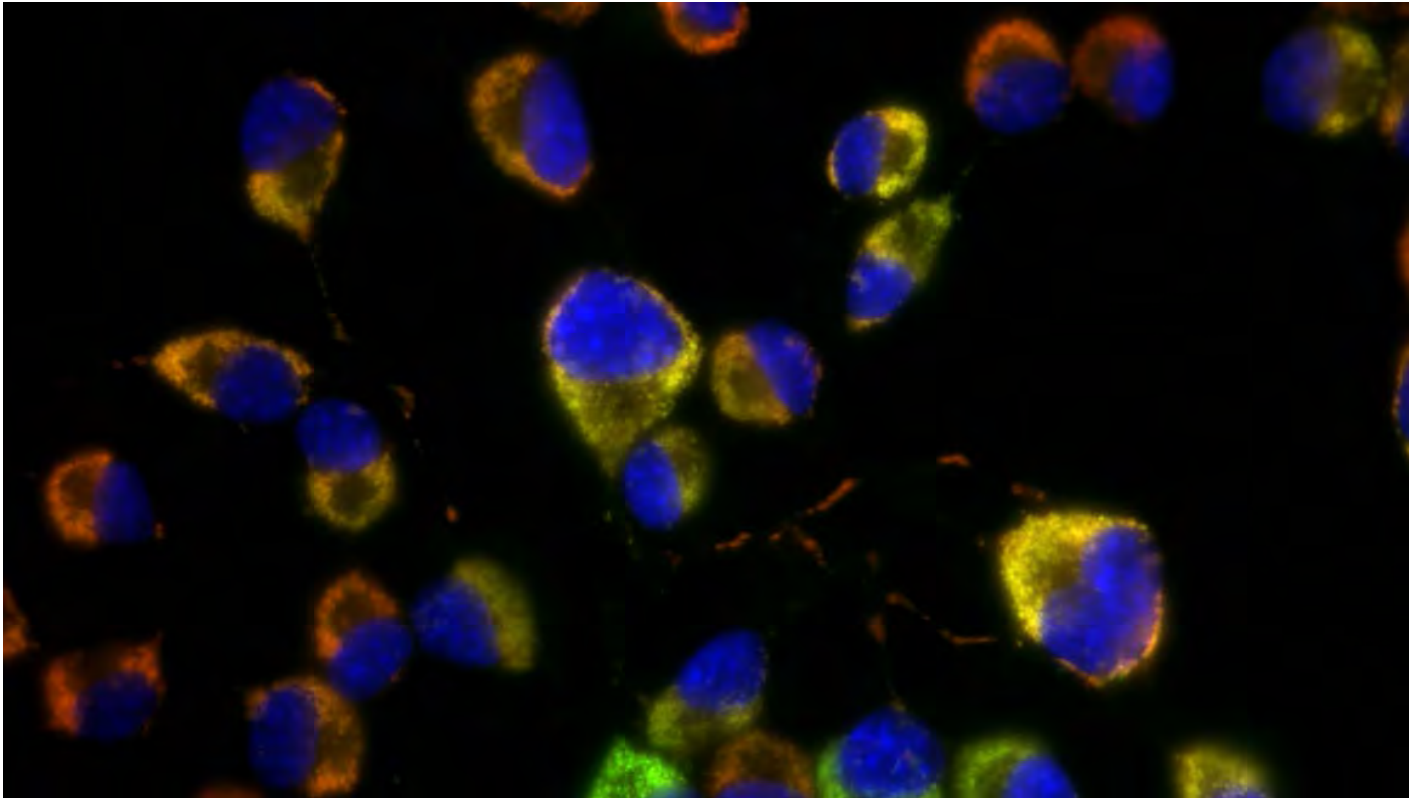


ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Χαρακτηρισμός της έκφρασης της βήτα μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων σε σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές”

“Expression profile of the mitochondrial estrogen receptor beta in stable cell lines”



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΗ: ΓΚΑΝΤΟΥΝΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΔΡ. ΨΑΡΡΑ Γ. ANNA-MARIA

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ & ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (TBB), της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, το οποίο εδρεύει στη Λάρισα.

Υπεύθυνη καθηγήτρια

Ψαρρά Άννα – Μαρία, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας TBB, Π.Θ

Τριμελής επιτροπή

Ψαρρά Άννα – Μαρία, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας TBB, Π.Θ

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής TBB, ΠΘ

Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας TBB,ΠΘ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) είναι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι ανήκουν στους υποδοχείς στεροειδών ορμονών, στην ευρύτερη υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Οι υποδοχείς αυτοί ενεργοποιούνται κυρίως από προσδέτη, όμως μπορούν να δράσουν και προσδετοανεξάρτητα. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί δύο κύριοι υπότυποι, ο ERα και ο ERβ. Οι διάφοροι υπότυποι των ERs εντοπίζονται στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια. Ανιχνεύονται σε ποικίλους ιστούς και παρουσιάζουν διακριτές βιολογικές δράσεις. Ολοένα και περισσότερες επιστημονικές μελέτες υποστηρίζουν πως ο ERβ εισέρχεται στα μιτοχόνδρια και στις περισσότερες περιπτώσεις αποτελεί τον κυρίαρχο ή μοναδικό υπότυπο. Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια που ευθύνονται για την παραγωγή ενέργειας, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και διαδραματίζουν κομβικό ρόλο στην επιβίωση του κυττάρου. Επιπλέον, παίζουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες, μέσω της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), στη διαφοροποίηση των κυττάρων και στον ενδιάμεσο μεταβολισμό. Τα οιστρογόνα ρυθμίζουν τη σύνθεση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Τα περισσότερα από τα μιτοχονδριακά γονίδια που ρυθμίζονται από τον ERβ είναι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Ακόμα φαίνεται πως ο ERβ δρα ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας σε πολλούς τύπους καρκίνου σε ERβ-knockout (ERβKO) ποντικούς. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν σταθερά διαμολυσμένες αποικίες κυττάρων Neuro-2a, που υπερεκφράζουν τον ERβ ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), με μιτοχονδριακή στόχευση (mtGFPERβ) και μελετήθηκαν ως προς τα επίπεδα έκφρασης της mtGFPERβ πρωτεΐνης. Αρχικά συλλέχθηκαν εκατόν είκοσι αποικίες, μόνο έξι από τις οποίες έφτασαν στα τελικά στάδια επιλογής. Η πειραματική προσέγγιση που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τις τεχνικές της μικροσκοπίας φθορισμού και της ανοσοκυτταροχημείας. Σκοπός ήταν ο χαρακτηρισμός της έκφρασης της βήτα μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων στη Neuro-2a κυτταρική σειρά και η επιλογή της αποικίας με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης GFPERβ πρωτεΐνης. Αρχικά η παρατήρηση των αποικιών 5, 7, 33, 50 και 80 σε δύο διαφορετικά επίπεδα εστίασης (20x και 63x), με εφαρμογή μικροσκοπίας φθορισμού αποκάλυψε την ύπαρξη έκφρασης του ERβ με τη μορφή χιμαιρικής πρωτεΐνης GFPERβ, υποδεικνύοντας εν συνεχεία πως η έκφραση αυτή στο σύνολό της είναι μιτοχονδριακή. Έπειτα πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της έντασης φθορισμού των πέντε αποικιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η αποικία 5 είναι εκείνη με το υψηλότερο ποσοστό έντασης φθορισμού. Αντίθετα η αποικία 80 εμφανίζει το μικρότερο ποσοστό έντασης φθορισμού και παρουσιάζει το μικρότερο ποσοστό επιτυχούς διαμόλυνσης. Ακόμα υπήρξε προσπάθεια για τον χαρακτηρισμό της αποτελεσματικότητας και εξειδίκευσης αντισωμάτων έναντι μορίων-στόχων της μιτοχονδριακής οιστρογονικής σηματοδότησης, που πιθανόν να αλληλεπιδρούν με τον ERβ στο μιτοχόνδριο. Τέλος, στόχος μας στο άμεσο μέλλον είναι η διενέργεια επιπλέον πειραμάτων, όπως η Real Time PCR (QRT-PCR) για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων με την εφαρμογή της μικροσκοπίας φθορισμού και την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της βήτα μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια.

ABSTRACT

Estrogen receptors (ERs) are steroid receptors that belong to nuclear receptors superfamily. They are mainly ligand-dependent and exist in two subtypes, ER α and ER β . These receptors are mainly located in nucleus and mitochondria. ER α and ER β have different expression patterns among different tissues and distinct biological effects. Recent studies suggest that ER β have mitochondrial localization, where most of time constitutes the main ER subtype. Mitochondria are cellular organelles that regulate energy production through oxidative phosphorylation (OXPHOS). Furthermore they have a key role in apoptosis and play crucial role in cellular differentiation, intermediate metabolism and oxidative stress through Reactive Oxygen Species (ROS) production. Estrogens regulate mitochondrial proteins' synthesis. Most of ER β -regulated genes are mitochondrial proteins related with OXPHOS. Also ER β is shown to be a tumor repressor factor in many ER β -knockout (ER β KO) mice experiments in a variety of cancer types. In the present thesis steadily transplanted colonies of Neuro-2a cells overexpressing ER β as GFPER β hybrid protein with mitochondrial targeting (mtGFPER β) were used and studied for expression levels of the mtGFPER β protein. Firstly, one hundred and twenty colonies picked up but only six survived until final selection stages. The experimental procedure contains fluorescence microscopy and immunocytochemistry techniques. The goal of this project was the characterization of stable cell line as regards the profile of the mitochondrial ER β (mtER β) and the selection of the colony with the highest levels of GFPER β protein expression. Initially microscopic observation of 5, 7, 33, 50 and 80 colonies at two different focus depths (20x and 63x) revealed mitochondrial expression of ER β in the form of GFPER β chimera-protein. After that proved that the whole expression was mitochondrial. Then quantification of the fluorescence intensity of Neuro-2a cell colonies was performed. The results showed that colony 5 is the one with the highest percentage of fluorescence intensity. In contrast, colony 80 exhibits the smallest fluorescence intensity and the smallest percentage of successful transfection. In addition there has been an attempt to characterize the efficacy and specificity of primary antibodies against targeting molecules of mitochondrial estrogenic signaling that are likely to interact with ER β in mitochondria. Finally, our goal in the near future is to carry out additional experiments, such as Real Time PCR (QRT-PCR), to verify the results of this study by applying fluorescence microscopy and to further investigate the role of estrogen receptor beta subtype in mitochondria.

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	7
1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς.....	7
1.1.1 Δομή.....	7
1.1.2 Ταξινόμηση	8
1.2 Στεροειδείς ορμόνες και υποδοχείς στεροειδών ορμονών	9
1.3 Οιστρογόνα.....	10
1.4 Υποδοχείς οιστρογόνων	11
1.4.1 Υπότυποι.....	11
1.4.2 Κατανομή στους ιστούς	12
1.4.3 Ισομορφές	14
1.5 Μηχανισμοί δράσης των υποδοχέων οιστρογόνων	15
1.5.1 Μονοπάτι 1 ^ο : ER-εξαρτώμενη, γενωμική σηματοδότηση	15
1.5.1.1 Άμεση γενωμική σηματοδότηση.....	16
1.5.1.2 Έμμεση γενωμική σηματοδότηση.....	16
1.5.2 Μονοπάτι 2 ^ο : ER-εξαρτώμενη, μη γενωμική σηματοδότηση	17
1.5.3 Μονοπάτι 3 ^ο : ER-ανεξάρτητη σηματοδότηση	18
1.5.4 Μονοπάτι 4 ^ο : Προσδετοανεξάρτητη ενεργοποίηση του ER	19
1.6 Οιστρογόνα, ERs και μιτοχόνδρια	19
1.6.1 Τα μιτοχόνδρια	19
1.6.2 Μιτοχονδριακός εντοπισμός του ERβ	21
1.6.3 Είσοδος του ERβ στο μιτοχόνδριο.....	22
1.6.4 Δράσεις των οιστρογόνων και των ERs στα μιτοχόνδρια.....	23
1.7 Οιστρογόνα, ERs και νευρικό σύστημα	25
1.7.1 ER-μεσολάβηση	25
1.7.2 Μη γενωμική οδός	26
1.7.1.2 Ρύθμιση της απόπτωσης.....	26
1.7.3 Αντιοξειδωτική δράση.....	27
1.7.4 Αντιφλεγμονώδης δράση.....	27
1.7.5 Οιστρογόνα, ERs και νευροεκφυλιστικές νόσοι.....	27
1.8 Οιστρογόνα, ERs και καρκίνος.....	28
1.9 Σκοπός	29
2. Πειραματικό μέρος.....	30
2.1 Οργανολογία.....	30
2.2 Υλικά.....	30
2.2.1 Χημικά	30
2.2.2 Θρεπτικά υλικά.....	31
2.2.3 Διαλύματα	31
2.2.4 Αντισώματα	33
2.2.5 Αναλώσιμα	34
2.2.6 Κυτταρικές σειρές	34
2.3 Τεχνικές	35
2.3.1 Μέτρηση και στρώσιμο κυττάρων	35
2.3.2 Ανοσοκυτταροχημεία και μικροσκοπία φθορισμού.....	36
2.3.2.1 Ανοσοκυτταροχημεία.....	36
2.3.2.2 Μικροσκοπία φθορισμού.....	37
2.3.3 Λύση με τη χρήση διαλύματος	37

2.3.4 Λύση με τη χρήση υπερήχων (Sonication)	38
2.3.5 Χρωματομετρική μέθοδος Bradford	38
2.3.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες.....	39
2.3.6.1 Παρασκευή γέλης πολυακρυκαμιδίου.....	39
2.3.6.2 Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση.....	40
2.3.6.3 Ηλεκτροφόρηση.....	40
2.3.7 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blotting)	40
2.3.7.1 Εξισορρόπηση και ηλεκτρομεταφορά.....	40
2.3.7.2 Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων.....	41
2.3.7.3 Επώασης με πρωτογενές/δευτερογενές αντίσωμα.....	42
2.3.7.4 Εμφάνιση σήματος.....	42
2.4 Υπολογιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	43
3. Αποτελέσματα.....	43
3.1 Διερεύνηση της ύπαρξης GFP στις αποικίες της σταθερά διαμολυσμένης N2AmtGFPERβ κυτταρικής σειράς με μικροσκοπία φθορισμού- (ποιοτική αξιολόγηση).....	44
3.1.1 Διαγραμματική απεικόνιση της επιτυχίας διαμόλυνσης (transfection) των αποικιών της σταθερά διαμολυσμένης N2AmtGFPERβ κυτταρικής σειράς (ημιποσοτική αξιολόγηση).....	46
3.1.2 Αξιολόγηση της έντασης φθορισμού της GFP.....	47
3.2 Διερεύνηση της ύπαρξης ERβ στην αποικία 5 της σταθερά διαμολυσμένης N2AmtGFPERβ κυτταρικής σειράς με μικροσκοπία φθορισμού- (ποιοτική αξιολόγηση).....	47
3.3 Δοκιμή αντισωμάτων έναντι μιτοχονδριακών μορίων-στόχων.....	48
4. Συμπεράσματα-συζήτηση.....	50
Βιβλιογραφία	52
Ευχαριστίες	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.

1. Εισαγωγή

1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς

Η οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (Nuclear Receptors, NRs) αποτελείται από δύο κύριες κατηγορίες υψηλά συντηρημένων μεταγραφικών παραγόντων: τους πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών (Nuclear Hormone Receptors, NHRs) και τους ορφανούς πυρηνικούς υποδοχείς. Για τους NHRs έχουν ταυτοποιηθεί ορμονικοί προσδέτες, ενώ οι προσδέτες των ορφανών υποδοχέων παραμένουν μέχρι στιγμής άγνωστοι (*Olefsky, 2001*).

Οι πυρηνικοί υποδοχείς ρυθμίζουν διάφορες λειτουργίες, όπως είναι η ομοιόσταση, η αναπαραγωγή, η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός. Η οικογένεια περιλαμβάνει υποδοχείς για υδρόφοβα μόρια, όπως είναι οι στεροειδείς ορμόνες (π.χ. οιστρογόνα, γλυκοκορτικοειδή, προγεστερόνη, μεταλλοκορτικοειδή, ανδρογόνα, βιταμίνη D₃, εκδυσόνη, οξυστερόλες και χολικά οξέα), το ρετινοϊκό οξύ, οι θυρεοειδικές ορμόνες, τα λιπαρά οξέα, τα λευκοτριένια και οι προσταγλανδίνες. Οι πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών ενεργοποιούνται ύστερα από τη δέσμευση ενός προσδέτη και λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες που παρέχουν μια άμεση σύνδεση μεταξύ των σηματοδοτικών μορίων που ελέγχουν τις παραπάνω διεργασίες και τις μεταγραφικές αποκρίσεις (*Robinson-Rechavi et al., 2003*).

Οι λειτουργίες των πυρηνικών υποδοχέων μπορούν να διαμορφωθούν με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που περιλαμβάνουν φωσφορυλίωση, ουβικουιλίνωση και σουμοϋλύωση. Η φωσφορυλίωση μπορεί να ενεργοποιήσει μερικούς πυρηνικούς υποδοχείς ανεξάρτητα από την πρόσδεση του προσδέτη και αποτελεί τον κύριο μηχανισμό ρύθμισης της δράσης των ορφανών υποδοχέων. Η ουβικουιλίνωση του υποδοχέα μπορεί να συμβεί ως απόκριση στη δέσμευση προσδέτη και μπορεί να συμβάλει στον τερματισμό της ορμονικής σηματοδότησης. Η σουμοϋλύωση συνήθως μειώνει τη λειτουργία ενεργοποίησης των πυρηνικών υποδοχέων και/ή προάγει τη δραστηριότητα του καταστολέα (*Sever & Glass, 2013*).

1.1.1 Δομή

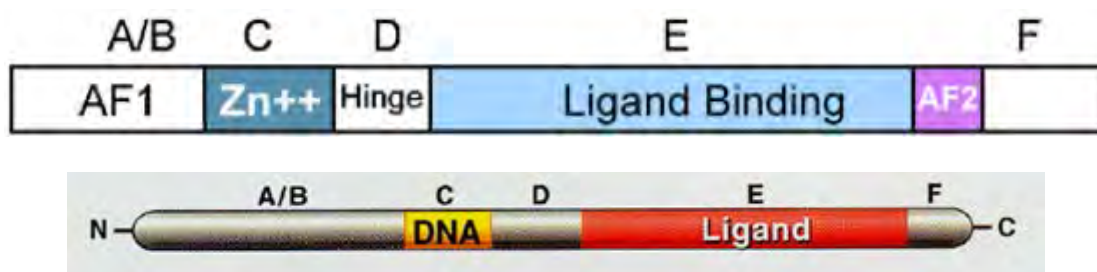
Οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να υφίστανται ως ομο- ή ετεροδιμερή (*Olefsky, 2001*). Παρουσιάζουν μια δομοστοιχειωτή δομή αποτελούμενη από έξι περιοχές (A-F domains) (*Εικόνα 1*). Η περιοχή του NH₂-τελικού άκρου (**A/B domain**) «φιλοξενεί» την ανεξάρτητη από προσδέτες λειτουργία trans ενεργοποίησης (AF-1) και παρουσιάζει υψηλή μεταβλητότητα ως προς το μήκος (που κυμαίνεται από 23 έως 602 αμινοξέα) και την αλληλουχία. Αντίθετα οι περιοχές C και D είναι πιο συντηρημένες (*Renaud & Moras, 2000*).

Η περιοχή **C** ή αλλιώς περιοχή δέσμευσης στο DNA (**DNA binding domain, DBD - 70aa**) κατευθύνει τον υποδοχέα σε ειδικές αλληλουχίες του DNA, γνωστές ως στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (Hormone response elements, HREs) (*Mangelsdorf et al., 1995*). Η DBD περιέχει το P-box, ένα σύντομο μοτίβο υπεύθυνο για την ειδική δέσμευση του DNA σε αλληλουχίες που περιέχουν το μοτίβο “AGGTCA” και εμπλέκεται στο διμερισμό των πυρηνικών υποδοχέων (*Robinson-Rechavi et al., 2003*). Επίσης, η DBD αποτελείται από δύο υψηλά συντηρημένα μοτίβα δέσμευσης

ψευδαργύρου, καθένα από τα οποία συνεισφέρει ένα ιόν ψευδαργύρου μέσω τεσσάρων, τοποθετημένων με ακρίβεια, κυστεινών (Sladek, 2011).

Η περιοχή **E** ή αλλιώς περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (**Ligand binding domain, LBD** - 250αα) περιέχει, εκτός από τη θέση πρόσδεσής του, την εξαρτώμενη από προσδέτες θέση *trans* ενεργοποίησης (AF-2) και διαθέτει επιφάνειες αλληλεπίδρασης για πολλαπλούς συμπαραγόντες (Renaud & Moras, 2000). Οι κύριοι προσδέτες είναι μικρές λιπόφιλες ενώσεις. Αποτελείται από 12 άλφα έλικες που δημιουργούν έναν υδρόφοβο θύλακα, ο οποίος μπορεί να δεσμεύσει έναν υδρόφοβο προσδέτη (Sladek, 2011). Η LBD εξασφαλίζει τόσο την εξειδίκευση όσο και την επιλεκτικότητα της φυσιολογικής απόκρισης κι έτσι μπορεί να θεωρηθεί ως ένας μοριακός διακόπτης ο οποίος μετά την πρόσδεση του προσδέτη μετατοπίζει τον υποδοχέα σε μια μεταγραφικά δραστική κατάσταση (Mangelsdorf et al., 1995).

Η **D** είναι μια περιοχή άρθρωσης που συνδέει την DBD με την LBD. Είναι επίσης πολύ μεταβλητή όσον αφορά το μήκος και την ακολουθία της, και περιέχει σήματα πυρηνικού εντοπισμού. Τέλος η περιοχή **F** δεν είναι παρούσα σε όλους τους NRs και η λειτουργία της δεν είναι επαρκώς κατανοητή (Renaud & Moras, 2000).



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της δομής των NRs. Οι πυρηνικοί υποδοχείς αποτελούνται από έξι υψηλά συντηρημένες περιοχές A-F (Sladek, 2011; Mangelsdorf, 1995).

1.1.2 Ταξινόμηση

Οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις κατηγορίες βάσει του τρόπου δράσης τους, της δέσμευσης τους στο DNA και τις ιδιότητες διμερισμού.

- Στην **πρώτη κατηγορία** κατατάσσονται υποδοχείς που βρίσκονται αγκυροβολημένοι στο κυτταρόπλασμα με πρωτεΐνες θερμικού σοκ (π.χ. HSP90). Η δέσμευση του προσδέτη απελευθερώνει τον υποδοχέα από τη συνοδό πρωτεΐνη, επιτρέποντας την είσοδό του στον πυρήνα. Εκεί, ο υποδοχέας δεσμεύεται ως ομοδιμερές σε HREs περιοχές στην περιοχή του υποκινητή γονιδίων-στόχων. Παραδείγματα τέτοιων υποδοχέων αποτελούν ο υποδοχέας ανδρογόνων, ο υποδοχέας οιστρογόνων και ο υποδοχέας προγεστερόνης (Sever & Glass, 2013).
- Οι υποδοχείς της **κατηγορίας 2** βρίσκονται στον πυρήνα, συνδεδεμένοι σε ειδικά στοιχεία απόκρισης στο DNA (DNA response elements, DREs) ακόμη και απουσία προσδέτη. Γενικά σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον Retinoid X Receptor (RXR) και απουσία προσδέτη ασκούν κατασταλτικές λειτουργίες μέσω αλληλεπιδράσεων με σύμπλοκα που σχετίζονται με αποακετυλάσες ιστονών (HDACs). Η σύνδεση του προσδέτη στη LBD οδηγεί στη διάσπαση των

καταστολέων και στην αντικατάστασή τους με σύμπλοκα ενεργοποίησης, τα οποία βοηθούν στο άνοιγμα της χρωματίνης και διευκολύνουν την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων. Παραδείγματα τέτοιων υποδοχέων αποτελούν ο υποδοχέας θυρεοειδικών ορμονών, ο υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος, οι PPARs (Peroxisome Proliferator-activated Receptors) και οι ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς (Olefsky, 2001; Sever & Glass, 2013).

