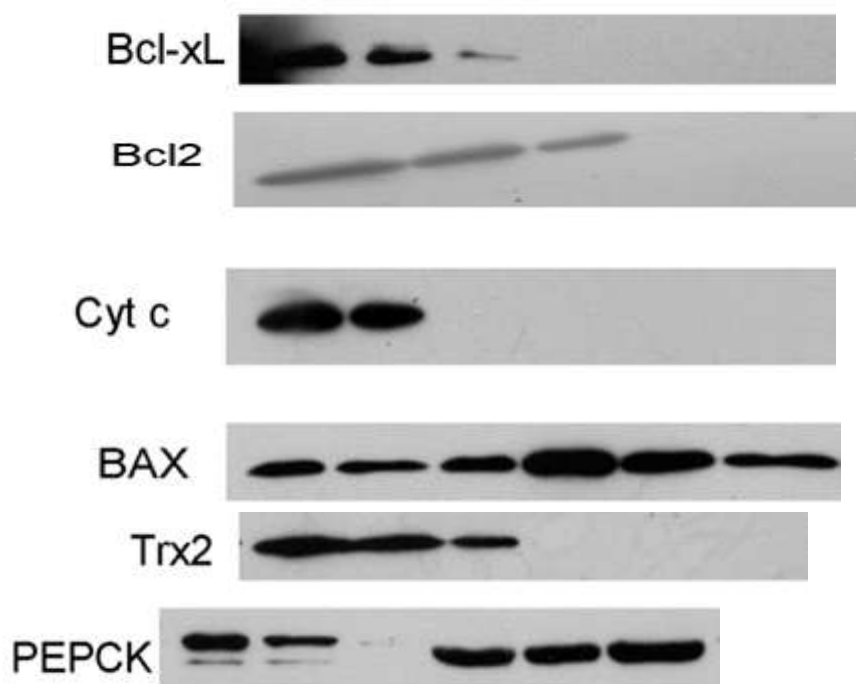


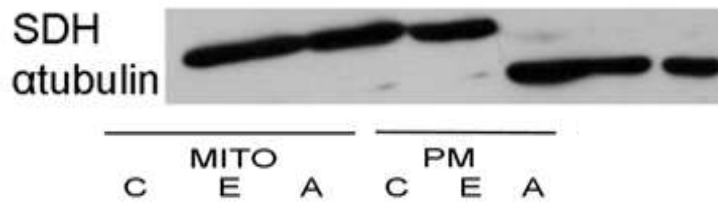
Σχήμα 3. Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης των μορίων: *ERβ*, *Bcl-2*, *Casp-3*, *Casp-9*, στη σειρά *SH-SY5Y*. **Αριστερά.** Στύλωμα κατά Western (βλ. κείμενο). **Δεξιά.** Απεικόνιση της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων ως προς τα επίπεδα έκφρασης της β-ακτίνης και α-τουμπουλίνης.

Από το πρώτο διάγραμμα του σχήματος 3, παρατηρείται μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ, υπό όλες τις συνθήκες που εφαρμόζουμε, με την πιο εμφανή να προκύπτει από την παρουσία του υδροξυ-χλωριούχου αργιλίου. Ομοίως παρατηρούμε και για την Bcl-2, στο δεύτερο διάγραμμα με τις εμφανέστερες μειώσεις να εμφανίζονται τόσο παρουσία ACH, όσο και συνδιασμού του με την E2. Τα επίπεδα της προκασπάσης-9, στο τρίτο κατά σειρά διάγραμμα, εμφανίζουν μείωση μόνο παρουσία μεμονωμένων E2 και ACH. Τέλος, στο τελευταίο διάγραμμα, πέρα από μια μικρή μείωση συγκριτικά με το Control, των επιπέδων της προκασπάσης-3 σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν.

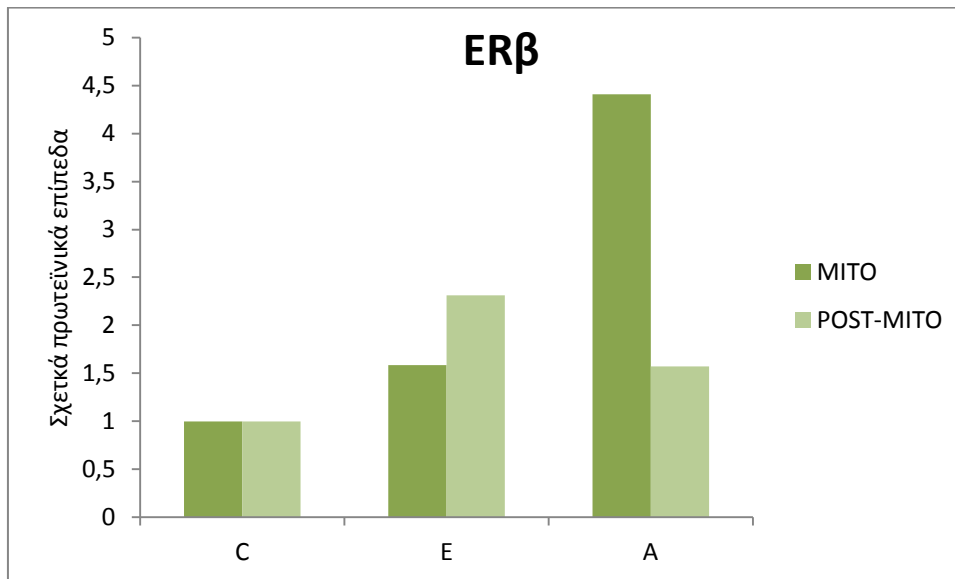
4.4 Μελέτη της δράσης του αργιλίου στα επίπεδα μορίων μιτοχονδριακών και κυτοσολικών κλασμάτων της σειράς SH-SY5Y

Η περαιτέρω εξέταση της πιθανής οιστρογονικής δράσης του ACH στο μιτοχόνδριο, οδήγησε στην πραγματοποίηση υποκυτταρικής κλασμάτωσης. Προς συλλογή ικανοποιητικής ποσότητας μιτοχονδριακού κλάσματος, τη Day0 οι καλλιέργειες πραγματοποιούνται σε 6 τρυβλία των 150×20 mm στρώνοντας 1×10^6 κύτταρα/ τρυβλίο. Μετά από 48h και αφού τα τρυβλία είναι 50% confluent, επωάζονται για άλλες 48h, με ουσίες διαλυμένες σε 20ml θρεπτικό, ως περιγράφηκε στην αντίστοιχη ενότητα. Ακολουθεί η διαδικασία της κλασμάτωσης και στη συνέχεια περαιτέρω μελέτη από το μεταπτυχιακό φοιτητή Γιάννη Τσιάλτα, εφαρμόζοντας τη μέθοδο ηλεκτροφόρησης υπό αποδιατακτικές συνθήκες, και Western blot ανάλυση με χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων έναντι των υπό εξέταση μορίων. Κατά την SDS-PAGE παρασκευάστηκαν πηκτές περιεκτικότητας ακρυλαμίδιου 10% και 12% για τον εντοπισμό μέσου μοριακού βάρους και μικρού μοριακού βάρους μορίων αντίστοιχα. Μελετήθηκαν τα επίπεδα του ERβ αλλά και μορίων που σχετίζονται άμεσα με προ- και αντι- αποπτωτικούς μηχανισμούς όπως είναι η Bcl-2, το Bcl-xL, το Bax και το Cyt-C, τόσο σε μιτοχονδριακά όσο και σε κυτταρικά εκχυλίσματα.

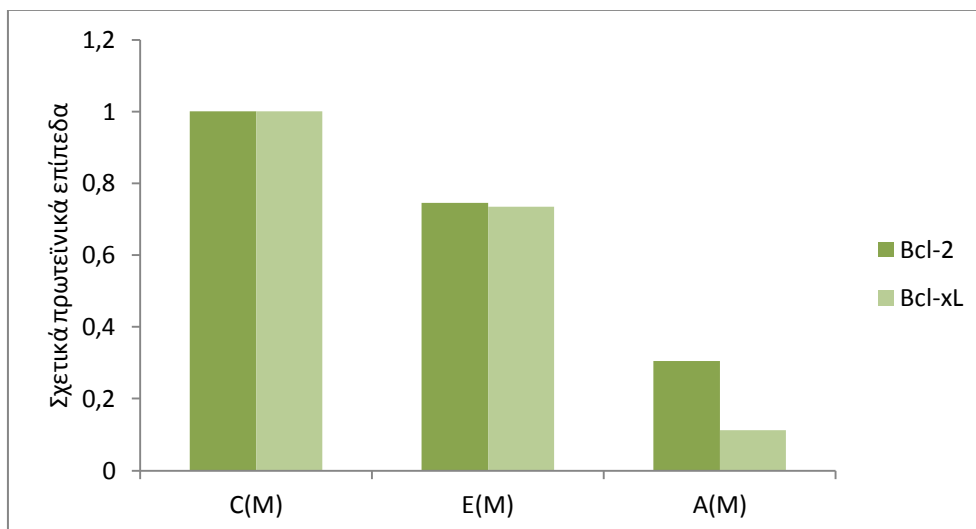




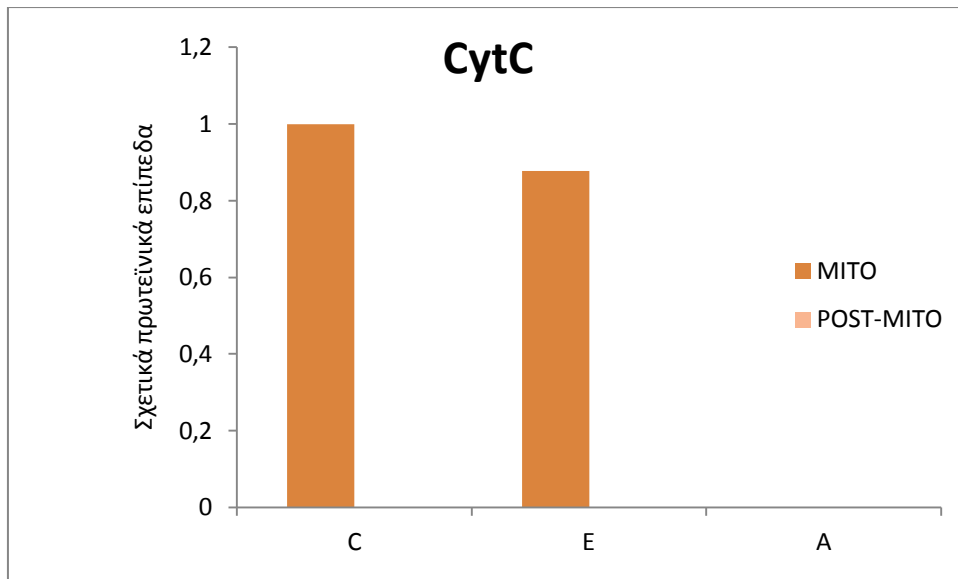
Σχήμα 4. Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, των προς μελέτη μορίων, σε μιτοχονδριακά (MITO) και κυτταροπλασματικά (POST-MITO) κλάσματα.