- Οι δύο τελευταίες κατηγορίες περιλαμβάνουν υποδοχείς, οι οποίοι λειτουργούν ως ομοδιμερή που δεσμεύονται άμεσα σε περιοχές HREs που εμφανίζουν ευθείες επαναλήψεις (κατηγορία 3) ή μονομερή (κατηγορία 4) που συνδέονται σε συγκεκριμένες αναστροφές επαναλήψεις στα HREs (Olefsky, 2001; Sever & Glass, 2013).

1.2 Στεροειδείς ορμόνες και υποδοχείς στεροειδών ορμονών

Τα στεροειδή είναι μικρές, λιπόφιλες ορμόνες που συντίθενται από ένα κοινό πρόδρομο μόριο, τη χοληστερόλη. Τα γλυκοκορτικοειδή, τα μεταλλοκορτικοειδή και τα ανδρογόνα των επινεφριδίων συντίθενται στο φλοιό των επινεφριδίων. Στους όρχεις παράγονται ανδρογόνα των όρχεων και οιστρογόνα, ενώ από τις ωοθήκες και τον πλακούντα εκκρίνονται οιστρογόνα και προγεσταγόνα. Γενικά, τα στεροειδή φύλου παράγονται κυρίως στις γονάδες και σε μικρό βαθμό στα επινεφρίδια. Η οιστρονία και η οιστραδιόλη, τα ισχυρότερα φυσικά οιστρογόνα, μπορούν επίσης να παραχθούν σε σημαντικές ποσότητες στον λιπώδη ιστό (Cleary & Grossmann, 2009). Οι στεροειδείς ορμόνες φτάνουν στους στόχους τους (υποδοχείς στεροειδών ορμονών) μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, όπου συνδέονται με πρωτεΐνες μεταφορείς και λόγω της λιπόφιλης φύσης τους διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω απλής διάχυσης (Beato & Klug, 2000). Εμπλέκονται στον έλεγχο του μεταβολισμού, της φλεγμονής, στις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, στη ρύθμιση της ισορροπίας αλάτων και νερού, στην ανάπτυξη των χαρακτηριστικών φύλου και στην ικανότητα αντοχής του οργανισμού σε ασθένειες και τραυματισμούς. Παρόλα αυτά, όλες οι κλασσικές στεροειδείς ορμόνες, ιδιαίτερα οι ορμόνες φύλου, μπορεί να εμπλέκονται και στην ανάπτυξη ασθενειών (Gupta & Mayer, 2013).

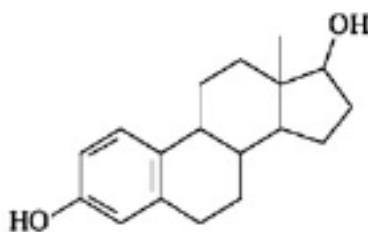
Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών (Steroid Receptors, SRs) μεσολαβούν στις πολυάριθμες και κρίσιμες βιολογικές διεργασίες και θεωρείται ότι λειτουργούν ως μεταγραφικοί ρυθμιστές (Kumar & Litwack, 2009). Μπορεί να είναι πυρηνικοί ή κυτταροπλασματικοί ή ακόμη δεσμευμένοι σε μεμβράνες. Όλα τα μέλη των SRs προέρχονται από έναν μόνο προγονικό υποδοχέα. Ωστόσο, εξαιτίας μια σειράς διαδοχικών διπλασιασμών τα διάφορα μέλη διαχωρίστηκαν στην πορεία της εξέλιξης (Eick, 2011). Η λειτουργία των SRs ρυθμίζεται όχι μόνο από τις στεροειδείς ορμόνες, αλλά και από πολλαπλούς καταρράκτες σηματοδότησης που πυροδοτούνται από τους μεμβρανικούς υποδοχείς, οι οποίοι έχουν πρώτα διεγερθεί από παράγοντες ανάπτυξης ή κυτοκίνες (Gupta & Mayer, 2013).

Σύμφωνα με το κλασικό μοντέλο σηματοδότησης, τα στεροειδή εισέρχονται στα κύτταρα μέσω της πλασματικής μεμβράνης και προσδένονται στον υποδοχέα τους που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (π.χ. υποδοχέας ανδρογόνων και γλυκοκορτικοειδών) ή στον πυρήνα (π.χ. υποδοχέας οιστρογόνων) (Levin &

Hammes, 2016). Στην αδρανή τους κατάσταση οι κυτταροπλασματικοί υποδοχείς στεροειδών ορμονών είναι δεσμευμένοι σε πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Η δέσμευση του προσδέτη έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπισή τους από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί δεσμεύονται σε HREs, τα οποία εντοπίζονται στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων-στόχων (*Gupta & Mayer, 2013*). Το γεγονός αυτό οδηγεί σε στρατολόγηση αρκετών ρυθμιστικών πρωτεϊνών, όπως συν-ενεργοποιητών ή συν-καταστολέων. Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες, περιέχουν ενδογενή ένζυμα τροποποίησης ιστονών με αποτέλεσμα την αλλοίωση της δομής της χρωματίνης, διευκολύνοντας ή παρεμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό την πρόσβαση του μεταγραφικού μηχανισμού στο DNA. Οι υποδοχείς μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν μέσω διασταυρούμενης επικοινωνίας (cross-talk) με άλλους ρυθμιστικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα με κάποια μιτογόνα και ορισμένους νευροδιαβιβαστές (*Psarra & Sekeris, 2008*).

1.3 Οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα συντίθενται σε όλα τα σπονδυλωτά καθώς και σε μερικά έντομα (*Mechoulam et al., 1984*). Αποτελούν την κύρια γυναικεία ορμόνη και είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη και ρύθμιση του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος και των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου (*Travis & Key, 2003*). Ωστόσο, τόσο στις γυναίκες, όσο και στους άνδρες που τα επίπεδα των οιστρογόνων είναι σημαντικά χαμηλότερα, ασκούν μια τεράστια ποικιλία βιολογικών επιδράσεων στο καρδιαγγειακό, μυοσκελετικό, ανοσοποιητικό και κεντρικό νευρικό σύστημα (*Heldring et al., 2007, Lombardi et al., 2001*). Υπάρχουν τρία κύρια ενδογενή οιστρογόνα στις γυναίκες που παρουσιάζουν ορμονική δράση: η οιστρόνη, η οιστραδιόλη και η οιστριόλη. Το πιο ισχυρό οιστρογόνο που παράγεται στο σώμα είναι η 17β-οιστραδιόλη (17β-estradiol, E₂) και αποτελεί τον κύριο προσδέτη των υποδοχέων οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs). Αντίθετα, η οιστρόνη και η οιστριόλη, αν και χαρακτηρίζονται ως προσδέτες υψηλής συγγένειας, είναι πολύ ασθενέστεροι αγωνιστές των ERs (*Heldring et al., 2007*). Όπως όλες οι στεροειδείς ορμόνες, τα οιστρογόνα διαχέονται εύκολα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Μόλις εισέλθουν στο κύτταρο δεσμεύονται και ενεργοποιούν τους υποδοχείς οιστρογόνων που με τη σειρά τους ελέγχουν την έκφραση πολλών γονιδίων (*Lombardi et al., 2001*).



17β-Estradiol

Εικόνα 2. Η χημική δομή της E₂ (*Sladek, 2011*).

1.4 Υποδοχείς οιστρογόνων

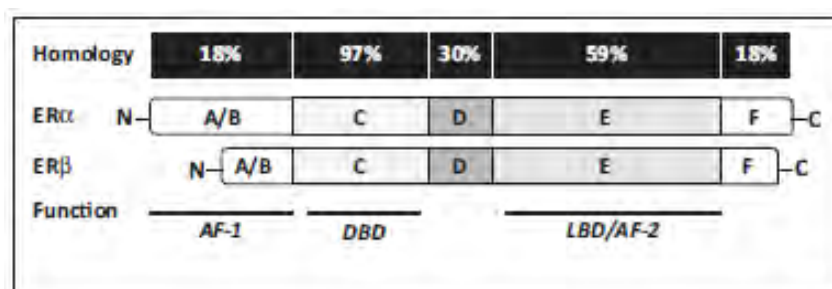
1.4.1 Υπότυποι

Οι υποδοχείς οιστρογόνων είναι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και ενεργοποιούνται κατά κύριο λόγο από τη δέσμευση του προσδέτη τους. Στα τέλη της δεκαετίας του 1950, ανακαλύφθηκε από τους Jensen και Jacobsen η ύπαρξη ενός μορίου υποδοχέα στο οποίο θα μπορούσε να δεσμευτεί η E_2 . Ο πρώτος ER κλωνοποιήθηκε από μία cDNA βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε από την κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF-7, το 1986 (*Dahlman-Wright et al., 2006; Beato & Klug, 2000*). Αυτός ο υποδοχέας θεωρήθηκε ως ο μόνος ER έως ότου κλωνοποιήθηκε από τον προστάτη αρουαίου ένας δεύτερος ER, το 1996. Οι δύο υποδοχείς σήμερα είναι γνωστοί ως ER α και ER β , αντίστοιχα (*Dahlman-Wright et al., 2006*). Τόσο ο ER α όσο και ο ER β εντοπίζονται στον πυρήνα, στην πλασματική μεμβράνη και στα μιτοχόνδρια (*Chen et al., 2007; Zhao et al., 2007*). Και στους δύο υποδοχείς δεσμεύονται οι προσδέτες οιστραδιόλη, οιστριόλη και οιστρόνη με μεγάλη συγγένεια. Μετά την δέσμευση του προσδέτη οι ERs σχηματίζουν ετεροδιμερή και προσδένονται στα HREs, διεγείροντας ή καταστέλλοντας τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους (*Beato & Klug, 2000; Cui, 2013*).

Οι ER α και ER β κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, τα ESR1 και ESR2, που εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Πιο συγκεκριμένα το ESR1 εδράζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 6q25.1, ενώ το ESR2 στην 14q23.2 (*Jia et al., 2015*). Παρόλο που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, τόσο ο ER α όσο και ο ER β , διαθέτουν τη χαρακτηριστική δομή των πυρηνικών υποδοχέων (*Levin & Hammes, 2016*), όπως περιγράφηκε προηγουμένως (ενότητα 1.1.1). Οι ERs παρόλο που αποτελούνται από διατηρημένες εξελικτικά δομικές και λειτουργικές περιοχές (*Heldring et al., 2007*), παρουσιάζουν σημαντικές λειτουργικές διαφορές (*Beato & Klug, 2000*), διαφορετική ιστική κατανομή και διαφορετικά πρότυπα ενεργοποίησης γονιδίων (*Psarra & Sekeris, 2008*).

Παρά τις όποιες ομοιότητες, οι δύο υπότυποι είναι δομικά και λειτουργικά διακριτοί αναφορικά με: την αναγνώριση του προσδέτη, την ενεργοποίηση του υποδοχέα και τα γονίδια-στόχους που ρυθμίζουν. Οι ER α και ER β παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομοιότητας όταν συγκρίνονται σε επίπεδο αμινοξέων. Η ομολογία της αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ ER α και ER β ανέρχεται στο 97% στην περιοχή δέσμευσης του DNA (DBD), στο 30% στην περιοχή της άρθρωσης (D) και περίπου στο 59% στην περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (LBD) που περιέχει την AF-2, η οποία είναι σημαντική για δομικές αλλαγές που επάγονται από τη δέσμευση προσδέτη (*Cui et al., 2013*). Λόγω αυτού, θα μπορούσαμε να εξαγάγουμε το συμπέρασμα ότι οι δύο αυτοί υπότυποι αλληλεπιδρούν με πανομοιότυπες αλληλουχίες στο DNA (Estrogen Response Elements, EREs) και σε μικρότερο ποσοστό εμφανίζουν συγγένεια για ενδογενείς ή μη προσδέτες (*Lee et al., 2012*). Παρόλο που έχουν όμως σχεδόν πανομοιότυπες DBDs, ο ER β έχει χαμηλότερη συγγένεια για τα EREs. Έτσι, οι ERs υφίστανται αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωσή τους, που είναι ειδικές για κάθε ERE που δεσμεύουν και ευθύνονται για τη διαφορετική μεταγραφική ενεργότητα των ER α και ER β (*Deroo & Buensuceso, 2010*). Το αποτέλεσμα είναι να στρατολογούν διαφορετικούς συν-ενεργοποιητές. Ακόμα, το NH₂-τελικό άκρο τους είναι ελάχιστα

ομόλογο, με το αντίστοιχο ποσοστό να μην υπερβαίνει το 20% (Εικόνα 3). Το γεγονός ότι η περιοχή AF-1, η οποία δεσμεύεται στον πρωτογενή μηχανισμό μεταγραφής απευθείας ή μέσω συν-ρυθμιστών, είναι η πιο αποκλίνουσα περιοχή μεταξύ των δύο υποδοχέων, υποδεικνύει ότι οι δύο υπότυποι συμμετέχουν σε διαφορετικές ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης. (Cui *et al.*, 2013). Αν και οι ERα και ERβ δεν έχουν υψηλή ομολογία στην LBD, τα κατάλοιπα που είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τον θύλακα δέσμευσης του προσδέτη είναι περισσότερο συντηρημένα και φέρουν μόνο δύο διαφοροποιήσεις στην αλληλουχία των αμινοξέων. Οι διαφορές είναι ότι ο ERα φέρει Met 421 και Leu 384 έναντι Ile 373 και Met 336 που φέρει ο ERβ αντίστοιχα (Dahlman-Wright *et al.*, 2006).



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των δύο ανθρώπινων ERs, ERα και ERβ. Και οι δύο υποδοχείς αποτελούνται από έξι λειτουργικές περιοχές, με το ποσοστό ομολογίας μεταξύ των δύο υποτύπων να παρουσιάζεται για κάθε περιοχή (Cui, 2013).

Όπως συζητήθηκε και προηγουμένως (ενότητα 1.1.1), η μεταγραφική ενεργοποίηση διεκπεραιώνεται από δύο ξεχωριστές περιοχές ενεργοποίησης (AF), τη συστατικώς δραστική AF-1 που βρίσκεται στο NH₂-τελικό άκρο των ERs και την εξαρτώμενη από τον προσδέτη AF-2 που βρίσκεται στην COOH-τελική περιοχή, στην LBD. Και οι δύο AF περιοχές «στρατολογούν» μια σειρά συσσωματωμένων πρωτεϊνών, συζευγμένων στον υποδοχέα που είναι συνδεδεμένος με το DNA (Heldring *et al.*, 2007). Ο ERβ φαίνεται πως έχει ασθενέστερη λειτουργία AF-1 και συνεπώς εξαρτάται περισσότερο από την εξαρτώμενη από προσδέτη AF-2 περιοχή. Να σημειωθεί ακόμη ότι η σχετική σπουδαιότητα των λειτουργιών των περιοχών ενεργοποίησης AF-1 και AF-2 εξαρτάται από το κυτταρικό πλαίσιο και τους εκάστοτε υποκινητές (Dahlman-Wright *et al.*, 2006).

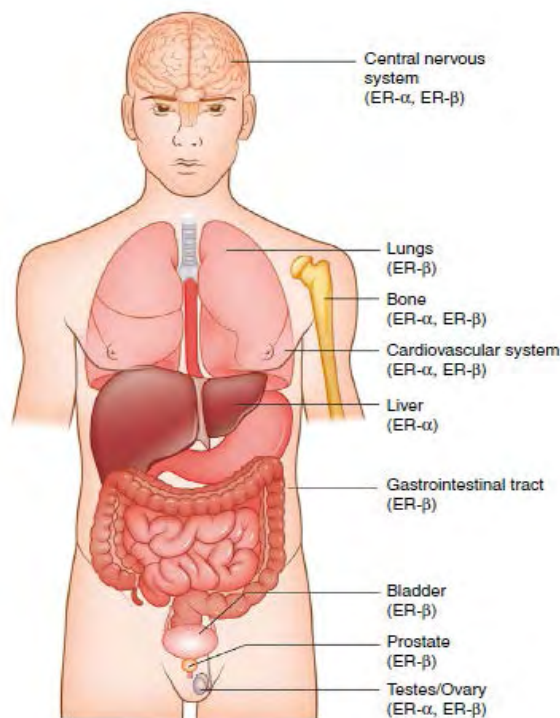
1.4.2 Κατανομή στους ιστούς

Οι δύο υπότυποι του ER έχουν διαφορετικές μεταγραφικές δραστηριότητες, με αποτέλεσμα να επιδεικνύουν διαφορετικές βιολογικές δράσεις. Τις ιστοειδικές τους δράσεις επιβεβαιώνουν τόσο τα πρότυπα έκφρασης τους, όσο και οι διαφορετικοί φαινοτύποι (παρήχθησαν με την αποσιώπηση των γονιδίων αμοτέρων των ERα και ERβ) που παρατηρήθηκαν σε knockout ποντικού. Παρόλο που οι δύο υποδοχείς δυνητικά αναγνωρίζουν ίδιες αλληλουχίες DNA, οι στόχοι τους δεν είναι πάντα ίδιοι (Zhao *et al.*, 2007). Το γεγονός αυτό ενισχύει την πεποίθηση ότι οι δύο υποδοχείς παρουσιάζουν αλληλεπικαλυπτόμενους αλλά διακριτούς ρόλους στην σηματοδότηση των οιστρογόνων (Εικόνα 4), όπως αποδεικνύεται και από διάφορες μελέτες σε προφίλ γονιδιακής έκφρασης (Zhao *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012).

Οι δύο υπότυποι μπορούν να ανιχνευθούν σε ένα ευρύ φάσμα ιστών. Σε ορισμένα όργανα και οι δύο εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα, ενώ σε άλλα κυριαρχεί είτε ο ένας είτε ο άλλος υπότυπος. Επιπλέον, και οι δύο υπότυποι μπορεί να υπάρχουν στον ίδιο ιστό αλλά σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων (*Dahlman-Wright et al., 2006*).

Πιο συγκεκριμένα, ο ERα εκφράζεται κυρίως σε αναπαραγωγικούς ιστούς όπως η μήτρα και η ωοθήκη, στο στήθος, στην υπόφυση, στα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα, στο λευκό και καφέ λιπώδη ιστό, στον προστάτη, στο δέρμα, στο σκελετικό μυ, στην αορτή, στο νεφρό, στη χοληδόχο κύστη, στα κύτταρα του Leidig και στα οστά. Όσον αφορά τον ERβ, τα επίπεδα mRNA του είναι υψηλότερα στις ωοθήκες, στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο καρδιαγγειακό σύστημα, στους πνεύμονες, στα αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα, στον προστάτη, στο παχύ έντερο, στο γαστρεντερικό σωλήνα, στον υποθάλαμο, στο ανοσοποιητικό σύστημα, στους σιελογόνους αδένες, στο μυελό των οστών και στα νεφρά (*Deroo & Buensuceso, 2010; Jia et al., 2015; Dahlman-Wright et al., 2006*). Στον εγκέφαλο, αμφότεροι οι δύο υπότυποι κατανομονται ευρέως και εκφράζονται σε νευρωνικούς και μη νευρωνικούς κυτταρικούς τύπους, με τα χωροχρονικά μοτίβα κατανομής και τα επίπεδα έκφρασης τους να είναι διακριτά (*Cui et al., 2013*).

Μελέτες αποδεικνύουν ότι ο ERβ μπορεί να υποκαταστήσει τον ERα σε ορισμένες βιολογικές οδούς και επιπλέον οι δύο ERs μπορούν να αλληλεπιδρούν με τα ίδια EREs. Οι δύο υπότυποι μπορούν επίσης να σχηματίσουν ετεροδιμερή, υποδεικνύοντας ότι σε κύτταρα ιστών που εκφράζουν και τους δύο υποτύπους, ο ERβ φαίνεται να ανταγωνίζεται την ERα-εξαρτώμενη μεταγραφή και η αναλογία των δύο είναι αυτή που επηρεάζει τη δράση των οιστρογόνων και συνεπώς την απόκριση σε αυτά. Η παραπάνω διαπίστωση όμως, φαίνεται πως δεν είναι απόλυτη, καθώς μπορεί να υπάρξει και συνεργασία των δύο υποδοχέων (*Heldring et al, 2007; Olefsky, 2001*).

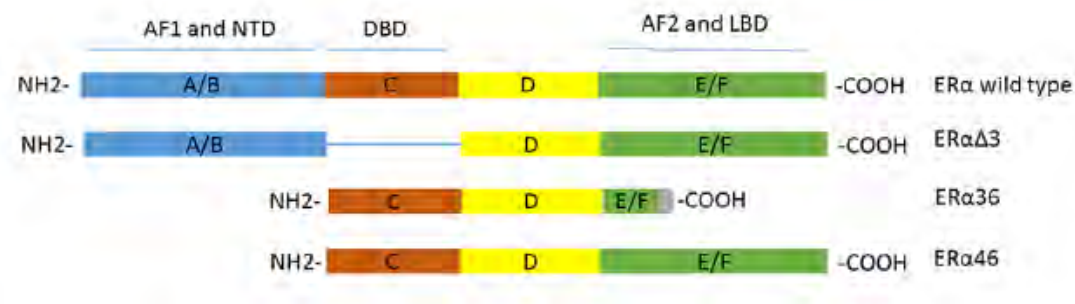


Εικόνα 4. Οι ERα και ERβ παρουσιάζουν διακριτή κατανομή στους διάφορους ιστούς (*Warner, 2017*).

1.4.3 Ισομορφές

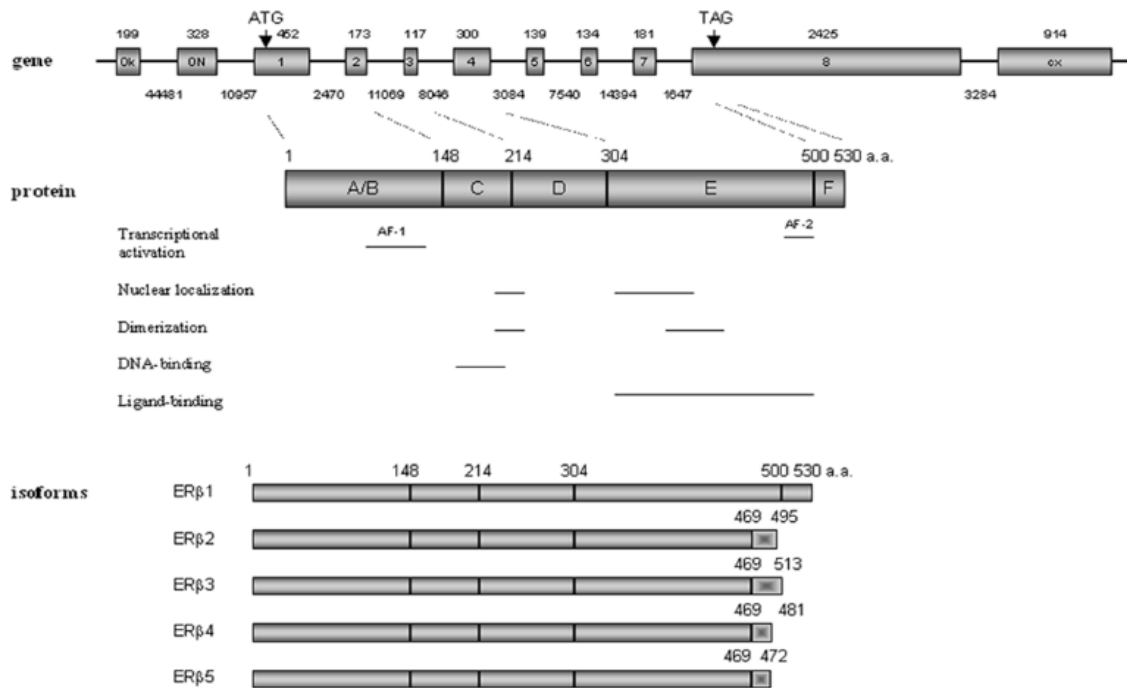
Από το γονίδιο ESR1 κωδικοποιείται μια πρωτεΐνη 595αα με μοριακό βάρος 66 KDa, ενώ από το γονίδιο ESR2 κωδικοποιείται μια πρωτεΐνη 530αα με μοριακό βάρος 60 KDa (Lee et al, 2012).

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός πως πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι κολοβωμένες μορφές του ERα υπάρχουν σε διάφορα όργανα (Levin & Hammes, 2016). Λόγω του εναλλακτικού ματίσματος των ER-mRNAs, εντοπίστηκαν τρεις ισομορφές του ERα (Εικόνα 5). Το εναλλακτικό μετάγραφο ERαΔ3 στερείται εξονίου 3, το οποίο κωδικοποιεί μέρος της DBD. Το μετάγραφο ERα36 στερείται αμφοτέρων των AF-1 και AF-2 και τα τελευταία 138 αμινοξέα αντικαθίστανται με μια μοναδική αλληλουχία 22 αμινοξικών καταλοίπων. Το ERα46, που στερείται των αμινοξέων 1-173 που αντιστοιχούν στην AF-1, αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά και χαρακτηρίστηκε ως ένας κυρίαρχος αρνητικός αναστολέας της ERα-δραστικότητας σε οστεοβλάστες (Jia et al., 2015). Τόσο το ERα36 όσο και το ERα46 έχουν αναφερθεί στη μεμβράνη, ειδικά σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού (Levin & Hammes, 2016).



Εικόνα 5. Οι δομές των ERα ισομορφών. Οι διάφορες λειτουργικές περιοχές διακρίνονται με διαφορετικά χρώματα (Jia et al., 2015).

Επιπλέον, πολλαπλές ισομορφές του ERβ υφίστανται ως αποτέλεσμα είτε εναλλακτικού ματίσματος, είτε απαλοιφής ενός ή περισσότερων κωδικών εξονίων, είτε εναλλακτικής χρήσης μη μεταφρασμένων εξονίων στην 5' περιοχή (Εικόνα 6). Το ανθρώπινο mRNA του ERβ που μεταγράφεται από 8 εξόνια, ονομάζεται ERβ1. Τα εναλλακτικά μετάγραφα ERβ2-5 μοιράζονται πανομοιότυπες αλληλουχίες με τον ERβ1 από το εξόνιο 1 έως το εξόνιο 7 αλλά έχουν μοναδικές αλληλουχίες στη θέση του εξονίου 8. Οι διαφορές στις αμινοξικές αλληλουχίες μεταξύ των 5 ισομορφών του ERβ αρχίζουν στο αμινοξύ 469 εντός της LBD και εκτείνονται μέχρι το COOH-άκρο. Οι ισομορφές ERβ4 και ERβ5 ταυτοποιήθηκαν αρχικά ως κολοβωμένα μετάγραφα που περιείχαν μόνο ένα μέρος του κοινού εξονίου 7 και διαφορετικές αλληλουχίες του εξονίου 8 (Zhao et al., 2007; Younes & Honma, 2011). Η ανθρώπινη ισομορφή ERβ2 (επίσης γνωστή ως ERβcx) κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 495αα, με μοριακό βάρος 55,5 kDa. Το μετάγραφο έχει ένα μοναδικό COOH-τελικό άκρο, λόγω εναλλακτικού ματίσματος κατά το οποίο τα αμινοξέα που αντιστοιχούν στο εξόνιο 8 αντικαθίστανται με 26 μοναδικά αμινοξέα. Έτσι, ο ERβ2 στερείται της AF-2 επικράτειας και έχει μη ανιχνεύσιμη συγγένεια για την οιστραδιόλη και άλλους προσδέτες (Zhao et al., 2007).



Εικόνα 6. Δομή του ανθρώπινου γονιδίου ERβ, της πρωτεΐνης και των λειτουργικών περιοχών, καθώς και των mRNA ισόμορφων. **Γονίδιο:** τα εξόνια υποδεικνύονται με κουτιά και τα ιντρόνια με γραμμές. Οι αριθμοί πάνω από κάθε πλαίσιο υποδεικνύουν το μέγεθος των εξονίων (bp). Οι αριθμοί κάτω από κάθε γραμμή υποδηλώνουν το μέγεθος των αντίστοιχων ιντρόνιων (bp). **Πρωτεΐνη:** οι αριθμοί υποδεικνύουν το συνολικό μέγεθος της πρωτεΐνης σε αμινοξέα. **Ισομορφές:** η σκιασμένη ράβδος δείχνει τις αποκλίνουσες περιοχές του COOH-τελικού άκρου μεταξύ των ισομορφών (Zhao et al, 2007).

1.5 Μηχανισμοί δράσης των υποδοχέων οιστρογόνων

Η δράση των οιστρογόνων είναι αποτέλεσμα τόσο ER-εξαρτώμενης όσο και ER-ανεξάρτητης σηματοδότησης. Επίσης έχει αναγνωριστεί και η ύπαρξη τόσο προσδετοεξαρτώμενης όσο και προσδετοανεξάρτητης δράσης του υποδοχέα οιστρογόνων (Vrtačnik et al., 2014; Cui et al., 2013).

1.5.1 Μονοπάτι 1^ο: ER-εξαρτώμενη, γενωμική σηματοδότηση

Η ER-εξαρτώμενη οδός μπορεί διακριθεί σε άμεση ή/και έμμεση γενωμική σηματοδότηση και σε μη γενωμική σηματοδότηση με βάση το αποτέλεσμα κυτταρικών διαδικασιών, όπως η διαμόρφωση της γονιδιακής έκφρασης και η ενεργοποίηση καταρρακτών σηματοδότησης αντίστοιχα. Επιπρόσθετα οι εξαρτώμενες από ER οδοί μπορούν να ξεκινήσουν είτε στον πυρήνα είτε στην πλασματική μεμβράνη.

1.5.1.1 Άμεση γενωμική σηματοδότηση

Και οι δύο υποδοχείς ενεργοποιούνται από τον προσδέτη, διεγείροντας ή καταστέλλοντας τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων τους. Απουσία προσδέτη, οι ERs παραμένουν σε μη ενεργή μορφή, λόγω της σύνδεσης τους με την πρωτεΐνη θερμικού σοκ HSP90. Μετά τη δέσμευση του προσδέτη οι ERs φωσφορυλιώνονται, σχηματίζουν ομοδιμερή (ER α /ER α , ER β /ER β) ή ετεροδιμερή (ER α /ER β) και στη συνέχεια μετατοπίζονται στον πυρήνα (Εικόνα 7), όπου δεσμεύονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες-στόχους του DNA (EREs) (Cui et al., 2013; Lee et al., 2012). Η πλήρης μεταγραφική ενεργοποίηση πραγματοποιείται με τη συνέργεια των AF-1 και AF-2 επικρατειών των ERs. Τα κλασικά EREs αποτελούνται από δύο παλίνδρομες αλληλουχίες που χωρίζονται από μία τρίτη αλληλουχία μήκους τριών νουκλεοτιδίων (a-GGTCA n nnTGACC-t). Ωστόσο, πολλά EREs αποκλίνουν από την παραπάνω ακολουθία (Zhao et al., 2007). Η δέσμευση των ERs σε EREs προάγει την κάμψη του DNA, επιτρέποντας έτσι την πρόσληψη μίας ποικιλίας συν-ρυθμιστών από τον υποδοχέα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός συμπλέγματος που μεταβάλλει τη δομή της χρωματίνης και διευκολύνει την στρατολόγηση του μεταγραφικού μηχανισμού της RNA πολυμεράσης II (Heldring et al., 2007). Αυτοί οι συν-ρυθμιστές περιλαμβάνουν συν-ενεργοποιητές, συν-καταστολείς, ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών, αποακετυλάσες και γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Cui et al., 2013; Lee et al., 2012).

1.5.1.2 Έμμεση γενωμική σηματοδότηση

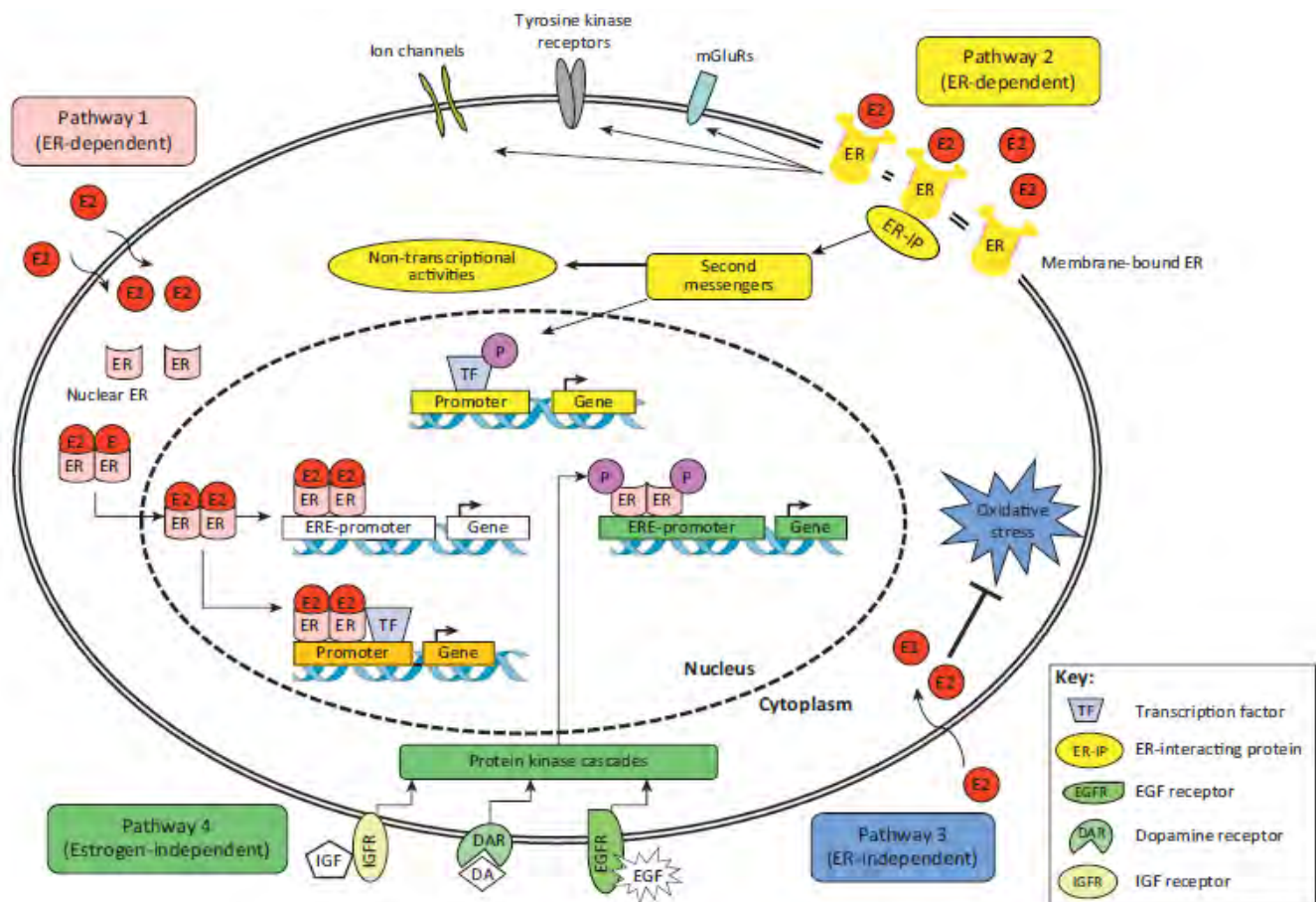
Εκτός από την άμεση δράση των ERs μέσω των EREs, οι υποδοχείς οιστρογόνων μπορούν να ρυθμίζουν τη μεταγραφή και μέσω έμμεσης σύνδεσης τους στο DNA. Το σηματοδοτικό αυτό μονοπάτι είναι γνωστό ως “tethering mechanism” ή “transcriptional cross-talk” (Klinge, 2008). Η E₂ μπορεί να επηρεάσει την έκφραση γονιδίων που δεν φέρουν EREs στην περιοχή του υποκινητή τους. Περίπου το 35% των ανθρώπινων πρωτογενών γονιδίων απόκρισης σε οιστρογόνα μεταγράφονται μέσω αυτού του μηχανισμού. Το αποτέλεσμα της απόκρισης εξαρτάται από τον υπότυπο του ER και τον τύπο του προσδέτη. Οι ERs δεν συνδέονται απευθείας με το DNA, αλλά αλληλεπιδρούν και επηρεάζουν τη δραστηριότητα άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως της Stimulating Protein-1 (SP-1), της Activator Protein-1 (AP-1), του πυρηνικού παράγοντα kB (NF-kB), της CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β), της GATA binding protein 1 (GATA1), του μεταγραφικού παράγοντα STAT-5 και της c-Jun. Μεταξύ των μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται σε αυτήν την οδό, η SP-1 είναι ο πιο σημαντικός μεσολαβητής και ρυθμίζει αρκετά γονίδια που προάγονται από την E₂, όπως τον υποδοχέα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) και τη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS). Ένα ακόμα παράδειγμα αποτελεί η αλληλεπίδραση του συμπλόκου οιστρογόνου-ER με το ομόλογο ογκογονιδίου ποντικού (Fos) και το πρωτοογκογονίδιο Jun, που συνθέτουν την AP-1 σε γονίδια που κωδικοποιούν την ωλοευκωματίνη, τον Insulin-like 1 αυξητικό παράγοντα (IGF1), την κολλαγενάση, την κυκλίνη D1 (CC-ND1) και την ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης. Πρόσφατες γενωμικές μελέτες βρήκαν εμπλουτισμένα μοτίβα AP-1 εντός περιοχών που δεσμεύονται από ERs, υποδεικνύοντας εκτεταμένη διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ των ERs και της AP-1 σε γονιδιακό επίπεδο. Το αποτέλεσμα της απόκρισης εξαρτάται από τον

υπότυπο του ER και τον τύπο του προσδέτη και μπορεί να είναι αντίθετο ακόμη και για τον ίδιο μεταγραφικό παράγοντα, καθώς ενώ ο ERα ενεργοποιεί την εξαρτώμενη από AP-1 μεταγραφή της κυκλίνης D1 παρουσία E_2 σε κύτταρα HeLa, ο ERβ την αναστέλλει (Cui et al., 2013; Marino et al., 2006; Vrtačnik et al., 2014).

1.5.2 Μονοπάτι 2^ο: ER-εξαρτώμενη, μη γενωμική σηματοδότηση

Αυτό το μονοπάτι είναι κυρίως υπεύθυνο για μια σειρά από οξείες, γρήγορες δράσεις οιστρογόνων που συμβαίνουν πολύ πιο γρήγορα από τις μεταγραφικές διαδικασίες (Εικόνα 7) και παίζουν κρίσιμους ρόλους στο νευρικό σύστημα, στον σκελετό και στο ήπαρ (Cui et al., 2013). Οι μη γενωμικές δράσεις είναι κοινές στις στεροειδείς ορμόνες και σχετίζονται συνήθως με την ενεργοποίηση διάφορων καταρρακτών πρωτεϊνών-κινασών που μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε έμμεσες αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση λόγω της φωσφορυλίωσης μεταγραφικών παραγόντων. Η μη γενωμική σηματοδότηση των οιστρογόνων σχετίζεται συχνά με ERs που εντοπίζονται στην μεμβράνη, όπως για παράδειγμα κάποια εναλλακτικά μετάγραφα των ERα και ERβ. Ο ERα είναι ο κύριος ενδογενής μεσολαβητής των ταχέων ενεργειών που συμβαίνουν ως απόκριση στην E_2 , ενώ λιγότερες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για το ρόλο που διαδραματίζει το σύμπλεγμα ERβ- E_2 στην ενεργοποίηση ταχέων μη γενωμικών δράσεων. Αυτά τα ταχέα συμβάντα περιλαμβάνουν τέσσερις κύριους καταρράκτες σηματοδότησης: της φωσφολιπάσης C (PLC)/πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), των Ras/Raf/MAPK κινασών, των PI3K/AKT κινασών και του μονοπατιού cAMP/πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Αυτές οι οδοί παρουσιάζουν πολυάριθμες αλληλεπιδράσεις με αρκετές άλλες οδούς (Vrtačnik et al., 2014; Marino et al., 2006).

Οι μοριακοί μηχανισμοί που πραγματώνουν τη μη γενωμική σηματοδότηση των οιστρογόνων είναι αναμφισβήτητα ποικίλοι και πολυάριθμοι και μπορεί να εξαρτώνται από μια σειρά συνθηκών, όπως είναι η διαθεσιμότητα μορίων μεταγωγής σήματος και καθοδικών στόχων, υποδηλώνοντας έναν μηχανισμό ειδικό για κάθε τύπο κυττάρου. Πράγματι, η επίδραση της E_2 στην δραστηριότητα της PKC έχει παρατηρηθεί στην προοπτική εγκεφαλική περιοχή θηλυκών αρουραίων, αλλά όχι στον υποθάλαμο ή στον φλοιό. Τέλος πολλά ευρήματα ευνοούν την ιδέα ότι ο ER που εντοπίζεται στην μεμβράνη είναι η ίδια πρωτεΐνη με τον πυρηνικά εντοπισμένο υποδοχέα. Έτσι, ίσως οι ERα και ERβ πρέπει να θεωρηθούν ως ένας πληθυσμός πρωτεϊνών που η μετατόπιση τους στο κύτταρο μπορεί να αλλάξει δυναμικά, από τη μεμβράνη στο κυτοσόλιο και στον πυρήνα, ανάλογα με τη δέσμευση του προσδέτη (Vrtačnik et al., 2014; Marino et al., 2006).



Εικόνα 7. Σηματοδοτικά μονοπάτια των δράσεων της E2 και των ERs. Υπάρχουν τέσσερις οδοί σηματοδότησης (Cui et al., 2013).

1.5.3 Μονοπάτι 3ο: ER-ανεξάρτητη σηματοδότηση

Τα οιστρογόνα μπορούν να ασκούν αντιοξειδωτικές επιδράσεις και να καταστέλλουν το οξειδωτικό στρες μέσω μιας οδού ανεξάρτητης από τον ER (Εικόνα 7). Τα οιστρογόνα μπορούν να ρυθμίζουν ενζυμικές δραστηριότητες ή να αλληλεπιδρούν με πυρηνικούς στεροειδείς υποδοχείς, που δεν σχετίζονται με το φύλο (non-sex nuclear steroid receptors) για την προστασία από βλάβες των κυττάρων. Προλαμβάνουν αποτελεσματικά το προ-οξειδωτικό στρες περιορίζοντας την απελευθέρωση των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) από μιτοχόνδρια που έχουν υποστεί βλάβη, μέσω του φαινολικού τους δακτυλίου A, ο οποίος είναι ένα εγγενές αντιοξειδωτικό και παρέχει αντιοξειδωτική/οξειδοαναγωγική δράση σε νευρώνες, συμπληρώνοντας με αυτόν τον τρόπο άλλες νευροπροστατευτικές δράσεις. Ένα μεγάλο σύνολο στοιχείων από νευρώνες έδειξε ότι η E₂ έχει ειδικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες και καταστέλλει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από υπεροξειδίου του υδρογόνου, ανιόντα υπεροξειδίου και άλλα προ-οξειδωτικά μόρια (Cui et al., 2013).

1.5.4 Μονοπάτι 4ο: Προσδετοανεξάρτητη ενεργοποίηση του ER

Ο υποδοχέας οιστρογόνων μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί απουσία E_2 ή άλλου κατάλληλου προσδέτη (Εικόνα 7). Η φωσφορυλίωση των υποδοχέων σε ορισμένα κατάλοιπα ή οι συσχετιζόμενοι συν-ρυθμιστές αυτών, μπορούν να προκαλέσουν ενεργοποίηση ενός ER-προσδετοανεξάρτητου σηματοδοτικού μονοπατιού. Τα δύο πιο συχνά στοχευόμενα αμινοξέα είναι η σερίνη και η τυροσίνη. Οι οδοί σηματοδότησης που είναι υπεύθυνες για αυτή τη ρύθμιση, περιλαμβάνουν ρυθμιστές γενικής κυτταρικής φωσφορυλιωμένης κατάστασης, όπως η πρωτεϊνική κινάση A (PKA) ή πρωτεϊνική κινάση C (PKC), εξωκυτταρικά σήματα όπως πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες ή νευροδιαβιβαστές και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου. Τα βασικά ενδιάμεσα μεταξύ των αυξητικών παραγόντων και των ERs είναι μεταξύ άλλων, η πρωτεΐνη $p21^{ras}$ (guanine nucleotide-binding protein) και ο MAPK καταρράκτης φωσφορυλίωσης. Πρόσθετα εξωκυτταρικά σήματα που ρυθμίζουν την δραστικότητα του ER περιλαμβάνουν την ερεγουλίνη, την ιντερλευκίνη 2, την ντοπαμίνη καθώς και τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες, κυκλίνη A και D1 (Vrtačnik et al., 2014).

Ανάλογα με το ποια σημεία του ERα φωσφορυλιώνονται, η φωσφορυλίωση μπορεί είτε να αυξήσει είτε να αναστείλει τη δέσμευση του υποδοχέα στο DNA και να μεταβάλει τον πυρηνικό εντοπισμό του με τελικό αποτέλεσμα της μεταβολή της γονιδιακής μεταγραφής. Επίσης, η MAPK κινάση φωσφορυλιώνει το NH_2 -τελικό άκρο του ERβ, ενισχύοντας την αλληλεπίδραση ERβ-SRC-1-CBP και την μεταγραφή γονιδίου. Η έκφραση του ERβ και του ERβ2 αυξάνει την πρωτεολυτική αποικοδόμηση του ERα (Heldring et al., 2007). Η δέσμευση της E_2 προάγει την ουβικουιλίνωση του ERα, οδηγώντας τον στο 26S πρωτεάσωμα. Άλλες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν επίσης την δραστικότητα των ERα και ERβ είναι η γλυκοζυλίωση και η σουμοϋλίωση (Klinge, 2008).

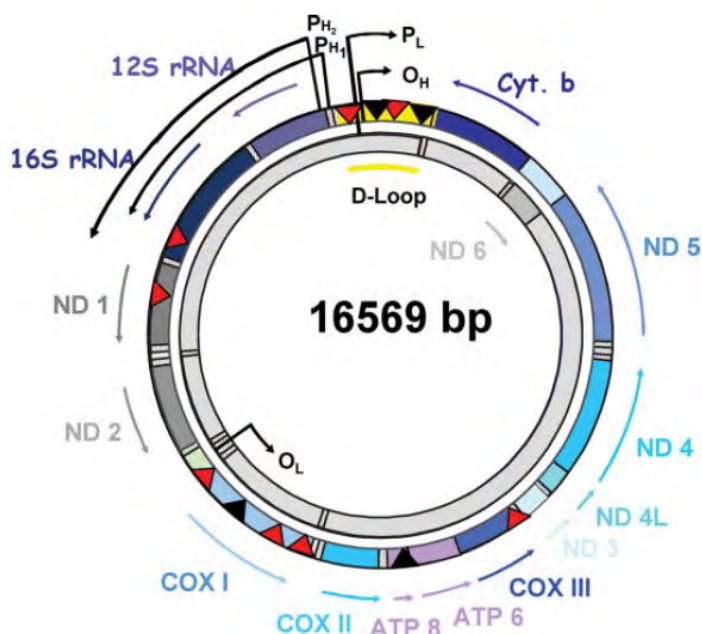
1.6 Οιστρογόνα, ERs και μιτοχόνδρια

1.6.1 Τα μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι βασικά κυτταρικά οργανίδια που ευθύνονται για την παραγωγή ενέργειας και την απόπτωση. Τα στεροειδή και οι θυρεοειδικές ορμόνες δρουν στο μεταβολισμό και στην ανάπτυξη διαμορφώνοντας τις παραπάνω ζωτικές λειτουργίες (Psarra et al., 2006). Τα μιτοχόνδρια παρέχουν περισσότερο από το 90% των ενεργειακών απαιτήσεων του κυττάρου μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην αναπνευστική αλυσίδα. Ακόμα εμπλέκονται σε πολλά στάδια του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή ουρίας, στη βιοσύνθεση αίμης και στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων (Psarra & Sekeris, 2008). Επιπλέον, παίζουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες, μέσω της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), στην ανοσορρύθμιση, στη διαφοροποίηση των κυττάρων, στην κυτταρική αναπνοή, στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, στην ιοντική ομοιόσταση και στη γήρανση. Οι μιτοχονδριακές λειτουργίες εκτελούνται σε συνεργασία και με άλλα κυτταρικά

διαμερίσματα, ιδίως με τον πυρήνα, και ρυθμίζονται από διάφορα εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά σήματα (Psarra & Sekeris, 2008; Yang et al., 2009).

Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι ένα δίκλωνο, κυκλικό γονιδίωμα 16,6 kb, το οποίο κωδικοποιεί για 37 γονίδια που αντιστοιχούν σε περίπου 3000 πρωτεΐνες. Το mtDNA στερείται ιντρονίων και ιστονών (Εικόνα 8). Από τις χιλιάδες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο μιτοχονδριακό πρωτέωμα, το mtDNA κωδικοποιεί μόνο τις 13 από τις 80 πρωτεΐνες των συμπλόκων I, II, III, IV, και V της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electron transport chain, ETC). Οι υπόλοιπες υπομονάδες της ETC καθώς και άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό και τη λειτουργία του mtDNA, κωδικοποιούνται στον πυρήνα. Οι δύο κλώνοι του DNA μπορούν να διακριθούν σε βαρύ (H) και ελαφρύ (L) κλώνο με βάση την περιεκτικότητά τους σε ζεύγη βάσεων G+T. Ο κλώνος H κωδικοποιεί 2 rRNAs, 14 tRNAs και 12 πρωτεΐνες, ενώ ο κλώνος L κωδικοποιεί άλλα 8 tRNAs και μία μόνο πρωτεΐνη. (Simpkins et al., 2010; Klinge, 2008).



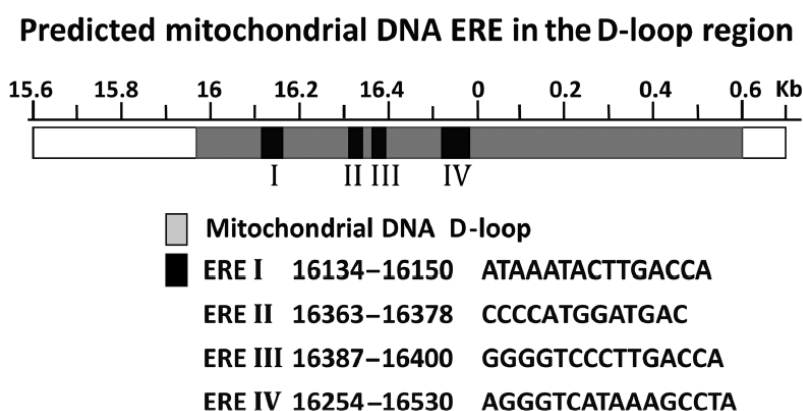
Εικόνα 8. Η οργάνωση του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) των θηλαστικών. Το mtDNA κωδικοποιεί για τρεις υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης (I, II και III, COX I, COX II, COX III), επτά της NADH-CoQ αναγωγάσης (ND 1-6 και ND4L), μία του κυτοχρώματος b (cyt-b), δύο της ATP συνθάσης (ATP 6, 8), καθώς και δύο ριβοσωμικά RNAs (12S και 16S rRNA) και 22 tRNAs (Psarra & Sekeris, 2008).

Η μεταγραφή του mtDNA γίνεται από δύο υποκινητές (P_L και P_H) που βρίσκονται στην ρυθμιστική περιοχή του βρόγχου-D (D-loop) μέσω της δέσμευσης της πολυμεράσης του mtRNA και των μεταγραφικών παραγόντων **TFAM** (ονομάζεται επίσης mtTFA και είναι κρίσιμη πρωτεΐνη για την αντιγραφή, μεταγραφή και διατήρηση του mtDNA) και **TFB** (μεταγραφικός παράγοντας B, TFB1M και TFB2M). Τα *tfam*, *tfb1m* και *tfb2m* γονίδια κωδικοποιούνται στον πυρήνα και η μεταγραφή τους ρυθμίζεται από τον NRF-1 (Nuclear respiratory factor 1). Αν και η έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων εξαρτάται από τη λειτουργία του πυρηνικού γονιδιώματος, η μιτοχονδριακή δραστηριότητα ρυθμίζει την έκφραση των πυρηνικών γονιδίων. Η ύπαρξη των ERα και ERβ έχει ταυτοποιηθεί στα μιτοχόνδρια και οι υποδοχείς δεσμεύονται στην D-loop του mtDNA ποντικού και ανθρώπου. Δεν είναι σαφές εάν οι

ERα και ERβ ρυθμίζουν άμεσα τη μεταγραφή του mtDNA ή εάν αυτό το αποτέλεσμα προκαλείται από γονίδια που κωδικοποιούνται στον πυρήνα. Παρ' όλα αυτά, η παρουσία του ER τόσο στον πυρήνα όσο και στα μιτοχόνδρια παρέχει έναν πιθανό μηχανισμό για τον συντονισμό της έκφρασης του mtDNA και των γονιδίων του μιτοχονδριακού αναπνευστικού συμπλέγματος (Mitochondrial respiratory complex, MRC) που κωδικοποιούνται πυρηνικά (Klinge., 2008; Chen et al., 2009).

Σε διάφορες θέσεις του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, π.χ. στην περιοχή του βρόχου D, έχουν εντοπιστεί HREs (Εικόνα 9). Η παρουσία των HREs στη ρυθμιστική θέση του γονιδίου του mtTFA θα μπορούσε να καταστήσει αυτό το γονίδιο ως στόχο ορμονικής σηματοδότησης, εξασφαλίζοντας έτσι ένα συντονισμό της ορμονικά επαγόμενης μεταγραφής του πυρηνικού αυτού γονιδίου και των μιτοχονδριακών γονιδίων της OXPHOS.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω υποστηρίζουν έντονα τον συντονισμό της μεταγραφής πυρηνικών γονιδίων και μιτοχονδριακών γονιδίων της OXPHOS μέσω της επίδρασης στεροειδών ορμονών. Αυτές οι επιδράσεις φαίνεται να προκαλούνται, τουλάχιστον εν μέρει, από υποδοχείς ορμονών που υπάρχουν ή μετατοπίζονται σε μιτοχόνδρια μετά από ορμονική διέγερση (Psarra et al., 2006).



Εικόνα 9. Οι προβλεπόμενες ERE-like αλληλουχίες στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Τέσσερις τέτοιες αλληλουχίες βρίσκονται στην επικράτεια D-βρόχου του mtDNA (Liao et al., 2015).

1.6.2 Μιτοχονδριακός εντοπισμός του ERβ

Οι πρώτες αναφορές για την παρουσία υποδοχέων οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια βασίστηκαν στην κατανομή και τη δέσμευση ραδιοενεργά σημασμένων προσδετών (Psarra et al., 2006). Αργότερα, χρησιμοποιώντας υποκυτταρική κλασμάτωση, ανοσοαποτύπωση κατά Western και συνεστιακή μικροσκοπία, ερευνητές έδειξαν ότι ένα σημαντικό κλάσμα (περίπου 20%) του ολικού κυτταρικού ERβ εντοπίζεται εντός της μιτοχονδριακής μήτρας της ανθρώπινης καρκινικής κυτταρικής σειράς μαστού MCF-7 και ότι η E₂ ενισχύει την είσοδο του ERβ σε μιτοχόνδρια κυττάρων MCF-7 με τρόπο εξαρτώμενο από το χρόνο και τη δόση. Πράγματι ο ERβ εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια ποικίλων ιστών, όπως οι ωοθήκες και η μήτρα κουνελιού, τα επιθηλιακά κύτταρα του ανθρώπινου φακού, τα σπερματοκύτταρα, ο πρωτογενής εγκεφαλικός φλοιός, οι νευρώνες του ιππόκαμπου, τα πρωτογενή καρδιομυοκύτταρα, καθώς επίσης και στα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυτταρικών σειρών HepG2, SaOS-2 και

MCF-7 (*Simpkins et al., 2008; Chen et al., 2009*). Αν και σε μερικά κυτταρικά μιτοχόνδρια έχει ταυτοποιηθεί η ύπαρξη τόσο του ERα όσο και του ERβ, στις περισσότερες περιπτώσεις ο κυρίαρχος ή μοναδικός υπότυπος είναι ο ERβ (*Psarra & Sekeris, 2006*). Έτσι ο εντοπισμός του ERβ στα μιτοχόνδρια (mtERβ) υποδηλώνει ότι ο υποδοχέας μπορεί να λειτουργήσει ως μιτοχονδριακό συστατικό (*Yang et al., 2009*).

Η παρουσία του ERβ1 αλλά όχι των ERβ2 και ERβ5 σε μιτοχόνδρια πολλών τύπων κυττάρων και ιστών υποδηλώνει ότι, όπως και άλλες μιτοχονδριακά εντοπισμένες πρωτεΐνες, ο ERβ1 εισάγεται στα μιτοχόνδρια μέσω μηχανισμών εισαγωγής μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Τέλος, η παρουσία των ERα και ERβ στα μιτοχόνδρια των ιστών του μαστού, της καρδιάς, του εγκεφάλου, των οστών, των ματιών και του σπέρματος, που έχουν υψηλή ζήτηση για παροχή ενέργειας από τα μιτοχόνδρια, υποδεικνύει ότι οι mtERα και mtERβ μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού (*Chen et al., 2009*).

1.6.3 Είσοδος του ERβ στο μιτοχόνδριο

Οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται πυρηνικά, συντίθενται στα κυτταροπλασματικά ριβοσώματα (πρόδρομες πρωτεΐνες-preproteins) και στη συνέχεια κατευθύνονται προς υποδοχείς-εισαγωγείς στην εξωτερική επιφάνεια των μιτοχονδρίων. Οι πρωτεΐνες αυτές διαθέτουν συνήθως αμινοτελικές ακολουθίες ή εσωτερικά σήματα στόχευσης (20-50aa), απαραίτητα για την εισαγωγή τους στα μιτοχόνδρια. Αυτές οι αλληλουχίες αμινοξέων αποτελούν το μηχανισμό διακίνησης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες που δεν περιέχουν αλληλουχίες σύνδεσης για τέτοιους υποδοχείς, αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς (chaperones), μέσω ειδικών αλληλουχιών (*Simpkins et al., 2008; Chen et al., 2009*).

Η πλειονότητα των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών εισάγονται στα μιτοχόνδρια μέσω της μετατόπισης του συμπλέγματος της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης **Tom**, ενός συμπλέγματος πολλαπλών υπομονάδων που περιέχει συγκεκριμένους υποδοχείς-εισαγωγείς. Όλες οι Tom πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια, ενώ το σύμπλεγμα αποτελείται από τουλάχιστον 7 υποδοχείς. Οι Toms είναι αγκυροβολημένοι στην εξωτερική μεμβράνη με μία απλή διαμεμβρανική α-έλικα, που βρίσκεται στο NH₂-τελικό άκρο στην περίπτωση των Tom20 και Tom70 ή στο COOH-τελικό άκρο στην περίπτωση των Tom22, Tom5 και Tom6. Ακόμα οι πρωτεΐνες πορίνες και ο Tom40 έχουν δομή β-βαρελιού. Οι Tom20 και Tom70 αποτελούν τους κύριους υποδοχείς και είναι επιφορτισμένοι με τη λειτουργία δέσμησης. Τα υπόλοιπα συστατικά του συμπλέγματος σχηματίζουν τον πόρο μετατόπισης. Κάθε υποδοχέας εισόδου δεσμεύει συγκεκριμένες μιτοχονδριακές πρόδρομες πρωτεΐνες με διαφορετική εξειδίκευση. Ο **Tom20** αναγνωρίζει κατά προτίμηση μιτοχονδριακές προ-ακολουθίες (presequences) και preproteins με εσωτερικά σήματα στόχευσης. Γενικά, οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζονται αρχικά από τον Tom20 και στη συνέχεια από τον **Tom22**, υποδεικνύοντας ότι ο ανθρώπινος Tom22 μπορεί να συμπληρωθεί με τον Tom20. Έχει καταδειχθεί επίσης, ότι οι κυτοσολικοί τομείς των δύο αυτών υποδοχέων προάγουν τη διατήρηση των preproteins σε μη αναδιπλωμένη κατάσταση και αποτρέπουν τη συσσωμάτωσή τους στην επιφάνεια των μιτοχονδρίων. Οι υδρόφοβες πρόδρομες πρωτεΐνες με εσωτερικά σήματα στόχευσης

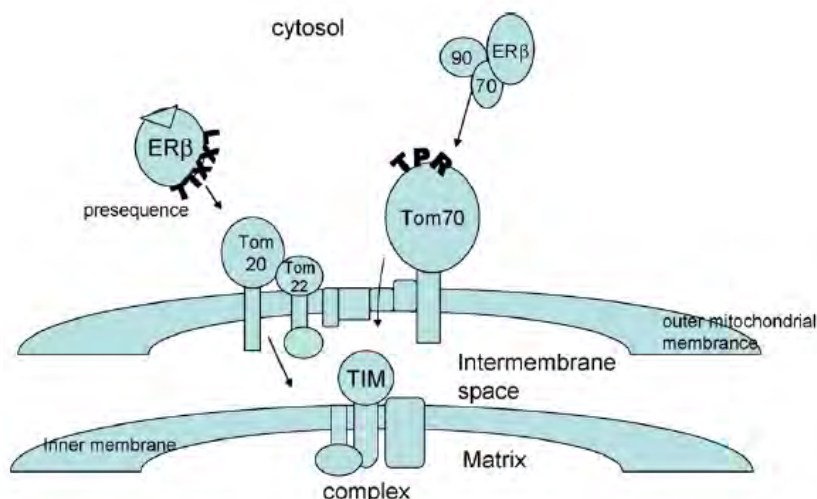
αναγνωρίζονται αρχικά από τον Tom70, ο οποίος στη συνέχεια συνεργάζεται με πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς (chaperones) που βοηθούν στη(v):

(i) κανονική αναδίπλωση πολυπεπτιδίων

(ii) επανάκτηση της φυσικής κατάστασης πρωτεϊνών που δεν έχουν αναδιπλωθεί σωστά

(iii) ρύθμιση της αποικοδόμησης πρωτεϊνών και στην πρωτεϊνική μετατόπιση σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Τόσο η HSP90 όσο και η HSP70 δεσμεύουν πρωτεΐνες και τις προωθούν στον Tom70 μέσω των TPR μοτίβων που εκείνος περιέχει (Εικόνα 10). Επειδή το σύμπλεγμα Tom δρα ως κεντρική πύλη εισόδου για πυρηνικά κωδικοποιούμενες μιτοχονδριακές preproteins, η βιογένεση του υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο και οι NRF1, NRF2 εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης των μιτοχονδριακών Tom20/22/70. Ο NRF2 επίσης, έχει αποδειχθεί ότι είναι κρίσιμος για τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων μεταγραφής του γονιδίου Tom20 (Simpkins et al., 2008; Chen et al., 2009).

Έχει προταθεί πως ο ERβ έχει τουλάχιστον τρεις εναλλακτικούς τρόπους εισόδου στα μιτοχόνδρια: (i) μέσω των Hsp70/Hsp90 μεταφέρεται στον Tom70 όταν δεν έχει δεσμεύσει προσδέτη, (ii) μέσω του μοτίβου LXXLL (όπου L= λευκίνη, X= οποιοδήποτε αμινοξύ) που υπάρχει είτε ως αλληλουχία-οδηγός στο NH₂-τελικό του άκρο, είτε ως εσωτερική αλληλουχία, μεταφέρεται στο σύμπλοκο Tom20/Tom22 όταν δεσμευθεί σε αυτόν ο προσδέτης, και (iii) μέσω μιας εσωτερικής αλληλουχίας μεταφέρεται στην Hsp70, που με τη σειρά της τον κατευθύνει στον Tom70 όταν δεν υπάρχει συνδεδεμένος προσδέτης. Αφού εισέλθει διαμέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης στον ενδιάμεσο χώρο, τελευταίο βήμα σε κάθε περίπτωση είναι η μεταβίβαση του υποδοχέα στο σύμπλοκο TIM μέσω του οποίου εισέρχεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου (Simpkins et al., 2008; Chen et al., 2009).



Εικόνα 10. Πιθανοί μηχανισμοί εισόδου του ERβ στα μιτοχόνδρια (Simpkins et al., 2008).

1.6.4 Δράσεις των οιστρογόνων και των ERs στα μιτοχόνδρια

Πειραματικά στοιχεία υποστηρίζουν τη δράση των μιτοχονδριακά εντοπισμένων μεταγραφικών παραγόντων στη μιτοχονδριακή μεταγραφή, την ενεργειακή απόδοση και την απόπτωση, επεκτείνοντας τον γνωστό πυρηνικό ρόλο αυτών των μορίων εκτός του πυρήνα. Τα περισσότερα από τα γονίδια που ρυθμίζονται από τον ERβ

είναι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Έχει διαπιστωθεί συντονισμός της μεταγραφής πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων όσον αφορά τη ρυθμιστική δράση των στεροειδών ορμονών στην ενεργειακή απόδοση. Κατά συνέπεια, οι ίδιοι υποδοχείς, εντοπισμένοι σε δύο διαφορετικά διαμερίσματα -πυρήνες και μιτοχόνδρια- ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων που εξυπηρετούν μια κοινή λειτουργία μέσω αλληλεπίδρασης με κοινές θέσεις δέσμευσης στα δύο γονιδιώματα. Συνεπώς, η βιογένεση των μιτοχονδρίων ακολουθεί μια διπλή φύση (*Simpkins et al., 2008; Psarra & Sekeris, 2008*).

Όλο και αυξανόμενα στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα μιτοχόνδρια είναι σημαντικοί στόχοι για τις δράσεις των οιστρογόνων. Τα οιστρογόνα έχει αποδειχθεί ότι διεγείρουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS), αναστέλλουν την απόπτωση και προάγουν την ανάπτυξη μέσω της ενεργοποίησης υποδοχέων οιστρογόνων (*Liao et al., 2015*). Επίσης, ενισχύουν τη μιτοχονδριακή λειτουργία ενισχύοντας τη μιτοχονδριακή βιογένεση και διατηρούν τη μέγιστη ικανότητα παραγωγής ενέργειας. (*Liao et al., 2015*). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα οιστρογόνα μπορεί να ασκούν άμεσες ή έμμεσες επιδράσεις στη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Έχει αναφερθεί ότι η E_2 αναστέλλει τη μιτοχονδριακή F_0F_1 -ATPάση, με τη δέσμευση της σε μία από τις υπομονάδες της συνθάσης. Ακόμα, αυξάνει τη δέσμευση του κυτταροπλασματικού Ca^{2+} από τα μιτοχόνδρια παρουσία γλουταμινικού (*Simpkins et al., 2010*). Η ρύθμιση της μιτοχονδριακής βιογένεσης περιλαμβάνει τις συντονισμένες δράσεις τόσο του mtDNA όσο και πυρηνικά κωδικοποιούμενων γονιδιακών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των NRF-1, NRF-2, Tfam και PGC-1a. Ο αριθμός αντιγράφων του mtDNA αποτελεί ένα μέτρο της μιτοχονδριακής βιογένεσης. Αυξημένος αριθμός μιτοχονδρίων και αυξημένο μιτοχονδριακό μέγεθος αποδίδονται στην αυξημένη σηματοδότηση E_2 (*Klinge, 2008*).

Ο ERα είναι απαραίτητος για την αύξηση των περισσότερων πρωτεϊνών του MRC και των αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες (*Klinge, 2008*). Από την άλλη, ο mtERβ μπορεί να μεσολαβήσει άμεσα στις επιδράσεις των οιστρογόνων μέσα στα μιτοχόνδρια. Μπορεί να αυξήσει την μεταγραφή των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων I, III και IV της κυτοχρωμικής οξειδάσης. Ακόμα μπορεί να επάγει την αύξηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και να ρυθμίζει την παραγωγή ελεύθερων ριζών, τη ροή ιόντων Ca^{2+} και την απόπτωση (*Liao et al., 2015; Yang et al., 2004*). Έχει αποδειχθεί πως εμπλέκεται σε δραστηριότητες επιβίωσης κυττάρων. Ο mtERβ μπορεί να αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη BAD (Bcl-2-associated death promoter), οδηγώντας στην καταστολή της ενεργοποίησης της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bax και συνεπώς εμποδίζει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα την καταστολή της απόπτωσης. Επιπλέον, ο mtERβ μπορεί να αλληλεπιδράσει με πυρηνικούς στόχους, συμπεριλαμβανομένου του πυρηνικού αναπνευστικού παράγοντα-1 (NRF-1) και του μεταγραφικού παράγοντα του μιτοχονδρίου A (TFAM), ο οποίος διεγείρει τη μιτοχονδριακή βιογένεση. Περαιτέρω, έχει αποδειχθεί ότι ρυθμιστές του υποδοχέα οιστρογόνων ρυθμίζουν τη ροή του μιτοχονδριακού Ca^{2+} που οδηγεί σε ρύθμιση της φωσφορυλίωσης των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας και της αναπνευστικής ικανότητας. Η άμεση και έμμεση ρύθμιση της OXPHOS, η μιτοχονδριακή βιογένεση και οι αντιαποπτωτικές οδοί που ρυθμίζονται από τον mtERβ μπορεί να συμβάλλουν σε μεταβολές των κυτταρικών μεταβολικών οδών (*Liao et al., 2015*). Επιπροσθέτως, έχει αποδειχθεί ότι ο mtERβ δεσμεύεται σε ERE-like αλληλουχίες στον D-βρόχο του mtDNA ή μπορεί να ασκεί τη

δράση του μέσω ρύθμισης της φωσφορυλίωσης του παράγοντα CREB, επηρεάζοντας τη μιτοχονδριακή μεταγραφή μέσω πρόσδεσης σε στοιχεία απόκρισης στο cAMP (cAMP Response Elements). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του mtERβ και του mtDNA υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα μπορούν να ρυθμίσουν τη μιτοχονδριακή μεταγραφή και να μεταβάλλουν την παροχή ενέργειας στο κύτταρο (Liao et al., 2015; Psarra & Sekeris, 2008).

1.7 Οιστρογόνα, ERs και νευρικό σύστημα

Τα οιστρογόνα είναι αποτελεσματικά νευροπροστατευτικά τόσο in vivo όσο και in vitro (Prokai & Simpkins, 2007). Η οιστραδιόλη χαρακτηρίζεται ως περιφερειακή ορμόνη και νευροστεροειδές. Συντίθεται στον εγκέφαλο ενήλικου αρσενικού και θηλυκού ατόμου, όπου δρα ως αυτοκρινής ή παρακρινής παράγοντας και υπό φυσιολογικές συνθήκες ρυθμίζει τη συναπτική πλαστικότητα, την νευρογένεση, την αναπαραγωγική συμπεριφορά, την επεξεργασία του πόνου και τη γνωστική λειτουργία. Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η οιστραδιόλη δεν είναι μόνο προστατευτική, αλλά μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει και διεργασίες αποκατάστασης στο νευρικό σύστημα. Έχει βρεθεί ότι οι υποδοχείς οιστρογόνων, είτε βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα είτε στα μιτοχόνδρια, συντονίζουν πολλαπλούς καταρράκτες σηματοδότησης με νευροπροστατευτικό ρόλο (Arevalo et al., 2015).

Τα προστατευτικά αποτελέσματα των οιστρογόνων μπορούν να λάβουν χώρα εν μέρει μέσω γενωμικών οδών που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση του ER. Οι ERs εκφράζονται ιδιосуστατικά σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου και είναι σε θέση να επάγουν τη γονιδιακή μεταγραφή μετά από ειδική σύνδεση με οιστρογόνα. Επιπλέον, οι μη-γενωμικές (ή εναλλακτικές) οδοί σηματοδότησης εμπλέκουν εξω-πυρηνικούς ERs ή λειτουργούν ανεξάρτητα από ER-πρόσδεση, την ώρα που η E2-αντιοξειδωτική δράση είναι επίσης ανεξάρτητα από τον ER (Prokai & Simpkins, 2007).