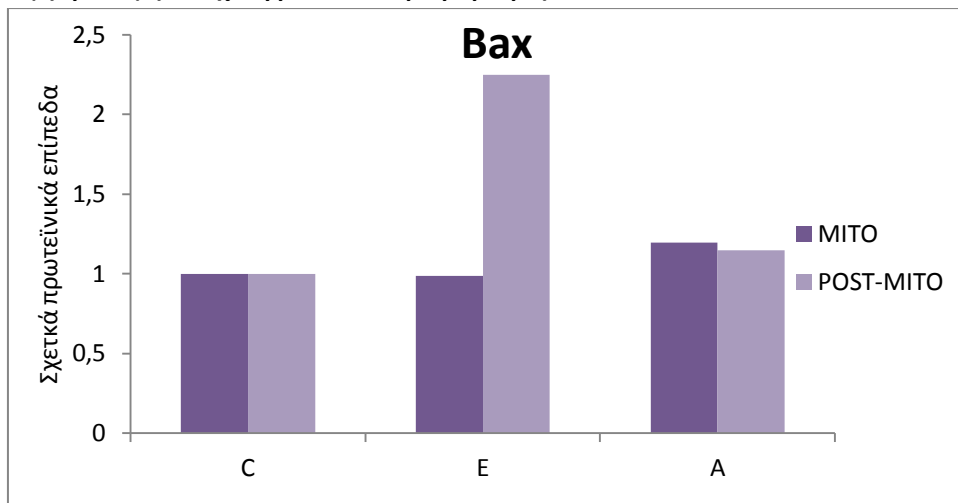
Σχήμα 5. Σχηματική αναπαράσταση της ποσοτικής ανάλυσης των επιπέδων έκφρασης του ERβ σε μιτοχονδριακά και κυτταροπλασματικά κλάσματα της σειράς SH-SY5Y παρουσία E2(E) και ACH (A) σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα σε κύτταρα μάρτυρες (C).



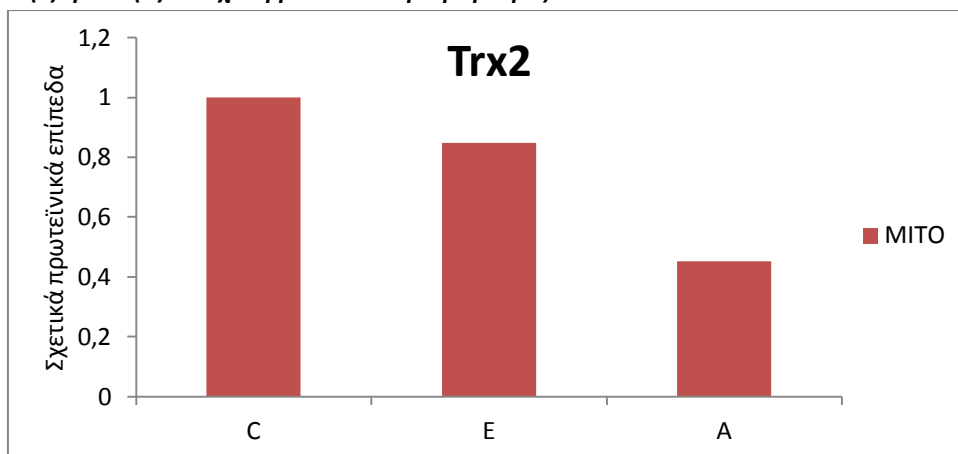
Σχήμα 6. Σχηματική αναπαράσταση των σχετικών επιπέδων έκφρασης αντι-αποπτωτικών μορίων παρουσία E2(E) ή ACH(A) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.



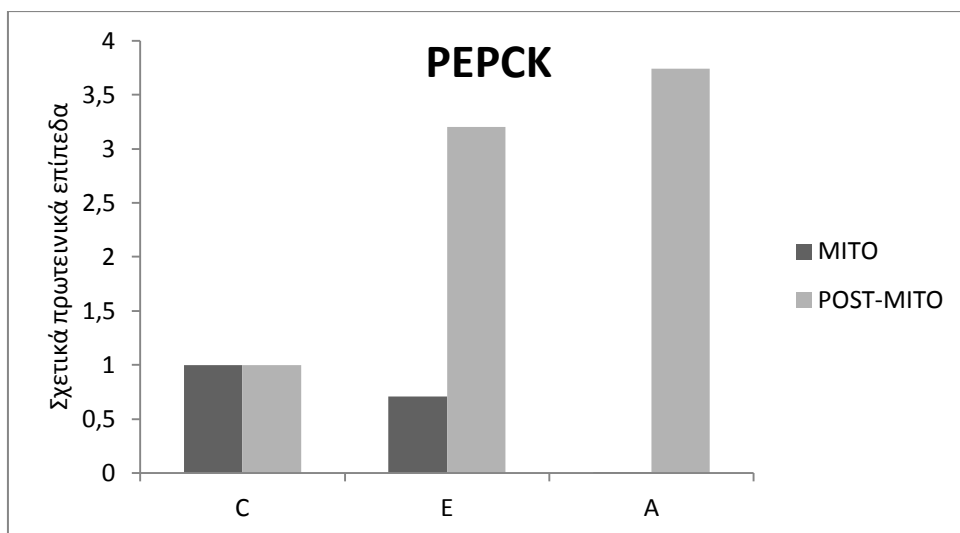
Σχήμα 7. Σχηματική αναπαράσταση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του CytC παρουσία E2(E) ή ACH(A) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.



Σχήμα 8. Σχηματική αναπαράσταση των σχετικών επιπέδων έκφρασης του Bax παρουσία E2(E) ή ACH(A) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.



Σχήμα 9. Σχηματική αναπαράσταση των σχετικών επιπέδων έκφρασης της Trx2 παρουσία E2(E) ή ACH(A) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.



Σχήμα 10. Σχηματική αναπαράσταση των σχετικών επιπέδων έκφρασης της PEPCK παρουσία E2(E) ή ACH(A) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.

Στο Σχήμα 5, παρατηρείται στα μιτοχονδριακά κλάσματα, μια αύξηση του ERβ παρουσία ACH, ενώ όσο αφορά το κυτταρόπλασμα εμφανίζεται αύξηση του ERβ με την προσθήκη E2. Μελετώντας την επίδραση του ACH σε μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, στο Σχήμα 6, παρατηρούμε μειωμένα τα επίπεδα των αντι-αποπτωτικών Bcl-2 και Bcl-xL σε σχέση με το C, με τη μεγαλύτερη μείωση να εκδηλώνεται παρουσία υδροξυ-χλωριούχου αργιλίου. Αντίστοιχα, στο Σχήμα 8, τα μιτοχονδριακά επίπεδα της προ-αποπτωτικής Bax εμφανίζονται ελαφρώς αυξημένα παρουσία ACH, ενώ τα κυτταροπλασματικά επίπεδα της ίδιας, παρουσιάζουν εμφανή αύξηση παρουσία E2. Στο Σχήμα 8, τα επίπεδα του Cyt-c στο μιτοχόνδριο, μηδενίζονται υπό την παρουσία ACH. Το Σχήμα 9, παρουσιάζει σχετική πτώση των μιτοχονδριακών επιπέδων της Trx-2 υπό τις εξεταζόμενες συνθήκες, με τη μεγαλύτερη να εμφανίζεται παρουσία επίσης ACH. Αντίστοιχα, κατακόρυφη πτώση παρουσιάζουν και τα μιτοχονδριακά επίπεδα της PEPCK υπό την επίδραση του υδροξυ-χλωριούχου αργιλίου, ενώ αυξάνονται τα κυτταροπλασματικά παρουσία τόσο E2 όσο και του ACH.

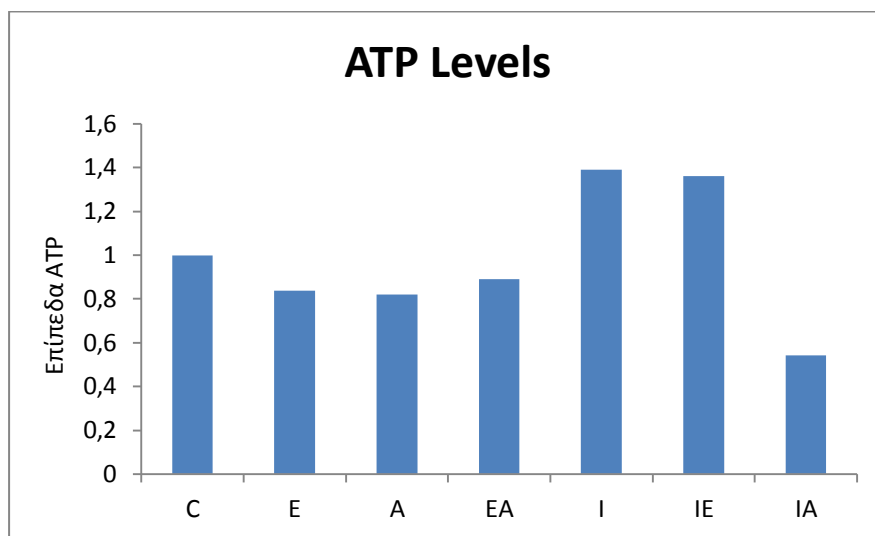
4.5 Επίδραση του Υδροξυ-Χλωριούχου Αργιλίου στα ολικά κυτταρικά επίπεδα ATP της σειράς SH-SY5Y