1.7.1 ER-μεσολάβηση

Η E₂ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη νευροπροστασία μέσω των δύο ER-υποτύπων. Για να αποσαφηνιστεί ποιος υπότυπος εμπλέκεται στην E₂-μεσολαβούμενη νευροπροστασία in vivo, χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα μοντέλα knockout ποντικών, συμπεριλαμβανομένων τόσο ERαKO (ERα-knockout) ποντικών, όσο και ERβKO (ERβ-knockout) ποντικών.

Υψηλά επίπεδα mRNA του ERα βρέθηκαν στην ισχαιμική περιοχή penumbra παρουσία ή απουσία E₂. Στην παθολογία και την ανατομία, penumbra αποκαλείται η περιοχή που περιβάλλει ένα ισχαιμικό επεισόδιο, όπως θρομβωτικό ή εμβολικό εγκεφαλικό επεισόδιο. Επιπλέον, πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν πως η E₂ δεν μπορεί να δράσει νευροπροστατευτικά στον εγκέφαλο ωθηκεκτεμένων ERKO ποντικών, υποδηλώνοντας έναν κρίσιμο ρόλο για τον ERα στην προστασία τραυματισμένων ιστών.

Ακόμα, πολλές μελέτες υπερτονίζουν τη σημασία του ERβ στις φυσιολογικές διεργασίες του νευρικού συστήματος, καθώς ERβKO (ERβ-knockout) ποντίκια παρουσιάζουν σημαντική απώλεια νευρώνων στον εγκεφαλικό φλοιό. Το μέγεθος του εγκεφάλου ποντικών ηλικίας δύο ετών, αλλά όχι δύο μηνών, μειώνεται δραματικά

σε σύγκριση με τα ποντίκια μάρτυρες, υποδηλώνοντας ότι η απώλεια νευρώνων εμφανίζεται καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ζώου και όχι αποκλειστικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Έτσι φαίνεται πως ο ERβ είναι σημαντικός στην βασική διατήρηση της νευρωνικής επιβίωσης (*Dhandapani & Brann, 2002*).

1.7.2 Μη γενωμική οδός

Η οδός αυτή προκαλεί την ενεργοποίηση δύο κύριων μονοπατιών σηματοδότησης, της οδού MAPK/ERK και της οδού PI3K/Akt (*Dhandapani & Brann, 2002; Zhao et al., 2004*). Μελέτες σε πρωτογενείς φλοιώδεις νευρώνες έδειξαν ότι η οιστραδιόλη ενεργοποιεί τα δύο αυτά σηματοδοτικά μονοπάτια παράλληλα στους ίδιους νευρώνες (*Arevalo et al., 2015*).

Η κινάση PI3K είναι ένα ένζυμο υπεύθυνο για τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης B (Akt). Η Akt φωσφορυλιώνει σήματα θανάτου όπως ο BAD (BCL-associated death promoter) και η GSK3β (Glycogen Synthase Kinase 3β), με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή τους. Σύμφωνα με μελέτες, η φωσφορυλίωση της Akt αυξήθηκε μόλις 15 λεπτά μετά την χορήγηση E₂ σε ποντικούς και παρέμεινε αυξημένη έως και 24 ώρες μετά (*Dhandapani & Brann, 2002; Zhao et al., 2004*). Επίσης, οι ERα και ERβ ενεργοποιούν παράλληλους νευροπροστατευτικούς μηχανισμούς στον εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής του προαποπτωτικού μορίου c-Jun N-terminal kinase (JNK), που συμμετέχει στο μονοπάτι MAPK/ERK και της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα CREB (cAMP-responsive element binding protein), ο οποίος συμμετέχει στο μονοπάτι PI3K. (*Arevalo et al., 2015*).

1.7.2.1 Ρύθμιση της απόπτωσης

Στον εγκέφαλο, η ενεργοποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης ERK1-ERK2 ή PI3K έχει διπλή φύση. Αφενός προκαλεί τη θετική ρύθμιση της έκφρασης αντιαποπτωτικών μελών της οικογένειας BCL2. Παραδείγματα τέτοιων μορίων αποτελούν τα Bcl-2, Bcl-xl και Bcl-w. Αφετέρου ασκεί αρνητική ρύθμιση στην έκφραση των προαποπτωτικών μορίων-μελών της οικογένειας BCL2, όπως οι BAD, Nip-2 (NEP-interacting protein) και BIM(BCL-2 interacting mediator of cell death). Συνεπώς η έκφραση του Bcl-2 θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως δείκτης νευροπροστατευτικής αποτελεσματικότητας (*Zhao et al., 2010; Simpkins et al., 2008*). Ακόμα η ενεργοποίηση του ER διεγείρει τη μεταγραφή κι ενός άλλου αντιαποπτωτικού γονιδίου, του survivin (διεγείρει μονοπάτια κυτταρικής επιβίωσης), μέσω του μεταγραφικού παράγοντα STAT-3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), ο οποίος με τη σειρά του έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει σε νευροπροστατευτικές δράσεις στην εγκεφαλική ισχαιμία. Ως εκ τούτου καθίσταται φανερό πως η οιστρογονική σηματοδότηση καταστέλλει την αποπτωτική διαδικασία (*Arevalo et al., 2015; Heldring et al., 2007*).

1.7.3 Αντιοξειδωτική δράση

Μια ποικιλία μελετών απέδειξε πως η αντιοξειδωτική δράση των οιστρογόνων δεν φαίνεται να απαιτεί τον κλασικό, ER-εξαρτώμενο μηχανισμό. Πρόσφατες εργασίες υποδεικνύουν ότι η E₂ σε φαρμακολογικές συγκεντρώσεις (μM) μπορεί να λειτουργήσει ως αντιοξειδωτικό, παρεμποδίζοντας την οξείδωση της μεμβράνης. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της E₂ διαμεσολαβείται από τον φαινολικό δακτύλιο A του στεροειδούς, ο οποίος είναι ένας ισχυρός δότης ηλεκτρονίων και παράγοντας δέσμευσης ελεύθερων ριζών και εμποδίζει τη βλάβη της μεμβράνης που προκαλείται από την υπεροξείδωση των λιπιδίων (*Arevalo et al., 2010; Simpkins et al., 2008*).

Ένας επιπλέον μηχανισμός υποστηρίζει πως τα οιστρογόνα έχουν μία άμεση αντιοξειδωτική επίδραση. Σύμφωνα με αυτόν το μηχανισμό, τα οιστρογόνα λαμβάνουν συμμετοχή σε έναν οξειδοαναγωγικό κύκλο, κατά τον οποίο μετατρέπονται σε ένα ενδιάμεσο κινόλης όταν εξαλείφεται μια ελεύθερη ρίζα, χρησιμοποιώντας NADPH ως αναγωγικό παράγοντα. Η παραπάνω διαδικασία αποσκοπεί στην αναγέννηση του γονικού πρόδρομου μορίου των οιστρογόνων, τη χοληστερόλη (*Strom et al., 2007; Prokai & Simpkins, 2007*).

Λόγω της λιποφιλικότητάς τους, τα οιστρογόνα συγκεντρώνονται σε περιοχές του κυττάρου πλούσιες σε λιπίδια, όπως οι κυτταρικές μεμβράνες, και επηρεάζουν τη ρευστότητα της μεμβράνης. Εκτός από τη σύνδεση με τον ER στην κυτταρική μεμβράνη, το κυτοσόλιο και τα πυρηνικά διαμερίσματα, μπορούν επίσης να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων. Ως εκ τούτου, είναι πιθανό τα οιστρογόνα να δρουν *in vivo* ως ένα τοπικά εξειδικευμένο αντιοξειδωτικό (*Prokai & Simpkins, 2007*).

1.7.4 Αντιφλεγμονώδης δράση

Τόσο τα λευκοκύτταρα όσο και η μικρογλοία εκφράζουν ERs, προσφέροντας μια άμεση οδό δράσης των οιστρογόνων σε φλεγμονώδεις διεργασίες (*Strom et al., 2011*). Οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις της οιστραδιόλης σε ειδικά αντιγονικά T-λεμφοκύτταρα είναι επίσης σημαντικές για την πρόληψη βλάβης της μυελίνης. Ενώ ο ERα φαίνεται να μεσολαβεί στις αντιφλεγμονώδεις δράσεις της οιστραδιόλης, οι προσδέτες του ERβ (π.χ. κάποιοι επιλεκτικοί διαμορφωτές των υποδοχέων οιστρογόνων, Selective estrogen receptor modulators, SERMs) μπορεί να αντιπροσωπεύουν μια θεραπευτική προσέγγιση για τη μείωση της απομυελίνωσης και τη διατήρηση της νευραξονικής ακεραιότητας (*Arevalo et al., 2010*).

1.7.5 Οιστρογόνα, ERs και νευροεκφυλιστικές νόσοι

Οι δύο υπότυποι του ER (-α και -β) εκφράζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και το πρότυπο κατανομής τους υποδεικνύει ότι έχουν διαφορετικές λειτουργίες. Στα τρωκτικά, ο ERα κατανέμεται κυρίως στις περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος που εμπλέκονται στον έλεγχο των αναπαραγωγικών λειτουργιών όπως ο υποθάλαμος και οι προοπτικές περιοχές. Ο ERβ έχει ευρύτερη κατανομή και εκφράζεται σε περιοχές όπως ο φλοιός και ο ιππόκαμπος (*Dahlman-Wright, 2006*). Τα επίπεδα έκφρασης και η υποκυτταρική κατανομή των ERα και ERβ μπορούν να

αλλάξουν κατά τη διάρκεια της γήρανσης: η έκφραση τόσο του ERα όσο και του ERβ εξασθενεί σημαντικά σε ηλικιωμένους αρουραίους. Αυτό πιθανότατα βασίζεται στη διαφορική απόκριση του γηράσκοντα εγκεφάλου στα οιστρογόνα (Cui et al., 2013).

Οι θεραπείες με οιστρογόνα έχουν δείξει διάφορους μηχανισμούς πιθανής νευροπροστασίας σε μια σειρά ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της νόσου του Parkinson (Parkinson Disease, PD), της νόσου του Alzheimer (Alzheimer Disease, AD), του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου και της βλάβης του νωτιαίου μυελού (Spence & Voskuhl, 2010). Επίσης, ορισμένες μελέτες δείχνουν προστατευτικό αποτέλεσμα των οιστρογόνων στη σκλήρυνση κατά πλάκας, πιθανότατα εξαιτίας των ανοσοτροποποιητικών και αντιφλεγμονωδών επιδράσεων των οιστρογόνων που έχουν αναφερθεί από πλειάδα επιστημονικών μελετών (Dahlman-Wright, 2006). Απώλεια οιστρογόνων ως αποτέλεσμα της εμμηνόπαυσης συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο AD και PD (Dahlman-Wright, 2006). Πρόσφατα, υπήρξε ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις δράσεις και τις λειτουργίες της E₂ και των SERMs στον εγκέφαλο. Υποστηρικτικά ευρήματα για έναν νευροπροστατευτικό ρόλο της ενδογενούς E₂ προέκυψαν επίσης από την παρατήρηση μεγαλύτερης εγκεφαλικής βλάβης στους άνδρες από ό,τι στις γυναίκες και στα ωθηκεκτομημένα ζώα σε σύγκριση με άθικτα θηλυκά σε μοντέλα ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (Dhandapani & Brann, 2002). Καθώς οι γυναίκες γερνούν και εισέρχονται στην εμμηνόπαυση, χάνουν το μεγαλύτερο μέρος της ικανότητάς τους να παράγουν E₂. Αυτή η κατάσταση καταστροφής έχει συσχετιστεί με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης εγκεφαλικού επεισοδίου, γνωστικών ελαττωμάτων, εξάψεις, μεταβολές της διάθεσης και πρώιμης εμφάνισης και σοβαρότητας της νόσου του Alzheimer (η πιο κοινή νευροεκφυλιστική ασθένεια), αν και δεν έχει εδραιωθεί μια αιτιολογική σχέση (Dhandapani & Brann, 2002). Ακόμα, οι ERα και ERβ έχουν αναγνωρισθεί στο ραβδωτό σώμα και τη μέλανα ουσία, περιοχές του εγκεφάλου που επηρεάζονται περισσότερο από τη PD (Cui et al., 2013).

1.8 Οιστρογόνα, ERs και καρκίνος

Τα οιστρογόνα φαίνεται να αποτελούν αντι-αποπτωτικά σήματα για πολλούς κυτταρικούς τύπους, όπως καρκινικά κύτταρα μαστού, ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και κύτταρα εγκεφάλου. Έχει παρατηρηθεί ότι προωθούν την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, ιδίως στον καρκίνο του μαστού (Psarra & Sekeris, 2008) και επίσης παίζουν ρόλο στη μιτοχονδριακή λειτουργία, βιογένεση και λειτουργικότητα. Σε ευαίσθητους σε οιστρογόνα ιστούς, έχουν καταδειχθεί πολλές πλευρές των μιτοχονδριακών μεταβολών κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης έκφρασης και δραστηριότητας των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας, της επαγωγής της μεταγραφής των μιτοχονδριακών γονιδίων και της μείωσης της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (Liao, 2015; Leygue & Murphy, 2013; Zhao et al., 2007).

Οι περισσότεροι ασθενείς με καρκίνο εκφράζουν ERα και/ή ERβ. Τα επίπεδα έκφρασης του ERα συνδέονται στενά με την εξαρτώμενη από τα οιστρογόνα ανάπτυξη και εισβολή του καρκίνου καθώς και με την απόκριση στην ενδοκρινική θεραπεία. Η στοχευμένη αποσιώπηση του γονιδίου του ERβ σε ποντίκια έχει

προτείνει ρόλους για τον υποδοχέα σε πολλούς ιστούς και όργανα, συμπεριλαμβανομένων των ωθηκών, της μήτρας, του μαστικού αδένου, του εγκεφάλου, του ανοσοποιητικού συστήματος και του προστάτη (*Liao et al., 2015; Jia et al., 2015*). Ο ERβ φαίνεται πως δρα ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας σε πολλούς τύπους καρκίνου και αυτό υποστηρίζεται από μελέτες σε ERβ-κnockout (ERβKO) ποντικούς. Μελέτες λειτουργίας του ERβ σε κυτταρικές σειρές αποκάλυψαν αντιπολλαπλασιαστικό ρόλο του ERβ, αύξηση του κυτταρικού θανάτου και θετική ρύθμιση του προ-αποπτωτικού γονιδίου Bcl. Ακόμα, ένα σταθερό εύρημα είναι ότι σε αντίθεση με τον ERα, τα συνολικά επίπεδα ERβ μειώνονται κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης του μαστού, ένα φαινόμενο που παρατηρήθηκε επίσης και σε καρκίνους στον προστάτη, στις ωθήκες και στους πνεύμονες. Επειδή συχνά παρατηρείται μεθυλίωση υποκινητών στον καρκίνο, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το ERβ είναι ένα πιθανό ογκοκατασταλτικό γονίδιο (*Huang et al., 2015*).

Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι ο ERβ επάγει την απόπτωση, αν και ο μοριακός μηχανισμός παραμένει ακόμα ασαφής (*Dey et al., 2014*). Ωστόσο, κλινικές μελέτες έδειξαν πως ο ERβ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων καρκίνου του μαστού μέσω καταστολής της ενεργοποίησης των μονοπατιών σηματοδότησης MAPK και PI3K. Επίσης, οι διάφοροι τύποι καρκίνου εκφράζουν υψηλά επίπεδα πυρηνικής φωσφατάσης και ομόλογου τενσίνης (PTEN). Το PTEN είναι γνωστό ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο εκτός από τη ρύθμιση της οδού AKT στην κυτταρική μεμβράνη, έχει αντιπολλαπλασιαστικές δράσεις στον πυρήνα του κυττάρου. Εάν ο ERβ διευκολύνει την είσοδο του PTEN στον πυρήνα, αυτός μπορεί να είναι ένας από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων ασκεί τα αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματά του (*Warner et al., 2017; Dahlman-Wright et al., 2006; Jia et al., 2015*).

1.9 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός της έκφρασης της βήτα μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων σε σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, κατασκευάστηκαν από το συνάδελφο Τσιάλλα Ιωάννη, στα πλαίσια της διδακτορικής του διατριβής, κυτταρικές σειρές Neuro-2a, νευροβλαστώματος ποντικού, που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων βήτα ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP), με μιτοχονδριακή (mitochondrial, mt) στόχευση. Η αξιολόγηση των αποικιών των τροποποιημένων κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή μεθόδων ανοσοκυτταροχημείας, μικροσκοπίας φθορισμού και ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Στην παρούσα διπλωματική εργασία γίνεται εκτενής λόγος για το κομμάτι της ανοσοκυτταροχημείας και της μικροσκοπίας φθορισμού.

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Οργανολογία

Πίνακας 1. Συγκεντρωτικός πίνακας χρησιμοποιούμενων οργάνων

Όργανα εντός του χώρου του εργαστηρίου		
Συσκευή ηλεκτροφόρησης: <i>Biorad mini-PROTEAN® tetra cell</i>	Quick spin: <i>Nippon Genetics Europe GmbH</i>	Heat blocker: <i>KISKER</i>
Συσκευή μεταφοράς (transfer): <i>Biorad mini-trans Blot</i>	Vortex: <i>Bio Vortex V1</i>	Φωτόμετρο: <i>Spectronic® 20 GENESYSTEM</i>
Μηχάνημα εμφάνισης W.B και gel: <i>FluoChemE/ ProteinSimple</i>	Ζυγοί: <i>KERN EW + KERN 440-47 N</i>	Φυγόκεντρος: <i>Helme Z36HK</i>
Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B <i>Kodak</i>	Αναδευτήρας: <i>Heidolph Rotamax</i>	Φυγόκεντρος: <i>Eppendorf 5810R</i>
Όργανα εντός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών		
Επωαστήρας: <i>New Brunswick (an Eppendorf Company) Galaxy 170S</i>	Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): <i>A. Kruss Optronic Germany</i>	Συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow Hood): <i>Tel Star AV-30/70</i>
Αυτόματος πιπιεταδόρος: <i>HTC Lab solution</i>	Υδατόλουτρο: <i>P SELECTA</i>	Φυγόκεντρος: <i>Entrofriger- BLII/ PS Selecta®</i>
Λοιπά όργανα		
Μικροσκόπιο φθορισμού: <i>LEICA DM 2000</i>	Ψυχόμενη κάμερα φθορισμού: <i>OPTIMOS Q IMAGING</i>	Sonicator: <i>Helscher Ultrasound Technologies, model UP400S</i>

2.2. Υλικά

2.2.1 Χημικά

Πίνακας 2. Συγκεντρωτικός πίνακας χρησιμοποιούμενων χημικών ουσιών

Χημική ουσία	Εταιρία	Χημική ουσία	Εταιρία	Χημική ουσία	Εταιρία
<i>Acetic acid</i>	<i>Scharlau</i>	<i>Hoechst</i>	<i>Life technologies</i>	<i>Trypsin-EDTA 5% 10x</i>	<i>Gibco</i>
<i>Acrylamide/Bis acrylamide 40%</i>	<i>Bio-Rad</i>	<i>KCl</i>	<i>Merck</i>	<i>Tween 20</i>	<i>Sigma</i>
<i>Agarose</i>	<i>Sigma</i>	<i>KH₂PO₄</i>	<i>Merck</i>	<i>Ακετόνη</i>	
<i>APS</i>	<i>Sigma</i>	<i>L-Glutamine</i>	<i>Invitrogen</i>	<i>Αιθανόλη 100%</i>	<i>Sigma</i>
<i>Bradford protein assay</i>	<i>Bio-Rad</i>	<i>Lysis Buffer x5</i>	<i>Promega</i>	<i>Βιοαιθανόλη</i>	<i>Kalochem</i>

Χημική ουσία	Εταιρία	Χημική ουσία	Εταιρία	Χημική ουσία	Εταιρία
<i>Bromophenol blue</i>	Fluka	<i>Midori Green</i>	Nippon Genetics	β-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel-de Haën
<i>CHCl₃</i>	Sigma	<i>Na₂HPO₄</i>	Merck	Γλυκερόλη	Applichem
<i>Cyanol xylene</i>	Fluka	<i>NaCl</i>	Panreac	Ισοπροπανόλη	Sigma
<i>DMSO</i>	Sigma	<i>NaHCO₃</i>	Merck	Μεθανόλη	Chemlab
<i>DTT</i>	Serva	<i>NaOH</i>	Merck	Μείγμα αναστολέων πρωτεασών	Sigma
<i>Developer</i>	Carestream	<i>PagerulerTM Prestained Protein Ladder</i>	ThermoScientific Fermentas	Κυανούν της βρωμοφαινόλης	Research organics
<i>EDTA</i>	SERVA	<i>Running buffer</i>		Πενικιλίνη - Στρεπταμυκίνη	Invitrogen
<i>ECL A + ECL B</i>	Santa Cruz	<i>SDS</i>	Sigma		
<i>FBS</i>	Invitrogen	<i>Skimmed milk powder</i>	Regilait		
<i>Fixer</i>	Carestream	<i>TEMED</i>	Applichem		
<i>Glycine</i>	Serva	<i>Triton X-100</i>	Applichem		
<i>HCl</i>	Merck	<i>Tris</i>	Serva		

2.2.2 Θρεπτικά υλικά

- Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 1g/mol Glucose (*Life Technologies - Invitrogen*)
- Απαιτείται η προσθήκη: 1% του τελικού όγκου **L-glutamate**, 1% του τελικού όγκου **αντιβιοτικό πενικιλίνης και στρεπταμυκίνης** και 10% του τελικού όγκου **FBS**.

2.2.3 Διαλύματα

- **PMSF 200mM**

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

- **Διάλυμα λύσης κυτάρων (Lysis Buffer)**

Αποτελείται από 20mM Tris pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 250mM NaCl και 3mM EDTA και αποθηκεύεται στους 4°C. Σε 500μl από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 0,25μl PMSF 20mM (-20°C) και 1μl DTT 1M (-20°C). Επίσης, γίνεται προσθήκη 5μl μείγματος αναστολέων πρωτεασών.

- **Διάλυμα Bradford**

Το απόθεμα που διαθέτει το εργαστήριο είναι σε συγκέντρωση 5x. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1x, αραιωμένο με ddH₂O. Η αναλογία του όγκου που χρησιμοποιείται από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford είναι 1:1000.

- **Sample Buffer 4x**

Χαρακτηρίζεται ως διάλυμα επιστοίβαξης του εκάστωτε δείγματος. Αποτελείται από 1M Tris pH 6.8, 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% κυανού της βρωμοφαινόλης και αποθηκεύεται στους -20°C.

- **Tris 20mM pH 7.5**

Σε δοκιμαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf (1.5ml) αναμειγνύονται 20μl stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 (4°C) με 980μl ddH₂O. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

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

Για την παρασκευή 0.2 lt διαλύματος ζυγίζονται 36,342 gr Tris τα οποία διαλύονται σε dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 12N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

- **TEMED**

Χρησιμοποιείται χωρίς κάποια αραιώση, όπως ακριβώς παραλαμβάνεται από την αντίστοιχη εταιρία. Αποθηκεύεται στους 4°C.

- **Υπερθειικό αμμώνιο (APS) 10 % w/v**

Παρασκευάζεται διαλύοντας 100mg APS σε 1ml ddH₂O. Αποθηκεύεται στους -20°C και κατά τη διάρκεια χρήσης του παραμένει τοποθετημένο σε πάγο (4°C).