Για τη δοκιμαστική μέτρηση των ολικών κυτταρικών επιπέδων του ATP στη σειρά SH-SY5Y προχωρήσαμε στην παρακάτω διαδικασία έχοντας μετά από την κυτταροκαλλιέργεια, και 12 ώρες μετά την προσθήκη ουσιών harvest ίσο αριθμό κυττάρων σε μορφή ιζήματος, που προέκυψαν μετά από φυγοκέντρηση στα 1500rpm, για 5min, RT. Η μέτρηση του ATP ακολουθεί άμεσα μετά τη συγκομιδή των κυττάρων και έχει ως εξής:

- Λύση του κυτταρικού εκχυλίσματος με Tris 20mM pH=8, στο οποίο προστέθηκαν PMSF, DTT, protease inhibitors και ddH₂O.
- Επώαση 10-15min στον πάγο sonication (2x, 40%).
- Φυγοκέντρηση για 10min, στους 4oC υπό 12.000rpm.
- Προσθήκη στο υπερκείμενο ίσου όγκου TCA 2%, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1%.
- Φυγοκέντρηση για 10min, στους 4oC υπό 12.000rpm.

- Προσθήκη στο υπερκείμενο ίσου όγκου Tris 1M pH=8, προς εξουδετέρωση, του τελικού δμ προς μέτρηση.

Από τη μέτρηση των δειγμάτων στο λουμινόμετρο (ως περιγράφηκε παραπάνω).



Σχήμα 11. Μέτρηση κυτταροπλασματικού ATP στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y.

Παρατηρούμε στο σχήμα 11, ότι συγκριτικά με το control, μειώνονται τα κυτταροπλασματικά επίπεδα του ATP, παρουσία οιστραδιόλης, υδροξυχλωριούχου αργιλίου και συνδιασμού αυτών. Αντίθετα, ο αναστολέας ICI μόνος του ή συνδιαστικά με E2 επιφέρει αύξηση. Η συμπαρουσία του ACH και του αναστολέα, μειώνει αρκετά το ενδοκυττάριο ATP.

6. Συζήτηση

Ο υποδοχέας των οιστρογόνων ανήκει στην κατηγορία των υποδοχένων 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, ERα και ERβ, οι οποίες και φαίνεται να έχουν αντίθετες δράσεις (Hodges-Gallagher et al. 2008). Ο ρόλος της οιστρογονικής σηματοδότησης έχει φανεί να είναι καίριος και κατά την παθογένεση ορισμένων μορφών καρκίνου αλλά και άλλων διαταραχών μεταξύ των οποίων και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Κατά την μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε κατά την εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας, έλαβαν χώρα μία σειρά πειραμάτων που είχαν ως σκοπό τη διερεύνηση της οιστρογονικής δράσης αλάτων αργιλίου (ACH), σε νευρικά κύτταρα και συγκεκριμένα στην ανθρώπινη νευρική κυτταρική σειρά SH-SY5Y.

Έχοντας, την πληροφορία της ύπαρξης του ERβ στα υπό μελέτη νευρικά κύτταρα, η μελέτη, στο πρώτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας, ξεκίνησε χρησιμοποιώντας ανοσοαποτύπωση κατά Western και εξακρίβώθηκε μείωση των επιπέδων του συγκεκριμένου υποτύπου παρουσία, υδροξυ-χλωριούχου αργιλίου, ενός παράγοντα που έχει προταθεί ότι κατατάσσεται στα ξενοοιστρογόνα και πιο συγκεκριμένα στα μεταλλοοιστρογόνα. Τα άλατα του υδροξυχλωριούχου, που έχουν ήδη συσχετιστεί με την παθογένεση του καρκίνου του μαστού μέσω της εμπλοκής τους στην οιστρογονική

σηματοδότηση, φαίνεται να διευρύνουν την κυτταροτοξική τους δράση και σε άλλους ιστούς, όπως είναι το ΚΝΣ. Έτσι, συσχετίζονται συχνά με την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι η νόσος του Alzheimer (Maya et al, 2016 and Darbre, 2006).

Δεδομένου του βιβλιογραφικού όγκου, που αποδεικνύει την νευροπροστατευτική της δράση της 17-β οιστραδιόλης μέσω ρύθμισης αποπτωτικών, αντι-οξειδωτικών, και αντι-φλεγμονόδων μηχανισμών, εξετάζεται σε δεύτερο χρόνο και στην ίδια κυτταρική σειρά, αν η παρατηρηθείσα μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ, παρουσία υδροξυ-χλωριούχου αργιλίου, θα επηρεάσει τους προαναφερθέντες μηχανισμούς.

Συγκεκριμένα, περνώντας στο κυρίως αντικείμενο της εργασίας, έγινε η μελέτη της δράσης της οιστραδιόλης (E2), συγκριτικά με το ACH, τόσο παρουσία όσο και απουσία του τεχνητού αναστολέα του υποδοχέα των οιστρογόνων ICI 182,780. Στο σύνολό τους όλες οι διαδικασίες εξέτασης της οιστρογονικής δράσης έγιναν ύστερα από καλλιέργεια και επώαση των κυττάρων με τις εν λόγω ουσίες για διάστημα τριών ημερών. Στη συνέχεια, έλαβε χώρα μελέτη μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, όπου παρατηρήθηκαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα.

Με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης Western εξετάστηκε η επίδραση E2, ACH και ICI, και συνδιασμού αυτών, στα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των εξής μορίων: ERβ, Bcl-2, Casp-9, Casp-3 και β-ακτίνης (για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων) σε νευρικά κύτταρα SH-SY5Y. Για την καλύτερη και εγκυρότερη επεξήγηση των αποτελεσμάτων, έγινε και σχετική ποσοτικοποίηση των μπαντών από τις εμφανίσεις με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος ποσοτικοποίησης. Αυτό που ως κύριο συμπέρασμα βγαίνει από τα περισσότερα διαγράμματα (βλ. αποτελέσματα), είναι ότι το ACH πιθανότατα επηρεάζει αποπτωτικούς μηχανισμούς δεδομένου ότι παρουσία αυτού, εμφανίζεται μείωση της αντι-αποπτωτικής (νευροπροστατευτικής) Bcl-2 και της proCasp-9. Μικρές μεταβολές στα επίπεδα της Casp-3, , υποδηλώνουν ίσως ότι η κυτταροτοξική δράση του ACH, υπό τις συνθήκες του πειράματος, δεν έχει φτάσει στο στάδιο ενεργοποίησης της προκάσπάσης-3, η οποία ενεργοποιείται πρωτεολυτικά σε επόμενο στάδιο της σηματοδότησης.

Τα ποτελέσματα αυτής της μελέτης επαληθεύθηκαν και σε επίπεδο ελέγχου του mRNA, διερευνώντας έτσι την πιθανή επίδραση του ACH στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων που κωδικοποιούν τόσο τους υποδοχείς, όσο και μόρια στόχους αυτών. Έτσι, κάτω από τις ίδιες συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας, με εξαίρεση τη συγκομιδή των κυττάρων 3 ώρες μετά την προσθήκη ουσιών, πραγματοποιείται απομόνωση του ολικού RNA της σειράς SH-SY5Y και πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολών στα μεταγραφικά επίπεδα των ERα, ERβ και της αντι-αποπτωτικής Bcl-2.

Ομοίως με τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western τα επίπεδα mRNA του ERβ, παρουσιάζονται μειωμένα παρουσία ACH σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, σε αντίθεση με τα επίπεδα mRNA του ERα, που παρουσιάζουν αύξηση σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε διαφορική έκφραση αυτών γεγονός που συμπίπτει και με αντίστοιχες παρατηρήσεις στην καρκινική σειρά MCF-7.

Δεδομένου αφενός, του ότι ο ERβ αποτελεί την ισομορφή που εντοπίζεται και στα μιτοχόνδρια, ρυθμίζοντας εκεί την έκφραση κάποιων από τα γονίδια που ανήκουν στο mtDNA, και αφετέρου ότι η μιτοχονδριακή ισομορφή, διαδραματίζει στο ΚΝΣ σπουδαίο ρόλο στην πλαστικότητα των νευρώνων αλλά και στην προστασία από οξειδωτικό στρες και απόπτωση, πραγματοποιήθηκε υποκυτταρική

κλασμάτωση και απομόνωση μιτοχονδρίων από τη νευρική κυτταρική σειρά SH-SY5Y, η οποία καλλιεργήθηκε απουσία ορμονών (C), παρουσία οιστραδιόλης (E2) και παρουσία αλάτων αργιλίου (ACH). Έπειτα, έλαβε χώρα μελέτη μέσω ανοσοαποτύπωσης Western, όπου λήφθηκαν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα αποτελέσματα σε συνεργασία με το μεταπτυχιακό φοιτητή Γιάννη Τσιάλτα.

Με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western εξετάστηκε η επίδραση E2, ACH σε κυτταροπλασματικά πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των εξής μορίων: ERβ, Bcl2, Bcl-xL, Bax, Cyt-C, Trx-2, PEPCK και SDH ή α-τουμπουλίνη για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Για καλύτερη και εγκυρότερη επεξήγηση των αποτελεσμάτων, έγινε και εδώ σχετική ποσοτικοποίηση των μπαντών από τις εμφανίσεις με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος ποσοτικοποίησης. Αυτό που ως κύριο συμπέρασμα βγαίνει από τα περισσότερα διαγράμματα (βλ. αποτελέσματα), είναι η αποπτωτική δράση του ACH, αφού υπό την επίδρασή του εμφανίζεται μείωση των μιτοχονδριακών επιπέδων αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και αντίστοιχα αύξηση των προ-αποπτωτικών. Χαρακτηριστική είναι παρουσία ACH, η κατακόρυφη πτώση των επιπέδων, του Cyt-C στο μιτοχόνδριο, γεγονός που από μόνο του σηματοδοτεί απόπτωση. Τα αντι-αποπτωτικά γεγονότα που επάγονται από τους οιστρογονικούς υποδοχείς σύμφωνα με δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας, και αντιστρέφονται υπό την επίδραση του ACH, πιθανόν να οφείλονται και στην αρνητική επίδραση των εν λόγω ενώσεων στα επίπεδα έκφρασης του ίδιου του ERβ. Μένει να διερευνηθεί ο ακριβής μηχανισμός αυτής της επίδρασης.