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x**

Ζυγίζονται 30gr/lt Tris base 250mM και 144gr/lt γλυκίνης 1920mM, τα οποία διαλύονται σε 1lt ddH₂O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x**

Για την παρασκευή του R.B. 1x αραιώνονται 100ml R.B. 10x σε 900ml dH₂O. Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε αναλογία 0.1%, δηλαδή 10ml. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10x**

Αποτελείται από 10% Running Buffer 10x (100ml), 20% MeOH(200ml) και 0.05% SDS (5ml). Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH₂O (695ml). Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10x**

Ζυγίζονται 2gr KCl, 2,4gr KH₂PO₄, 17,8gr Na₂HPO₄ .2H₂O και 80gr NaCl, τα οποία διαλύονται σε όγκο 1lt. Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 1x**

Παρασκευάζεται με την προσθήκη διαλύματος PBS 10x και dH₂O σε αναλογία (1:9). Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1x**

Αποτελείται από 10% stock buffer PBS 10x και 1% Tween-20. Ο όγκος συμπληρώνεται με dH₂O ή ddH₂O. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Διαλύματα για εμφάνιση σήματος μετά από Western blotting**

Χρησιμοποιήθηκαν δύο εμπορικά παρασκευάσματα της Kodak. Το πρώτο είναι ένα

διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και το δεύτερο ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Τα εκάστοτε διαλύματα παρασκευάζονται με ανάμειξη 1:3,8 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε ddH₂O.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης νουκλεοτιδίων TAE 50x**

Για την δημιουργία 1lt προστίθενται 242,2gr Tris base σε 600ml ddH₂O. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 57,1ml υγρού οξικού οξέος καθώς και 100ml 0,5M EDTA (pH=8). Τέλος συμπληρώνουμε με ddH₂O μέχρι το 1lt. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης νουκλεοτιδίων TAE 1x**

Παρασκευάζεται με την προσθήκη διαλύματος TAE 50x και ddH₂O σε αναλογία (1:49). Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης νουκλεοτιδίων σε πηκτή αгарόζης 6x**

Αποτελείται από 30% v/v γλυκερόλη, 0,25% w/v κυανού της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue), 0,25% w/v κυανό του ξυλενίου και ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με ddH₂O. Αποθηκεύεται στους 4°C.

2.2.4 Αντισώματα

Πίνακας 1. Πίνακας πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά Western ήταν διαλυμένα σε PBST 1x, γάλα 2% w/v και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Αντίσωμα έναντι	Εταιρία	Ζώο προέλευσης	Αναγνώριση επιτόπων	Είδος
Πρωτογενή αντισώματα (Western blot)				
Citrate synthase (G-3)	Santa Cruz biotechnology	Επίμυς	Μονοκλωνικό	IgG ₁
SDHA (F-2)	Santa Cruz biotechnology	Επίμυς	Μονοκλωνικό	IgG _{2a}
MDH2 (1G12)	Santa Cruz biotechnology	Επίμυς	Μονοκλωνικό	IgG _{2a}
PPARα(H-2)	Santa Cruz biotechnology	Επίμυς	Μονοκλωνικό	IgG _{2a}
GAPDH (H-12)	Santa Cruz biotechnology	Επίμυς	Μονοκλωνικό	IgG _{2a}
Lamin A/C (636)	Santa Cruz biotechnology	Επίμυς	Μονοκλωνικό	IgG _{2b}
Πρωτογενή αντισώματα (Ανοσοκυτταροχημεία)				
Ως πρωτογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό ERβ- MCA της εταιρίας Serotec				
Δευτερογενή αντισώματα (Western blot)				
Ως δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι mouse IgG-HRP της εταιρίας Pierce Antibodies				
Δευτερογενή αντισώματα (Ανοσοκυτταροχημεία)				
Ως δευτερογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το IgG (H+L) CF568 Goat anti-mouse της εταιρίας BIOTINUM				

2.2.5 Αναλώσιμα

Πίνακας 2. Συγκεντρωτικός πίνακας αναλωσίμων

Αναλώσιμο	Εταιρία
Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (<i>falcons</i>) (15 mL, 50 mL)	Sarstedt
Πλαστικά σωληνάρια τύπου <i>erpendorfs</i> (1.5 mL, 2.0 mL)	Sarstedt
Πιπέτες ορολογικές - <i>Serological</i> (2, 5, και 10 mL)	Sarstedt
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,2μm και 0,45μm	Amersham™ Protran™
Φωτογραφικά φιλμ ανίχνευσης σήματος σε μεμβράνη κατά τη διαδικασία <i>western blot</i>)	FUJI MEDICAL
Ρύγχοι (0.2-10 μL, 20-200 μL και 100-1000 μL)	Sarstedt
Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (<i>well-plates</i>) με 24× wells	Sarstedt
Χαρτιά <i>Whatman</i>	Sigma
Γυάλινα σιφώνια	Kimble
Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου	Knittel Glass
Αιμοκυτταρόμετρο για μέτρηση κυττάρων	Heinz Herenz Hamburg

2.2.6. Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, όλα τα πειράματα διεξήχθησαν στη σταθερή κυτταρική σειρά *Neuro-2a* (N_2A), που παρασκευάστηκε από τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Τσιάλα Ιωάννη στα πλαίσια της διδακτορικής του διατριβής. Πιο συγκεκριμένα παρασκευάστηκε η κυτταρική σειρά N_2A mtGFPERβ, η οποία υπερεκφράζει σταθερά τον ERβ, ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (*green fluorescent protein*, GFP), με μιτοχονδριακή (*mitochondrial*, mt) στόχευση. Παρακάτω παρατίθενται οι γενικές πληροφορίες για την κυτταρική σειρά *Neuro-2a*, όπως αυτές αναγράφονται στην επίσημη ιστοσελίδα της εταιρίας ATCC.

Πίνακας 3. Γενικές πληροφορίες για την καρκινική κυτταρική σειρά N₂A

Neuro-2a (ATCC® CCL-131™)	
Οργανισμός	Mus musculus, mouse
Ιστός	Εγκέφαλος
Κυτταρικός τύπος	Νευροβλάστη
Ασθένεια	Νευροβλάστωμα
Στέλεχος	A
Μορφολογία	Νευρωνικά και αμοιβαδικά βλαστοκύτταρα

2.3 Τεχνικές

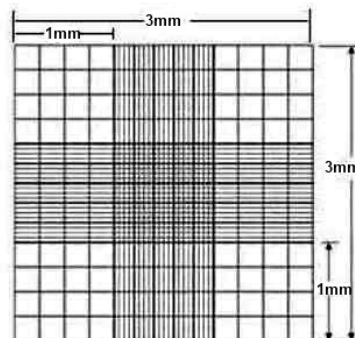
2.3.1 Μέτρηση και στρώσιμο κυττάρων

Για το χειρισμό των κυττάρων, όπως το στρώσιμο τους σε 24x well plate, πραγματοποιείται αρχικά η μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού και η ισόποση τοποθέτησή του σε well plates. Για να γίνει αυτό απαιτείται θρυψινοποίηση των κυττάρων, φυγοκέντρησή τους και στη συνέχεια ήπια επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Έπειτα μικρή ποσότητα, 10μl, μεταφέρεται εντός της καλυπτρίδας στο αιματοκυτταρόμετρο Neubauer (Εικόνα 11). Το τελευταίο τοποθετείται στο μικροσκόπιο, όπου καθίσταται δυνατή η καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων στα αντίστοιχα τεταρτημόρια του αιματοκυτταρόμετρου (Εικόνα 12).

Αν θεωρήσουμε ως a, b, c, d τον συνολικό αριθμό των κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο, τότε ο αριθμός των κυττάρων που διαθέτουμε ανά ml υπολογίζεται προσεγγιστικά με τον τύπο: $N_{\text{διαθέσιμων κυττάρων}} = \frac{a+b+c+d}{4} \times 10.000$. Στη συνέχεια υπολογίζουμε τον αριθμό των επιθυμητών κυττάρων με τον τύπο: $N_{\text{επιθυμητών κυττάρων}} = \frac{N_{\text{κυττάρων}}}{\text{well}} \times N_{\text{well}}$. Επόμενο στάδιο στους υπολογισμούς αποτελεί ο υπολογισμός του όγκου του διαλύματος που περιέχει N επιθυμητών κυττάρων με τον τύπο: $V_{\text{επιθυμητό}} = \frac{N_{\text{επιθυμητών κυττάρων}}}{N_{\text{διαθέσιμων κυττάρων}}}$. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μεταφορά του επιθυμητού όγκου σε νέο falcon και εκ νέου φυγοκέντρωση, ακολουθούμενη από διαλυτοποίηση του σχηματιζόμενου ιζήματος σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού, ο οποίος υπολογίζεται ως εξής: $\left(\frac{\text{Όγκος θρεπτικού που προτείνεται}}{\text{well}} \times N_{\text{well}} \right)$. Τελευταίο στάδιο της διαδικασίας αποτελεί η ισοκατανομή του άνωθεν διαλύματος στα διάφορα wells και η εκτέλεση περιστροφικής κίνησης προκειμένου η κατανομή των κυττάρων να είναι ομοιόμορφη εντός των πηγαδιών. Ακολουθεί μικροσκοπική εξέταση της εικόνας των κυττάρων στο μικροσκόπιο και μεταφορά του well plate σε κλίβανο επώασης (37°C).



Εικόνα 11. Αιματοκυτταρόμετρο (πλάκα) Neubauer.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση των τεταρτημορίων της πλάκας Neubauer. Μετρούνται μόνο τα κύτταρα που βρίσκονται εντός των 4 τεταρτημορίων (1mm).

2.3.2 Ανοσοκυτταροχημεία και μικροσκοπία φθορισμού

2.3.2.1 Ανοσοκυτταροχημεία

Η ανοσοκυτταροχημεία είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της παρουσίας μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε κύτταρα (κύτταρα σε καλλιέργεια ή κυτταρικά εναιωρήματα) με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων. Οπτικοποιεί τον εντοπισμό μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης με τη χρήση ενός συγκεκριμένου πρωτογενούς αντισώματος που δεσμεύεται σε αυτή. Το πρωτογενές αντίσωμα όταν συνδέεται με ένα δευτερογενές αντίσωμα που έχει συζευγμένη μία χρωστική ουσία επιτρέπει την απεικόνιση της πρωτεΐνης, μετά από παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Η εν λόγω τεχνική επιτρέπει στους ερευνητές να αξιολογήσουν εάν τα κύτταρα σε ένα συγκεκριμένο δείγμα εκφράζουν ή όχι την επιθυμητή πρωτεΐνη και σε ποια υποκυτταρικά διαμερίσματα.

Η διαδικασία αρχικά λαμβάνει χώρα εντός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών. Πρώτο βήμα είναι η τοποθέτηση καλυπτρίδων (coverslips) στα πηγαδάκια ειδικών «πιάτων» (24x well plates). Μετά την τοποθέτησή τους, ακολουθεί αποστείρωση τους σε δύο βήματα. Αρχικά προστίθεται αιθανόλη 70% και εν συνεχεία οι καλυπτρίδες αφήνονται για μισή ώρα υπό την ακτινοβολία του UV στη συσκευή κάθετης νηματικής ροής. Κατόπιν της αποστείρωσης, πραγματοποιείται μέτρηση και στρώσιμο του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε κάθε πηγαδάκι, όπως αναλύεται παραπάνω. Μετά από κατάλληλο χρονικό διάστημα (εξαρτάται από την κυτταρική σειρά), κατά το οποίο τα κύτταρα έχουν πάρει κατάλληλη δομή και μορφολογία, γίνονται 1-2 εκπλύσεις των καλυπτρίδων με PBS 1x (37°C). Έπειτα ακολουθεί μεταφορά του plate από το χώρο των κυτταροκαλλιεργειών σε εκείνον του εργαστηρίου, όπου πραγματοποιούνται όλα τα υπόλοιπα στάδια της διαδικασίας.

Επόμενο βήμα είναι η μονιμοποίηση (fixation) των κυττάρων στις καλυπτρίδες, η οποία πραγματοποιείται ως εξής:

- 1) Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό ή το PBS 1x που βρίσκεται σε κάθε πηγαδάκι του plate.
- 2) Σε κάθε πηγαδάκι προστίθεται μεθανόλη για την μονιμοποίηση των κυτταρικών πυρήνων σε ποσότητα ικανή, ώστε να καλύπτει όλη την επιφάνεια της καλυπτρίδας (συνήθως 300-500μl) και κατόπιν το plate τοποθετείται στους -20°C για 10 λεπτά.

3) Εν συνεχεία αφαιρείται η μεθανόλη και γίνεται προσθήκη ακετόνης για την μονιμοποίηση των μιτοχονδρίων για 45 δευτερόλεπτα στους -20°C . Έπειτα από την αφαίρεση και της ακετόνης γίνονται 1-2 εκπλύσεις των καλυπτρίδων με PBS 1x (4°C).

Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες επωάζονται για 1 ώρα στο σκοτάδι με κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα, κατάλληλα αραιωμένο σε PBST 1x. Στο σημείο αυτό γίνεται και η προσθήκη της μπλε χρωστικής Hoechst 33342 σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml για την απεικόνιση των κυτταρικών πυρήνων. Μετά το πέρας της επώασης ακολουθούν 2 εκπλύσεις με PBS 1x (4°C) και κατόπιν γίνεται επώαση με δευτερογενές αντίσωμα που είναι συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική. Το αντίσωμα είναι κατάλληλα αραιωμένο σε PBST 1x.

Τελευταίο στάδιο της όλης διαδικασίας είναι η σταθεροποίηση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Για το λόγο αυτό η αντικειμενοφόρος πλάκα επιστρώνεται με PVA (Polyvinyl alcohol) πάνω στο οποίο τοποθετούνται οι καλυπτρίδες. Το PVA χρησιμεύει αφενός για την σταθεροποίηση των καλυπτρίδων όπως προαναφέρθηκε και αφετέρου για την παρεμπόδιση του αποχρωματισμού (bleaching) και της εξασθένησης του φθορίζοντος σήματος των Hoechst και GFP. Αφού οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετηθούν σε ειδική κασετίνα, αφήνονται στους 4°C για να στεγνώσει το PVA. Πλέον είναι έτοιμες για παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Η λήψη εικόνων πραγματοποιείται με ειδική ψυχόμενη κάμερα που είναι συνδεδεμένη με το μικροσκόπιο.

2.3.2.2 Μικροσκοπία φθορισμού

Τα αρχικά στάδια της διαδικασίας είναι όμοια με εκείνα της ανοσοκυτταροχημείας. Μία παραλλαγή που ακολουθεί την τεχνική αυτή είναι ότι ενώ ακόμα βρισκόμαστε στο χώρο των κυτταροκαλλιεργειών δημιουργείται ένα αρχικό mix αποτελούμενο από θρεπτικό υλικό low glucose, μπλε χρωστική Hoechst σε τελική συγκέντρωση 1mg/ml για την απεικόνιση των κυτταρικών πυρήνων και κόκκινη χρωστική CMX για την απεικόνιση των μιτοχονδρίων σε τελική συγκέντρωση 200nM. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο. Στη συνέχεια, το plate απομακρύνεται από το χώρο των κυτταροκαλλιεργειών και η υπόλοιπη διαδικασία λαμβάνει χώρα στον πάγκο του εργαστηρίου. Η βασική διαφορά της εν λόγω τεχνικής με την ανοσοκυτταροχημεία που αναλύθηκε προηγουμένως είναι ότι στην μικροσκοπία φθορισμού δεν έχουμε χρήση αντισωμάτων. Τα υπόλοιπα βήματα είναι όμοια με την διαδικασία της ανοσοκυτταροχημείας.

2.3.3 Λύση με τη χρήση διαλύματος

Το πρώτο βήμα για την πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE είναι η λύση του κυτταρικού ιζήματος (pellet κυττάρων). Η λύση του ιζήματος κυττάρων γίνεται με την προσθήκη διαλύματος lysis buffer, στο οποίο επιπλέον προστίθενται αναστολείς πρωτεασών, DTT και PMSF. Ο όγκος του διαλύματος λύσης εξαρτάται από την ποσότητα του εκάστως ιζήματος και συνήθως κυμαίνεται από 40 ως 60μl. Εν συνεχεία ακολουθεί ελαφρά ανάδευση των κυττάρων με τη χρήση πιπέτας και επώαση στον πάγο (4°C) για 15 λεπτά.

2.3.4 Λύση με τη χρήση υπερήχων (Sonication)

Ακολουθεί η διαδικασία λύσης των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων. Η διαδικασία πραγματοποιείται με τη βοήθεια της αντίστοιχης συσκευής (Sonicator: Helscher Ultrasound Technologies, model UP400S). Σκοπός της εν λόγω τεχνικής είναι η αποτελεσματικότερη λύση των κυττάρων αλλά και ο κατακερματισμός του DNA. Ο αριθμός των επαναλήψεων (κύκλων) εξαρτάται από την κυτταρική σειρά και τον όγκο των κυτταρικών περιεχομένων. Συνήθως πραγματοποιούνται 4-5 επαναλήψεις. Σε κάθε επανάληψη τα κυτταρικά περιεχόμενα εκτίθενται για 1 δευτερόλεπτο σε υπερήχους που εκπέμπονται από την συσκευή. Οι κύκλοι απέχουν μεταξύ τους 45".

2.3.5 Χρωματομετρική μέθοδος Bradford

Η χρωματομετρική μέθοδος Bradford αποσκοπεί στην ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου (εμφανίζει ευαισθησία σε μg πρωτεΐνης) και βασίζεται στον προσδιορισμό της αλλαγής χρώματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 από κόκκινη-καφέ σε μπλε κατά τη σύνδεση της σε πρωτεΐνες, και συγκεκριμένα σε κατάλοιπα λυσίνης υπό όξινες συνθήκες.

Συγκεκριμένα η κόκκινη μορφή του αντιδραστηρίου της Bradford δίνει τα ελεύθερα ηλεκτρόνια της σε ιονισμένες ομάδες της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να αλλάζει η δομή της πρωτεΐνης και να εκθέτει τις υδρόφοβες περιοχές της. Οι υδρόφοβες περιοχές δημιουργούν δεσμούς Van der Waals με τις πολικές περιοχές της χρωστικής, σταθεροποιώντας τη μπλε μορφή της (Bradford, 1976). Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, σύμφωνα και με τον παρακάτω τύπο και η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα 595nm.

$$A = \alpha C [A_{595\text{nm}}]$$

Αρχικά σε κάθε δοκιμαστικό σωληνάριο τύπου erpendorf (1,5ml) προστίθεται το εκάστωτε δείγμα σε συγκέντρωση $1/1000$ του τελικού όγκου (συνήθως 1 μl). Έπειτα προστίθεται το αντιδραστήριο της Bradford (συνήθως 1ml) και κατόπιν ακολουθεί ελαφρά ανάδευση στη συσκευή vortex και επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 λεπτά. Μόλις ολοκληρωθεί ο χρόνος της αντίδρασης, τα δείγματα αφαιρούνται από το σκοτάδι και φωτομετρούνται στα 595nm σε κατάλληλο φωτόμετρο (Spectronic® 20 GENESYS™), μετά από μηδενισμό με τυφλό δείγμα. Το τυφλό δημιουργείται με την προσθήκη lysis buffer σε έναν επιπλέον σωλήνα erpendorf σε τελική συγκέντρωση $1/1000$ και αντιδραστηρίου Bradford, χωρίς δείγμα. Η συγκέντρωση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης του εκάστωτε δείγματος υπολογίζεται από την εξίσωση, $y = 0,0345x + 0,01$ όπου y = απορρόφηση (A) και x = mg/δείγμα όπως αυτή προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA που έγινε στο εργαστήριο.

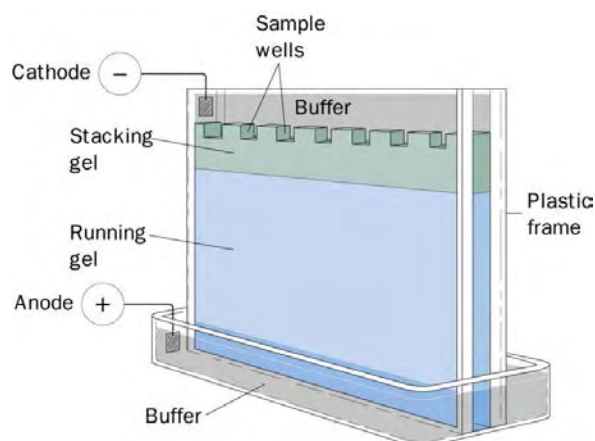
2.3.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση)

2.3.6.1 Παρασκευή γέλης πολυακρυλαμιδίου

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού ενός μίγματος πρωτεϊνών κατά μήκος ενός πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου υπό σταθερό ηλεκτρικό πεδίο. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται σε αποδιατακτικές συνθήκες, παρουσία δωδεκανοθειϊκού νατρίου (SDS). Το SDS καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των φυσικών πρωτεϊνών, ενώ το ενδογενές φορτίο κάθε πρωτεΐνης είναι αμελητέο συγκριτικά με το αρνητικό φορτίο που προσδίδει το SDS (1 μόριο/2 αμινοξέα). Έτσι ο διαχωρισμός βασίζεται μόνο στο μοριακό βάρος των πρωτεϊνών. Το ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι πρωτεΐνες να μετατοπίζονται από το αρνητικό (κάθοδος) στο θετικό ηλεκτρόδιο (άνοδος), συνήθως από πάνω προς τα κάτω.

Η γέλη πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο μικρότερα πηκτώματα: **(α)** την πηκτή συσσώρευσης (stacking gel), η οποία αποτελείται από χαμηλή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου και pH= 6,8 για να μην αρχίσει ο διαχωρισμός των δειγμάτων άμεσα. Πιο συγκεκριμένα, περιέχει 0,125M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS και 4% (w/v) ακρυλαμίδιο. Τα δείγματα κατά την παραμονή τους στο πηκτώμα συσσώρευσης «τρέχουν» με την ίδια ταχύτητα και συσσωρεύονται, ώστε ο διαχωρισμός τους να ξεκινήσει ταυτόχρονα, **(β)** την πηκτή διαχωρισμού (separating ή running gel), η οποία αποτελείται από υψηλή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου και pH= 8,8 και στην οποία αρχίζει ο ταυτόχρονος διαχωρισμός των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Η πηκτή διαχωρισμού περιέχει 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS και 7,5%-12% (w/v) ακρυλαμίδιο.

Το μονομερές ακρυλαμίδιο πολυμερίζεται παρουσία ελευθέρων ριζών προς σχηματισμό πολυακρυλαμιδίου. Στον πολυμερισμό συμμετέχει το *N,N*, μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο (*Bis-acrylamide*) που δημιουργεί σταυροσυνδέσεις. Το υπερθειϊκό αμμώνιο (*APS*) είναι το αντιδραστήριο σχηματισμού ελευθέρων ριζών, δίνοντας το έναυσμα για την έναρξη του πολυμερισμού και η *N,N*,-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (*TEMED*) χαρακτηρίζεται ως αντιδραστήριο καταλύτης, επιταχύνοντας την διαδικασία του πολυμερισμού. Τέλος, τα πρωτεϊνικά δείγματα τοποθετούνται σε «πηγαδάκια» (wells) μέσα στο πηκτώμα συσσώρευσης (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας.

2.3.6.2 Προετοιμασία δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση

Κάθε πηγαδάκι της πηκτής πολυακρυλαμιδίου θέλουμε να περιέχει ίση ποσότητα πρωτεΐνης. Ο τελικός όγκος του εκάστωτε δείγματος που φορτώνεται σε κάθε πηγαδάκι ισούται με 20μl. Στα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση προστίθενται επιπλέον Tris-HCl (pH=7,5) για εξισορρόπηση του όγκου και Sample Buffer 4x, σε όγκους που εξαρτώνται από την πρωτεϊνική σύσταση του εκχυλίσματος σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας Bradford. Τέλος σε όλα τα δείγματα προστίθεται το διάλυμα «φόρτωσης» πρωτεϊνών (sample buffer) σε τελική συγκέντρωση 1x. Καθ' όλη τη διάρκεια παρασκευής τους τα δείγματα παραμένουν στον πάγο (4°C).

Το sample buffer περιέχει γλυκερόλη, η οποία προσθέτει βάρος στο εκάστωτε δείγμα και το βοηθά να συσσωρευτεί, SDS για την κατάργηση των ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, β-μερκαπτοαιθανόλη η οποία αποτελεί αναγωγικό παράγοντα καθώς «σπάει» δισουλφιδικούς δεσμούς και καταργεί την 3ο ταγή δομή των πρωτεϊνών, κυανό της βρωμοφαινόλης που αποτελεί μια χαμηλού μοριακού βάρους χρωστική για τον οπτικό έλεγχο του διαχωρισμού των δειγμάτων, Tris-HCl (pH=6,8) για τη ρύθμιση του pH και τέλος ddH₂O.

Οι όγκοι των πρόσθετων διαλυμάτων υπολογίζονται τη βοήθεια του Microsoft Office Excel. Τελευταίο στάδιο πριν την ηλεκτροφόρηση είναι η τοποθέτηση των δειγμάτων σε συσκευή θέρμανσης (Heat blocker: KISKER) στους 95°C για 5 λεπτά για περαιτέρω κατακερματισμό του DNA και πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών, ενώ ακολουθεί στιγμιαία φυγοκέντρηση (spin).

2.3.6.3 Ηλεκτροφόρηση

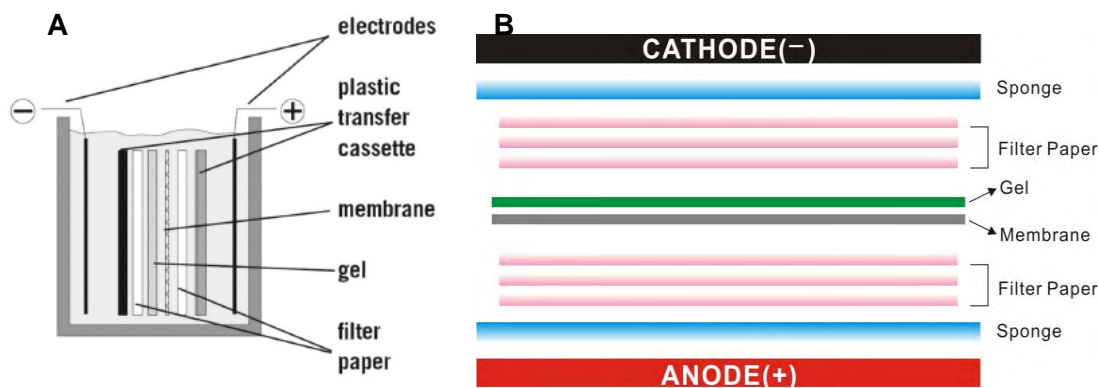
Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή ένταση ηλεκτρικού ρεύματος στα 0,02A με τη βοήθεια κατάλληλης συσκευής (Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell), μέσα στην οποία προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα Running Buffer 1x.

2.3.7 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blotting)

Πολύ μικρές ποσότητες μιας πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει σε ένα κύτταρο ή σε κάποιο σωματικό υγρό μπορούν να ανιχνευθούν με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών είναι μία αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά από το πήκτωμα σε ένα λεπτό φύλλο πολυμερούς και την ανίχνευσή τους με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα.

2.3.7.1 Εξισορρόπηση και ηλεκτρομεταφορά

Μετά την ολοκλήρωση της SDS-PAGE το πρότυπο των πρωτεϊνών μεταφέρεται από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε ειδική μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου κάθετα προς τις δύο επιφάνειες. Στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς, λόγω του SDS που περιέχει, οι πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο και μετακινούνται προς το θετικό πόλο (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. **A)** Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής ηλεκτρομεταφοράς, **B)** Σχηματική αναπαράσταση της κασετίνας ηλεκτρομεταφοράς.

Συγκεκριμένα μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί η εξισορρόπηση, δηλαδή η εμβάπτιση της μεμβράνης, των σφουγγαριών και των χαρτιών Whatmann σε δοχείο που περιέχει το διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer, T.B.) για 15 λεπτά. Ομοίως το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε ένα δεύτερο δοχείο που περιέχει χρησιμοποιημένο T.B. Μετά το πέρας της εξισορρόπησης στήνεται η κασετίνα στην οποία θα τοποθετηθούν τα περιεχόμενα των δύο δοχείων. Στην κάτω πλευρά τα κασετίνας (μαύρου χρώματος), τοποθετούνται κατά σειρά ένα σφουγγαράκι, δύο απορροφητικά χαρτιά Whatmann, η πηκτή πολυακρυλαμίδιου, η μεμβράνη νιτροκυταρίνης, δύο απορροφητικά χαρτιά Whatmann και τέλος ακόμα ένα σφουγγαράκι. Στη συνέχεια η κασετίνα κλείνει, τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς με την κάτω πλευρά της να έχει κατεύθυνση προς τον αρνητικό πόλο και την πάνω (διαφανούς χρώματος) προς τον θετικό (Εικόνα 13) και προστίθεται το διάλυμα Transfer Buffer εντός της συσκευής. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με παροχή ρεύματος σταθερής έντασης στα 0,35A για 70 λεπτά. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι η συσκευή είναι πολύ σημαντικό να περιβάλλεται από πάγο, καθώς είναι επικίνδυνο λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται από την εφαρμογή της τάσης κατά την ηλεκτρομεταφορά να καταστραφούν οι πρωτεΐνες.

2.3.7.2 Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων

Την ολοκλήρωση του Western blotting ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης νιτροκυταρίνης σε διάλυμα PBST 1x με 10% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα. Το μπλοκάρισμα πραγματοποιείται με ανάδευση σε κατάλληλη συσκευή σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Με τη διαδικασία αυτή γίνεται δέσμευση των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης νιτροκυταρίνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος, ώστε να παρεμποδιστεί πιθανή μη ειδική πρόσδεση αντισωμάτων στις θέσεις αυτές, κάτι που θα είχε ως αποτέλεσμα κάποιο ψευδώς θετικό αποτέλεσμα.

2.3.7.3 Επώαση με πρωτογενές/δευτερογενές αντίσωμα

Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης μας με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της επιθυμητής πρωτεΐνης (μόριο-στόχος). Το αντίσωμα διαλυτοποιείται σε διάλυμα TBST 1x με επιπλέον προσθήκη 2% (w/v) άπαχου αποξηραμένου γάλατος. Η επώαση πραγματοποιείται σε ειδικό ψυχώμενο δωμάτιο (cold room) στους 4°C με μηχανική ανάδευση της μεμβράνης σε κατάλληλη συσκευή καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight). Με το πέρας της επώασης ακολουθούν πέντε διαδοχικές εκπλύσεις των πέντε λεπτών σε διάλυμα PBST x1 υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Έτσι επιτυγχάνουμε την απομάκρυνση της περίσσειας του άδετου αντισώματος με αποτέλεσμα να παραμείνει στη μεμβράνη μόνο ότι έχει δέσει ειδικά. Στο σημείο αυτό γίνεται επώαση της μεμβράνης με δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (Horseradish Peroxidase, HRP). Το αντίσωμα διαλυτοποιείται σε διάλυμα TBST 1x με επιπλέον προσθήκη 2% (w/v) άπαχου αποξηραμένου γάλατος. Η επώαση πραγματοποιείται στο χώρο του εργαστηρίου σε θερμοκρασία δωματίου με μηχανική ανάδευση της μεμβράνης σε κατάλληλη συσκευή για μία ώρα. Έπειτα ακολουθούν 2 εκπλύσεις των πέντε λεπτών και μία τρίτη έκπλυση των οκτώ λεπτών.

2.3.7.4 Εμφάνιση σήματος

Αρχικά η μεμβράνη τοποθετείται σε γυάλινη επίπεδη επιφάνεια και διαβρέχεται με κατάλληλο διάλυμα ECL (Enhanced ChemiLuminescence). Στη συνέχεια πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης στο σκοτάδι. Το ECL αποτελεί το υπόστρωμα για το ένζυμο HRP με το οποίο είναι συζευγμένο το δευτερογενές αντίσωμα. Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας, κατά το οποίο δύο χημικές ουσίες αντιδρούν παράγοντας ένα διεγερμένο (υψηλής ενέργειας) ενδιάμεσο, το οποίο διασπάται απελευθερώνοντας μερική από την ενέργειά του ως φωτόνια. Το φως μπορεί να ανιχνευθεί με τη χρήση ευαίσθητων φιλμ αυτοραδιογραφίας. Κατά αυτόν τον τρόπο η μεμβράνη τοποθετείται σε κατάλληλη κασετίνα έκθεσης και η υπόλοιπη διαδικασία λαμβάνει χώρα στον σκοτεινό θάλαμο (dark room).

Εκεί, πάνω από τη μεμβράνη μας εφαρμόζεται κομμάτι X-ray φιλμ, το οποίο και αφήνεται να εκτεθεί. Ο χρόνος έκθεσης ποικίλλει ανάλογα με την ευαισθησία του πρωτογενούς αντισώματος και άλλων παραγόντων. Στη συνέχεια το φιλμ τοποθετείται σε διάλυμα εμφάνισης (Developer) για 1 λεπτό και μετά από σύντομη έκπλυση με νερό τοποθετείται σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) επίσης για 1 λεπτό. Τέλος ακολουθεί μια δεύτερη έκπλυση με νερό και το φιλμ αφήνεται να στεγνώσει.

2.4 Υπολογιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Ο υπολογισμός της ποσότητας πρωτεϊνών, με τη χρήση της μεθόδου Bradford, ο υπολογισμός της μετέπειτα σύστασης των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση καθώς και οι κανονικοποιήσεις όλων των πειραματικών διαδικασιών πραγματοποιήθηκαν στο **Microsoft Office Excel**. Για τη την ποσοτικοποίηση και την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοκυτταροχημείας και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα **ImageJ** και **Adobe Photoshop CS4** αντίστοιχα. Οι εικόνες ανοσοκυτταροχημείας αποτυπώθηκαν από την ψυχόμενη κάμερα που συνδέεται στο μικροσκόπιο φθορισμού, με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος **u Manager v.1.4** και επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων **Q Capture Pro v.7.05**.

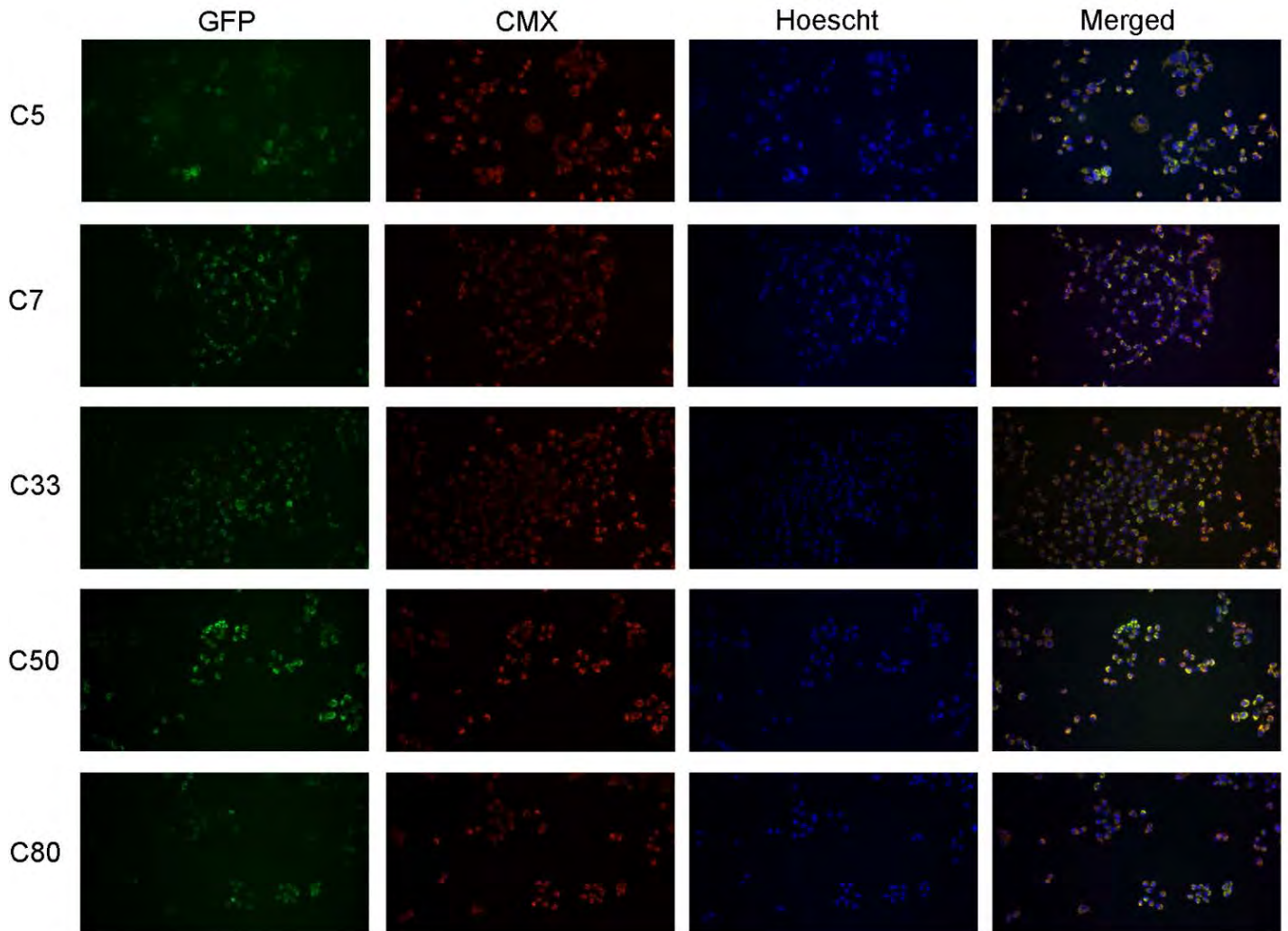
3. Αποτελέσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός της έκφρασης της βήτα μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων στη σταθερά διαμολυσμένη Neuro-2a καρκινική κυτταρική σειρά. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της ύπαρξης της χιμαιρικής πρωτεΐνης mtGFPERβ στα μιτοχόνδρια των Neuro-2a κυττάρων. Η παραπάνω αποτίμηση έγινε σε πρώτο στάδιο με τη μέθοδο της μικροσκοπίας φθορισμού, ακολουθούμενη από ένα δεύτερο γύρο αξιολόγησης-επαλήθευσης με τη μέθοδο της ανοσοκυτταροχημείας.

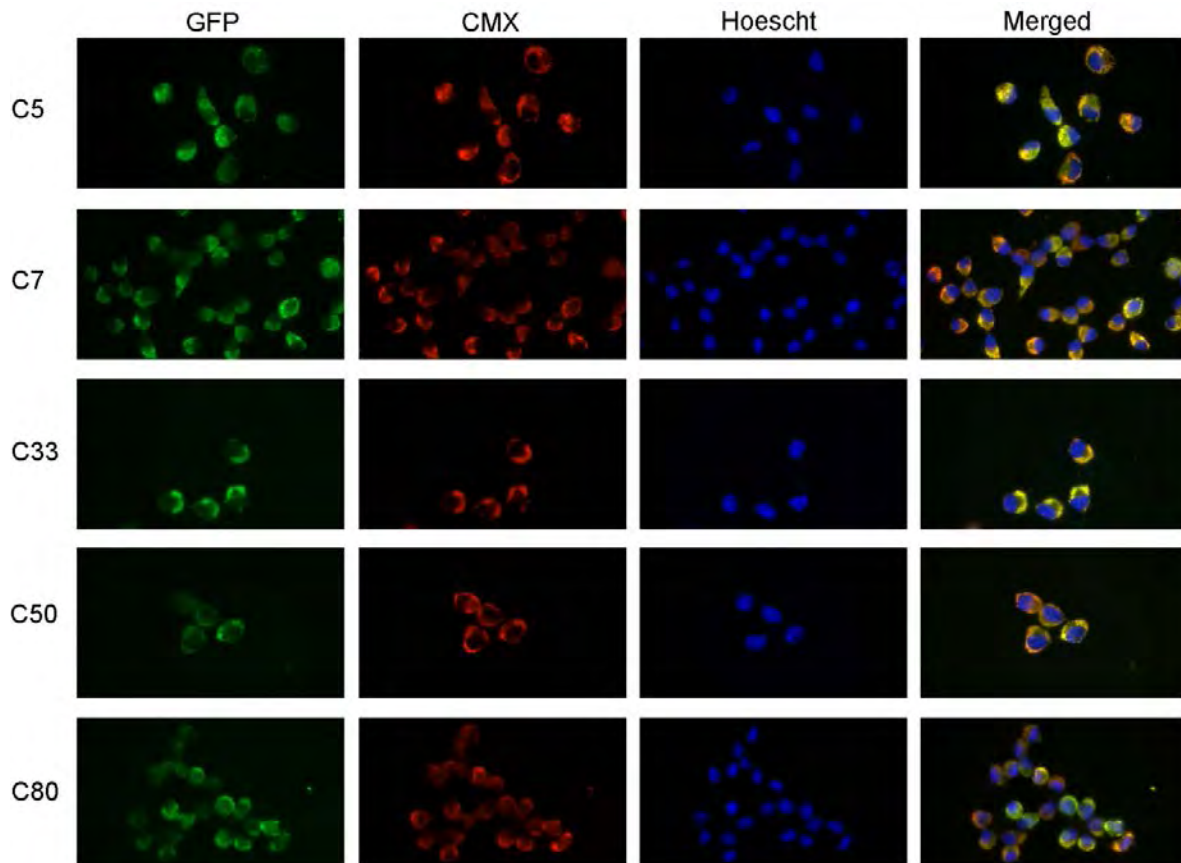
Μετά από αλληπάλληλους κύκλους επιλογής με κατάλληλα αντιβιοτικά, συλλέχθηκαν εκατόν είκοσι αποικίες της άνωθεν καρκινικής κυτταρικής σειράς, από τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου μας Τσιάλλα Ιωάννη. Κατά την πραγματοποίηση των δύο πειραματικών μεθόδων, αρχικά διεξήχθη ισόποσο στρώσιμο 15.000 κυττάρων σε καλυπτρίδες (coverslips), οι οποίες βρίσκονταν τοποθετημένες σε 24x well plates. Τα κύτταρα εν συνεχεία, αφέθηκαν να επωαστούν με DMEM low glucose (with phenol red) θρεπτικό μέσο σε κλίβανο επώασης (37°C, 5% CO₂) για 2 ημέρες, μέχρι να αποκτήσουν την κατάλληλη δομή. Έπειτα πραγματοποιήθηκε μικροσκοπία φθορισμού ή/και ανοσοκυτταροχημεία, κατά τον τρόπο που περιγράφεται στις ενότητες 2.3.2.2 και 2.3.2.1 αντίστοιχα.

Η αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε αφορά το σύνολο των αρχικών αποικιών που συλλέχτηκαν. Μόνο οι έξι από αυτές εμφάνισαν κατά την μικροσκοπική παρατήρηση επαρκή ποσότητα GFP πρωτεΐνης. Να τονιστεί πως η μικροσκοπική παρατήρηση όλων των αποικιών έγινε με τη χρήση δύο διαφορετικών αντικειμενικών φακών σε εστίαση 20x και 63x.

3.1. Διερεύνηση της ύπαρξης GFP στις αποικίες της σταθερά διαμολυσμένης N2AmtGFPERβ κυτταρικής σειράς με μικροσκοπία φθορισμού- (ποιοτική αξιολόγηση)



Εικόνα 14. Απεικόνιση των αποικιών C5, C7, C33, C50 και C80 με μικροσκοπία φθορισμού μετά από παρατήρηση στον 20x αντικειμενικό φακό. Από τα αριστερά προς τα δεξιά: **GFP**: πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη **CMX**: φθορίζουσα κόκκινου χρώματος που εντοπίζεται αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια **Hoechst 33342**: χρωστική φθορίζουσα μπλε χρώματος που εντοπίζεται αποκλειστικά στους πυρήνες. Η στήλη **Merged** αποτελεί τη συνδυασμένη εικόνα των τριών προηγούμενων στηλών. Όπου C: colony (αποικία). Οι εικόνες ελήφθησαν με χρήση ψυχόμενης κάμερας που συνδέεται στο μικροσκόπιο φθορισμού, με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος *u Manager v.1.4* και επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων *Q Capture Pro v.7.05*. Για τη δημιουργία της παραπάνω ενιαίας εικόνας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *Adobe Photoshop CS4*.



Εικόνα 15. Απεικόνιση των αποικιών C5, C7, C33, C50 και C80 με μικροσκοπία φθορισμού μετά από παρατήρηση στον 63x αντικειμενικό φακό. Παρατηρείται μιτοχονδριακή έκφραση της GFP και κατ'επέκταση και της χιμαιρικής πρωτεΐνης mtGFPERβ. Από τα αριστερά προς τα δεξιά: **GFP**: πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη **CMX**: μιτοχονδριακός φθορίζων ιχνηθέτης κόκκινου χρώματος **Hoechst 33342**: πυρηνικός φθορίζων ιχνηθέτης μπλε χρώματος. Η στήλη **Merged** αποτελεί τη συνδυασμένη εικόνα των τριών προηγούμενων στηλών. Πορτοκαλί ή υποκίτρινο χρώμα στις εικόνες της στήλης **Merged** αντιπροσωπεύει τη μιτοχονδριακή εντόπιση της GFP πρωτεΐνης. Όπου C: colony (αποικία). Οι εικόνες αποτυπώθηκαν από την ψυχόμενη κάμερα που συνδέεται στο μικροσκόπιο φθορισμού, με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος *u Manager v.1.4* και επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων *Q Capture Pro v.7.05*. Για τη δημιουργία της παραπάνω ενιαίας εικόνας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *Adobe Photoshop CS4*.

Οι εικόνες 14 και 15 απεικονίζουν τις αποικίες στις οποίες υπάρχει έκφραση της GFP πρωτεΐνης. Στην εικόνα 14 (20x αντικειμενικός φακός), παρατηρούμε πως υπάρχει σχετική έκφραση της GFP σχεδόν σε όλο τον αριθμό των κυττάρων των αποικιών 5, 7, 33, 50, 80 (στήλη 1^η - GFP). Στην εικόνα 15 (63x αντικειμενικός φακός), παρατηρώντας την 2^η και 3^η στήλη (CMX/Hoechst αντίστοιχα) μπορούμε να αποφανθούμε πως η έκφραση της GFP (στήλη 1^η), συνεπώς και της πρωτεΐνης mtGFPERβ, είναι περιπυρηνική και πιο συγκεκριμένα αμιγώς μιτοχονδριακή, στο σύνολο των κυττάρων των προαναφερθέντων αποικιών.

3.1.1 Διαγραμματική απεικόνιση της επιτυχίας διαμόλυνσης (transfection) των αποικιών της σταθερά διαμολυσμένης N2AmtGFPERβ κυτταρικής σειράς (ημιποσοτική αξιολόγηση)

Πίνακας 6. Αξιολόγηση του ποσοστού διαμόλυνσης των *Neuro-2a* κυττάρων επί τοις εκατό (%). Τα παρακάτω αποτελέσματα προέκυψαν από ανάλυση σημαντικού αριθμού εικόνων ($N>60$) που λήφθηκαν με τον 20x αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου φθορισμού. Η επεξεργασία και παρουσίαση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα *Image J* και *Microsoft Excel*.

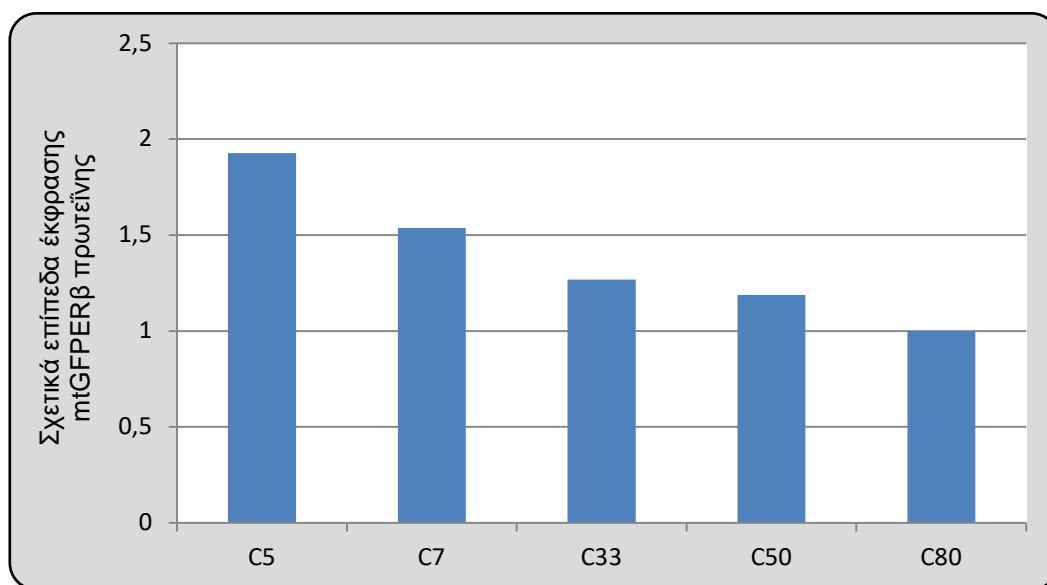
Αποικία	Πυρήνες	GFP fluence	Transfected κυτταρα	(%)
C5	335	259	259/335	77,31
C7	411	290	1236/1428	86,74
	358	334		
	656	612		
C33	592	517	2288/2688	85,76
	808	691		
	968	846		
	274	216		
	26	18		
C50	255	216	955/1063	89,84
	336	311		
	361	332		
	111	96		
C80	408	288	747/1053	70,94
	343	244		
	203	143		
	99	72		

Πίνακας 7. Αξιολόγηση του ποσοστού διαμόλυνσης των *Neuro-2a* κυττάρων επί τοις εκατό (%). Τα παρακάτω αποτελέσματα προέκυψαν από ανάλυση σημαντικού αριθμού εικόνων ($N>45$) που συλλέχθηκαν από διάφορες εικόνες που λήφθηκαν με τον 63x αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου φθορισμού. Η επεξεργασία και παρουσίαση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τα προγράμματα *Image J* και *Microsoft Excel*.