Έτσι, από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, διαφαίνεται ότι τα άλατα αργιλίου επηρεάζουν αρνητικά τα επίπεδα έκφρασης του ERβ, και κατά συνέπεια περιορίζουν τις επιθυμητές αντι-αποπτωτικές νευροπροστατευτικές δράσεις του στα νευρικά κύτταρα. Η παρατήρηση αυτή διευκολύνει την κατανόηση των μηχανισμών επαγωγής νευροεκφυλιστικών νόσων από τις ενώσεις αργιλίου. Η μείωση των επιπέδων ERβ, παρουσία αργιλίου σε νευρικά κύτταρα πιθανόν να σχετίζεται με την επαγωγή και πρόοδο κάποιων νευροεκφυλιστικών νοσημάτων. Έτσι, παρατηρώντας τα επίπεδα έκφρασης αντι-αποπτωτικών μορίων όπως το Bcl-2 και βλέποντας τη μειωμένη έκφραση με τη χορήγηση ACH, συμπεραίνουμε μία πτώση στον αντι-αποπτωτικό μηχανισμό. Η πτώση αυτή θα μπορούσε να έχει σε βάθος χρόνου, μία συνεχόμενη ενεργοποίηση των αποπτωτικών μηχανισμών στους νευρώνες, η οποία θα μπορούσε μαζί με άλλους παράγοντες να οδηγήσει προοδευτικά σε νευροεκφυλισμό.

Τέλος, όλα αυτά τα δεδομένα, είναι αποτέλεσμα της εφαρμογής συγκέντρωσης (10^{-4} M) ACH, σε επίπεδα όμοια με αυτά που εντοπίζονται σε ιστούς ασθενών με νευροεκφυλιστικές νόσους, τριήμερης επώασης και άμεσης συλλογής των κυττάρων. Η διεθνής ιατρική κοινότητα έχει κρούσει τον κώδωνα του κινδύνου για το ότι σε βάθος χρόνο συσσώρευση του αργιλίου σε ιστούς, μπορεί να συμβάλλει στην χρόνο με το χρόνο αυξανόμενη τοξικότητά του. Έτσι δικαιολογείται γιατί οι προσδιοριζόμενες στο αίμα συγκεντρώσεις είναι κατά πολύ μικρότερες σε σχέση με τις υπάρχουσες συγκεντρώσεις του αργιλίου στους διάφορους ιστούς, ατόμων που συστηματικά εκτίθενται. Μένει να εξακριβωθεί η επίπτωση που μπορεί να έχει στην υγεία σε βάθος χρόνου, η καθημερινή έκθεση ενός ατόμου σε απειροελάχιστες συγκεντρώσεις αργιλίου, λ.χ με την καθημερινή εφαρμογή αποσμητικού.

Σε μεταγενέστερο χρόνο, απαιτείται να εξακριβωθούν οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους το αλουμίνιο ασκεί τις παρατηρηθείσες δράσεις, ποια είναι συγκεκριμένα, τα σηματοδοτικά μονοπάτια που απορρυθμίζονται, και αν επηρεάζει το ACH τη λειτουργία ή τα επίπεδα μορίων, συρυθμιστών ή συγκαταστολέων, που θα κρίνουν τελικά το αποτέλεσμα της μεταγραφικής ικανότητας των ίδιων

των ERs και αθροιστικά θα οδηγήσουν το κύτταρο να χάσει την φυσιολογική του πορεία και να μπει σε μονοπάτια παθολόγησης, ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού ή εκφυλισμού.

7. Βιβλιογραφία

- S. Arnold, M. Barbara Victor, C. Beyer, 2012, Estrogen and the regulation of mitochondrial structure and function in the brain, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 131, 2–9
- L. Björnström, M. Sjöberg, 2005, Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes, *Mol Endocrinol*, 19 (4): 833-842.
- J. Q. Chenn, J. Russo, 2008, Mitochondrial oestrogen receptors and their potential implications in oestrogen carcinogenesis in human breast cancer, *Journal of Nutrition. & Environ. Medicine*, 17(1), 76-89
- J. Cui, Y. Shen, R. Li, 2013, Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain, *Trends Mol Med.*, 19 (3): 197-209.
- Czuczar P., Paszkowski T., Ilsięcki M., Wozniak S., Stepniak A., 2017, The safety and tolerance of phytotherapies in menopausal medicine-a review of the literature, *Menopause Rev.*;16(1): 8-11.
- Darbre, 2006, Aluminum, antiperspirant and breast cancer, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 1912-1919
- Farooq A., 2015, Structural and functional diversity of estrogen receptor ligands, *Curr Top Med Chem*, 15(14): 1372-1384
- M. Fiocchetti, P. Ascenzi, M. Marino, 2012, Neuroprotective Effects of 17β-Estradiol Rely on Estrogen Receptor Membrane Initiated Signals, *Front Physiol.*, 3: 73.
- D. Gosselin, S. Rivest, 2011, Estrogen Receptor Transrepresses Brain Inflammation, *Cell Previews*, 04.018
- J. S. Hanas, C. G. Gunn, 1996, Inhibition of transcription factor IIIA–DNA interactions by xenobiotic metal ions, *Nucleic Acid Research*, Vol. 24, No. 5 924 –930
- Heldring N, Pike A, Andersson , Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström , Treuter E, Warner M, Gustafsson JA, 2007, Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets, *Physiol Rev.* , Jul;87(3):905-31.
- G. E. Hoffman, I. Merchenthaler, S. L. Zup, 2006, Neuroprotection by Ovarian Hormones in Animal Models of Neurological Disease, *Endocrine*, vol. 29, no. 2, 217–231
- K. Ikeda, Horie-Inoue K., S. Inoue, 2015, Identification of estrogen-responsive genes based on the DNA binding properties of estrogen receptors using high-throughput sequencing technology, *Acta Pharmacologica Sinica*, 36: 24-31
- Ishihara Y., Takemoto T., Ishida A., Yamazaki T., 2015, Protective Actions of 17β-Estradiol and Progesterone on Oxidative Neuronal Injury Induced by Organometallic Compounds, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 343706, 16 pages
- Klinge CM, 2008, Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis, *J Cell Biochem.* ;105(6):1342-51.
- Lessene G., Peter E. Czabotar & P. M. Colman, 2008, BCL-2 family antagonists for cancer therapy, *Nature Reviews Drug Discovery* 7, 989-1000.
- Liao T., Tzeng CR, Yu CL, Wang YP, Kao SH, 2015, Estrogen receptor-β in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis, *Ann. NY Acad Sci.* 1350:52-60.
- Marino M., Galluzzo P., Ascenzi P., 2006, Estrogen signaling multiple pathways to impact transcription, *Current Genomics*, 7, 497-508

- McDonnell D., Wardell S., Norris J., 2015, Oral selective estrogen receptor downregulators (SERDs) a breakthrough endocrine therapy for breast cancer, *J Med Chem.* ; 58 (12): 4883-4887
- Nilsson S., Ma Kela S., Treuter E., Tujaque M., Thomsen J., Andersson G-R, Enmark E., Petterson K., Warner M, Gustaffson J-A, 2001, Mechanisms of Estrogen Action, *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* Vol. 81, No. 4
- A. B. Petrone, C. C. Rudy, T. L. Barr, J. W. Simpkins, M. N. Reed, 2015, Neuroprotective Effects of Estrogen Following Neural Injury.
- B. Perillo, A. Sasso, C. Abbondanza, G. Palumbo, 2000, 17 β -Estradiol Inhibits Apoptosis in MCF-7 Cells, Inducing bcl-2 Expression via Two Estrogen-Responsive Elements Present in the Coding Sequence, *Molecular and Cellular Biology*, 2890–2901
- M. Pohanka, 2014, Copper, aluminum, iron and calcium inhibit human acetylcholinesterase in vitro, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Pages 455–459
- Sawada H., Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Honda K, Nakanishi M, Akaike A, Shimohama S., 2000, Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons, *FASEB J.* 2000 Jun;14(9):1202-14.
- Sever R. , C. K. Glass, 2013, Signaling by Nuclear Receptors, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(3): a016709.
- C. Su, N. Rybalchenko, D. A. Schreihofner, M. Singh, B. Abbassi, R. L. Cunningham, 2012, Cell Models for the Study of Sex Steroid Hormone Neurobiology, *J Steroids Horm Sci.* , 2: 003.
- M. Subramanian, Chandrima S., 2007, Survival in an Estrogen Phosphorylation Is Associated with Human Up-Regulation of Bcl-2 through ERK, *J Immunology*, 179:2330-2338
- Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB., 1998, Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26;95(11):5998-6003.
- E. Vegeto, V. Benedusi, A. Maggi, 2008, Estrogen anti-inflammatory activity in brain: a therapeutic opportunity for menopause and neurodegenerative diseases, *Front Neuroendocrinol.*, 29(4): 507–519
- E Vegeto, P Ciana, A Maggi, Estrogen and inflammation: hormone generous action spreads to the brain, 2002, *Molecular Psychiatry*, 7, 236–238
- S.H. Yang, R. Liu, E. J. Perez, Y. Wen, S. M. Stevens, T. Valencia, A.M. Brun-Zinkernagel, L. Prokai, Y. Will, J. Dykens, P. Koulen, J.W. Simpkins, 2004, Mitochondrial localization of estrogen receptor β , *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(12): 4130–4135
- M. Yao , T. Nguyen , C. J. Pik, 2007, Estrogen Regulates Bcl-w and Bim Expression: Role in Protection against Amyloid Peptide-Induced Neuronal Death, *The Journal of Neuroscience*, 27(6):1422–1433
- Zhao C., Dahlman-Wright K., Gustafsson J-A, 2008, Estrogen receptor β : an overview and update, *Nuclear Receptor Signaling*, 6, 003
- *W Zwart, H Terra, S Linn, S Schagen, 2015, Cognitive effects of endocrine therapy for breast cancer: keep calm and carry on? Nature Reviews Clinical Oncology, 12:597-606.*