Αποικία	Πυρήνες	GFP fluence	Transfected κυτταρα	(%)
C5	43	39	42/43	90,69
C7	79	71	201/233	86,27
	36	31		
	118	99		
C33	90	83	209/238	87,82
	49	41		
	40	36		
	53	43		
	6	6		
C50	43	40	121/132	91,67
	42	38		
	38	34		
	9	9		
C80	54	41	41/54	75,93

Οι **πίνακες 6 και 7** αντικατοπτρίζουν το ποσοστό επιτυχίας της διαμόλυνσης των αποικιών. Παρατηρώντας τους δύο πίνακες μπορούμε να αποφανθούμε ότι υπάρχει επαναληψιμότητα μεταξύ των αποτελεσμάτων, που λήφθηκαν με τους δύο διαφορετικούς αντικειμενικούς φακούς. Σχετικά όλες οι αποικίες παρουσιάζουν μεγάλη επιτυχία στη διαμόλυνση με τα αντίστοιχα ποσοστά να παραθέτονται στους παραπάνω πίνακες. Ωστόσο, καθώς η μέθοδος που ακολουθήθηκε είναι ημιποσοτική, χρειαζόμαστε μεγαλύτερο στατιστικό δείγμα για να καταλήξουμε σε περισσότερο καίρια συμπεράσματα.

3.1.2 Αξιολόγηση της έντασης φθορισμού της GFP



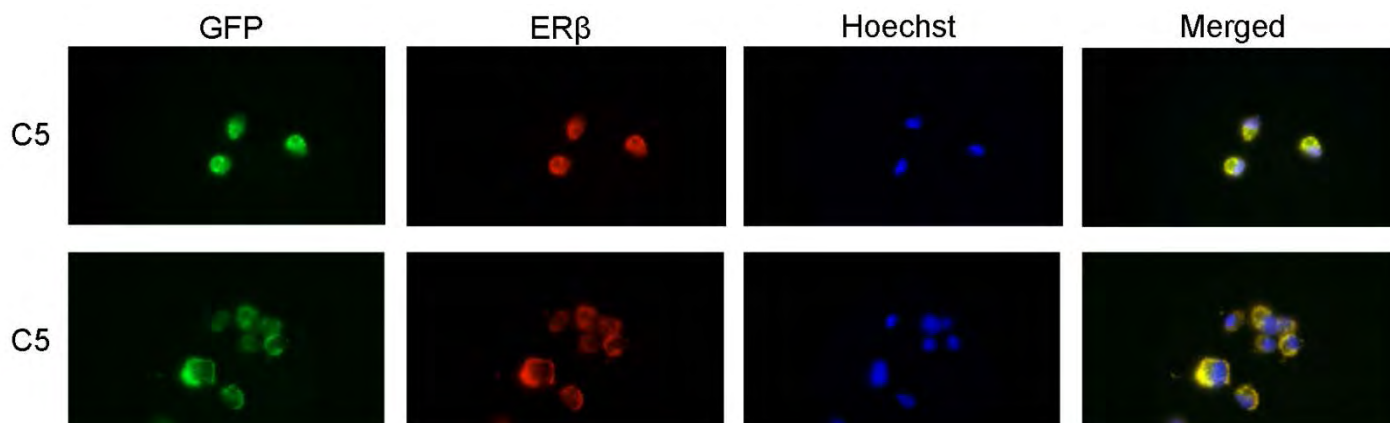
Διάγραμμα 1. Σύγκριση της ποσότητας της έντασης της GFP πρωτεΐνης στις αποικίες της *N2AmtGFPERβ* κυτταρικής σειράς. Η υπολογιστική επεξεργασία υλοποιήθηκε με τα προγράμματα *Image J* και *Microsoft Excel*.

Στο **διάγραμμα 1** απεικονίζονται τα επίπεδα της έντασης φθορισμού μεταξύ των πέντε επιλεγμένων αποικιών. Παρατηρούμε πως η C80 εμφανίζει τη μικρότερη ένταση φθορισμού. Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε χρήσιμο η παραπάνω ποσοτικοποίηση να γίνει ως προς τη συγκεκριμένη αποικία. Επομένως θεωρούμε πως έχει ένταση φθορισμού ίση με τη μονάδα. Ακολούθως η αποικία 5 εμφανίζει τη μεγαλύτερη ποσότητα έντασης GFP με το αντίστοιχο ποσοστό αύξησης σε σχέση με τη C80 να ανέρχεται περίπου στο 93%, ακολουθούμενη κατά σειρά από τις αποικίες 7 και 33. Τέλος, η αποικία 50 προσεγγίζει ένα ποσοστό αύξησης της τάξης του 19%.

3.2 Διερεύνηση της ύπαρξης ERβ στην αποικία 5 της σταθερά διαμολυσμένης *N2AmtGFPERβ* κυτταρικής σειράς με μικροσκοπία φθορισμού

Σε ένα δεύτερο γύρο αξιολόγησης πραγματοποιήθηκε ανοσοκυτταροχημεία, με κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα MCA έναντι του ERβ. Συγκεκριμένα η άνωθεν τεχνική χρησιμοποιήθηκε μόνο στην αποικία 5, καθώς κρίθηκε σκόπιμο να αξιολογηθεί πρωταρχικά η αποικία με τη μεγαλύτερη ένταση φθορισμού GFP.

Σκοπός ήταν αφενός να παρατηρηθεί η έκφραση του υποδοχέα μας (ERβ) στα κύτταρα της αποικίας 5 και αφετέρου να συγκριθεί ο εντοπισμός της έκφρασης του με τον εντοπισμό της έκφρασης της GFP πρωτεΐνης. Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική κόκκινου χρώματος. Περισσότερες πληροφορίες για τα αντισώματα παρατίθενται στην ενότητα 2.2.4.



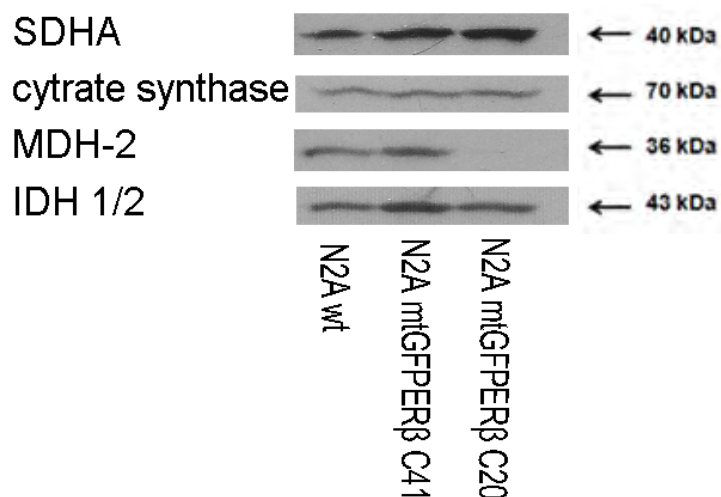
Εικόνα 16. Απεικόνιση της αποικίας C5 με μικροσκόπιο φθορισμού μετά από παρατήρηση στον 63x αντικειμενικό φακό. Παρατηρείται η έκφραση τόσο της GFP πρωτεΐνης, όσο και του ERβ υποδοχέα. Από τα αριστερά προς τα δεξιά: **GFP**: πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη **ERβ**: έπειτα από ανοσοκυτταροχημεία με τη χρήση MCA πρωτογενούς αντισώματος έναντι του ERβ κατέστη δυνατός ο εντοπισμός και η απεικόνιση του υποδοχέα. Το MCA εντοπίζεται μέσω της εφαρμογής της έμμεσης ανοσοκυτταροχημείας, δηλαδή της χρήσης δευτερογενούς αντισώματος, το οποίο είναι συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική ουσία κόκκινου χρώματος. **Hoechst 33342**: χρωστική φθορίζουσα μπλε χρώματος για την σήμανση των πυρήνων. Η στήλη **Merged** αποτελεί τη συνδυασμένη εικόνα των τριών προηγούμενων στηλών. Κίτρινο χρώμα στις εικόνες της στήλης **Merged** αντιπροσωπεύει το συνεντοπισμό της GFP πρωτεΐνης με τον υποδοχέα μας. Όπου C: colony (αποικία). Οι εικόνες αποτυπώθηκαν από την ψυχομένη κάμερα που συνδέεται στο μικροσκόπιο φθορισμού, με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος *u Manager v.1.4* και επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων *Q Capture Pro v.7.05*. Για τη δημιουργία της παραπάνω ενιαίας εικόνας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *Adobe Photoshop CS4*.

Στην **εικόνα 16** παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ανοσοκυτταροχημείας στην αποικία 5, μετά από παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού. Γίνεται εμφανές πως υπάρχει έκφραση τόσο του υποδοχέα οιστρογόνων β, όσο και της GFP πρωτεΐνης, στο σύνολο των κυττάρων της C5. Ακόμα γίνεται αντιληπτό το γεγονός πως τα δύο μόρια εμφανίζουν κατά προσέγγιση συνεντοπισμό, καθώς όπου εκφράζεται GFP, εμφανίζεται και έκφραση του ERβ σε παρόμοια επίπεδα έντασης φθορισμού. Η **Merged** εικόνα έρχεται να επιβεβαιώσει την παραπάνω παρατήρηση, καθώς κίτρινο χρώμα αντικατοπτρίζει τον πιθανό συνεντοπισμό των δύο μορίων. Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων συνεντόπισης θα γίνει στο άμεσο μέλλον με εφαρμογή συνεστιακής μικροσκοπίας.

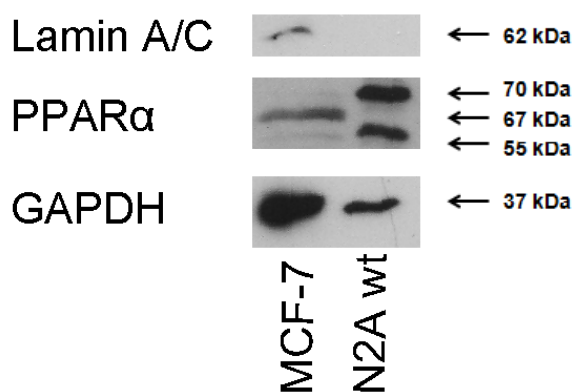
3.3 Δοκιμή αντισωμάτων έναντι μιτοχονδριακών μορίων-στόχων

Στο γενικότερο πλαίσιο της διενέργειας επιπρόσθετων πειραμάτων για το ρόλο που διαδραματίζει ο βήτα υπότυπος του υποδοχέα οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια, πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός και έλεγχος της αποτελεσματικότητας και εξειδίκευσης αντισωμάτων έναντι α) μορίων-στόχων του ERβ και β) μορίων-στόχων της οιστρογονικής σηματοδότησης για τη διερεύνηση της αλληλεπίδρασής αυτών με τον ERβ στο μιτοχόνδριο. Η ευόδωση του άνωθεν στόχου πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Όλα τα αντισώματα που

χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδο προέρχονται από επίμυ και παρασκευάζονται από την εταιρία *Santa Cruz Biotechnology*. Παρακάτω παρατίθεται το σύνολο των υπό δοκιμή πρωτογενών αντισωμάτων: Citrate synthase (G-3), SDHA (F-2), MDH2 (1G-12), PPAR α (H-2), GAPDH (H-12), Lamin A/C (636), SDHA (F-2), SDHB (G-10), NQO1 (A-180), IDH 1/2 (G-11), PPAR γ (E-8), PPAR γ (B-5), Tom70 (A-8), p53(Pab 1801), p53(A-1), c-Jun(6-2H-2F), c-Fos(G-4). Διαπιστώθηκε πως μόνο επτά από αυτά κατέστησαν κατάλληλα για τον (ποιοτικό) εντοπισμό των αντίστοιχων μορίων, όπως παρουσιάζεται και στις εικόνες 17 και 18. Αναλυτικές πληροφορίες για το καθένα από αυτά παραθέτονται παραπάνω στην ενότητα 2.2.4.



Εικόνα 17. Western Blotting με αντισώματα έναντι μορίων στόχων της οιστρογονικής σηματοδότησης. Τα εν λόγω αντισώματα δοκιμάστηκαν σε αγρίου τύπου κύτταρα *Neuro-2a*, καθώς και σε *Neuro-2a* κύτταρα που υπερεκφράζουν τη χμαιρική πρωτεΐνη *mtGFPERβ*. **SDHA**: αφυδρογονάση του ηλεκτρικού, **MDH-2**: αφυδρογονάση του μηλικού, **IDH1/2**: αφυδρογονάση του ισοκιτρικού. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα διαχωρισμού 10%. Η δημιουργία της άνωθεν εικόνας πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα *Adobe Photoshop CS4*.



Εικόνα 18. Western Blotting με αντισώματα έναντι μορίων στόχων της οιστρογονικής σηματοδότησης. Τα συγκεκριμένα αντισώματα δοκιμάστηκαν σε αγρίου τύπου κύτταρα *Neuro-2a*, καθώς και σε καρκινικά κύτταρα *MCF-7* καρκίνου του μαστού. **Lamin A/C**: Η λαμινίνη C είναι ένα εναλλακτικό μετάγραφο της λαμινίνη A, που διαφέρει μόνο στο καρβοξυτελικό άκρο, **PPARα**: παράγοντας ενεργοποίησης πολλαπλασιασμού των υπεροξυσωμάτων, **GAPDH**: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα διαχωρισμού 10%. Η δημιουργία της άνωθεν εικόνας πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα *Adobe Photoshop CS4*.

4. Συζήτηση- συμπεράσματα

Οι υποδοχείς οιστρογόνων είναι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και ενεργοποιούνται κατά κύριο λόγο από τη δέσμευση του προσδέτη τους (*Dahlman-Wright et al., 2006; Beato & Klug, 2000*). Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί και κλωνοποιηθεί δύο υπότυποι, ο ERα και ο ERβ. Οι υποδοχείς αυτοί κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και περιλαμβάνουν τόσο ομοιότητα στην αμινοξική τους αλληλουχία, όσο και διαφορές που αφορούν τα γονίδια-στόχους τους, την αναγνώριση του προσδέτη και την είσοδο τους στον πυρήνα (*Jia et al., 2015; Beato & Klug, 2000; Cui et al., 2013*). Γενικά είναι λειτουργικά διακριτοί και επιτελούν διαφορετικές βιολογικές δράσεις στους επιμέρους ιστούς (*Zhao et al, 2007; Dahlman-Wright et al., 2006*).

Μεγάλο πλήθος επιστημονικών μελετών αποδεικνύουν το μιτοχονδριακό εντοπισμό του ERβ με τη χρήση τεχνικών, όπως η ανοσοαποτύπωση κατά Western και η μικροσκοπία φθορισμού (*Psarra & Sekeris, 2006; Simpkins et al., 2008*). Τα ίδια δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο ERβ εισέρχεται στα μιτοχόνδρια αρκετών κυτταρικών τύπων, υποδεικνύοντας ότι διαδραματίζει ένα πιθανό ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργία του εν λόγω υποκυτταρικού διαμερίσματος, όσον αφορά τη βιογένεσή του, την παραγωγή ενέργειας, την έκφραση μιτοχονδριακών γονιδίων, καθώς και τη συμμετοχή του στην απόπτωση και σε άλλες μιτοχονδριακές λειτουργίες (*Psarra et al. 2006, Psarra & Sekeris, 2008*).

Στόχος της ερευνητικής μας ομάδας αποτελεί η διερεύνηση του ρόλου της βήτα μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, αρχικά δημιουργήθηκε σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά Neuro-2a, νευροβλαστώματος ποντικού, που υπερεκφράζει τον υποδοχέα οιστρογόνων βήτα ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP), με μιτοχονδριακή στόχευση (mtGFPERβ). Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός της έκφρασης της βήτα μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων στην παραπάνω καρκινική κυτταρική σειρά. Για την υλοποίηση αυτού του σκοπού εφαρμόστηκαν οι τεχνικές της ανοσοκυτταροχημείας και της μικροσκοπίας φθορισμού.

Αρχικά επιχειρήθηκε η αξιολόγηση της ύπαρξης του GFP στα N2AmtGFPERβ κύτταρα. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν οι αποικίες 5, 7, 33, 50 και 80, οι οποίες ήταν θετικές ως προς την έκφραση της GFP πρωτεΐνης. Κατά την παρατήρηση με εφαρμογή μικροσκοπίας φθορισμού χρησιμοποιήθηκε τόσο αντικειμενικός φακός με μεγέθυνση 20x, όσο και αντικειμενικός φακός 63x και οι φθορίζουσες χρωστικές GFP, CMX, Hoechst 33342. Η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση της GFP πρωτεΐνης άρα και της χιμαιρικής GFPERβ, η CMX για την απεικόνιση των μιτοχονδρίων, (εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα), ενώ η Hoechst χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση των πυρήνων, (εμφανίζεται με μπλέ χρώμα).

Κατά την παρατήρηση με τον 20x φακό παρατηρήθηκε έκφραση της GFP. Η παρατήρηση αυτή αποτυπώνεται στην [Εικόνα 14](#) και γίνεται εμφανής από την ένταση του πράσινου χρώματος που φέρουν τα κύτταρα.

Ωστόσο όπως ειπώθηκε, ο αρχικός στόχος επέβαλλε πως η πρωτεΐνη-χίμαιρα θα έπρεπε να έχει μιτοχονδριακή στόχευση. Έτσι με τη βοήθεια του μικροσκοπίου φθορισμού, οι ίδιες αποικίες παρατηρήθηκαν σε μεγαλύτερη εστίαση με τον

αντικειμενικό φακό 63x. Το αποτέλεσμα ήταν πως τα κύτταρα στη Merged εικόνα, η οποία αποτελεί τη συνδυασμένη απεικόνιση των κυττάρων με τις τρεις προαναφερθείσες χρωστικές, παρουσίαζαν ένα πορτοκαλί ή υποκίτρινο χρώμα (Εικόνα 15). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως η έκφραση της πρωτεΐνης mtGFPERβ είναι αμιγώς μιτοχονδριακή.

Αφού λοιπόν αποδείχθηκε ο μιτοχονδριακός εντοπισμός της GFP, εν συνεχεία ακολούθησε αξιολόγηση του ποσοστού της επιτυχούς διαμόλυνσης των Neuro-2a κυττάρων στις εν λόγω αποικίες. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ποσοστό επί τοις εκατό (%) και αφορούν όλες τις προαναφερθείσες αποικίες, με τη χρήση και των δύο αντικειμενικών φακών διαφορετικής εστίασης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρατίθενται στους πίνακες 6 και 7 γίνεται εμφανές πως σχεδόν όλες οι αποικίες μας παρουσιάζουν επιτυχία στη διαμόλυνση, με τις αποικίες 7, 33 και 50 να ξεχωρίζουν εμφανίζοντας ποσοστά άνω του 85% και στους δύο αντικειμενικούς φακούς. Αντίθετα η αποικία 80 εμφανίζει τη μικρότερη επιτυχία στη διαμόλυνση. Επιπρόσθετα, η C5 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη απόκλιση μεταξύ των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από τους δύο αντικειμενικούς φακούς (Πίνακας 1, 2). Ωστόσο, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες αποικίες δεν διαθέταμε μεγάλο δείγμα κυττάρων για την αποικία 5 και συνεπώς απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός παρατηρήσεων για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων και ασφαλών συμπερασμάτων.

Σειρά είχε η αξιολόγηση της έντασης φθορισμού της GFP στις διάφορες αποικίες, πραγματοποιώντας ποσοτικοποίηση του πράσινου φθορίζοντος σήματος των κυττάρων. Στο διάγραμμα 1 γίνεται εμφανές πως η αποικία 5 εμφανίζει τη μεγαλύτερη ένταση με το αντίστοιχο ποσοστό να είναι σχεδόν διπλάσιο εκείνου της αποικίας 80, η οποία εμφανίζει τη μικρότερη ένταση φθορισμού. Επιπλέον οι αποικίες 7, 33 και 50 παρουσιάζουν αύξηση του ποσοστού της έντασης φθορισμού σε σχέση με τη C80 κατά 53,7%, 26,9% και 18,8% αντίστοιχα.

Τελευταίο κατά σειρά πείραμα που πραγματοποιήθηκε ήταν η ανοσοκυταροχημεία με τη βοήθεια κατάλληλων αντισωμάτων (βλ. ενότητα 3). Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε μόνο στην αποικία 5 για την παρατήρηση της έκφρασης του υποδοχέα ERβ. Στην εικόνα 16 παρατηρούμε συνεντοπισμό της έκφρασης τόσο του υποδοχέα μας και της GFP στο σύνολο των κυττάρων της C5. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει και η Merged εικόνα (στήλη 3^η), καθώς η εμφάνιση του κίτρινου χρώματος συνεπάγεται συνεντοπισμό των δύο μορίων.

Συμπερασματικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα όλων των παραπάνω πειραματικών αποτελεσμάτων μπορούμε να αποφανθούμε πως, όσον αφορά τουλάχιστον την αποικία 5, ο ERβ εκφράζεται ως χιμαιρική πρωτεΐνη με την GFP, έχοντας μάλιστα μιτοχονδριακή στόχευση.

Παράλληλα με την άνωθεν ποιοτική αξιολόγηση, έγινε προσπάθεια και για τον χαρακτηρισμό της ύπαρξης και κατ' επέκταση των πρωτεϊνικών επιπέδων της υβριδικής πρωτεΐνης mtGFPERβ με χρήση αντισώματος έναντι του GFP, από το συνάδελφο Αλεξόπουλο Σεραφείμ. Ο ποσοτικός προσδιορισμός σε πρωτεϊνικό επίπεδο πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Στη συνέχεια, ακολούθησε χαρακτηρισμός της Neuro-2a κυτταρικής σειράς σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης του mtERβ.

Ακόμα υπήρξε προσπάθεια για την ανεύρεση κατάλληλων αντισωμάτων έναντι τόσο μορίων-στόχων του ERβ, όσο και μορίων-στόχων της μιτοχονδριακής οιστρογονικής σηματοδότησης που είναι πιθανό να αλληλεπιδρούν με τον ERβ στο

μιτοχόνδριο. Από ένα σύνολο 17 υπό δοκιμή πρωτογενών αντισωμάτων, επτά από αυτά κρίθηκαν κατάλληλα με τις τεχνικές της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης και της ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον εντοπισμό των αντίστοιχων μορίων. Πρόκειται για τα αντισώματα MDH2 (1G-12), GAPDH (H-12), IDH- 1 (G-11), citrate synthase (G-3), SDHA (F-2), PPAR α (H-2)) και Lamin A/C (636).

Ο ER β παρουσιάζει διασταυρούμενη επικοινωνία με τους **PPARs**, οι οποίοι ανήκουν στους πυρηνικούς υποδοχείς τύπου II (βλ. ενότητα 1.1.2) και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση. Οι PPARs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης, στην ανάπτυξη, στην καρκινογένεση και στο μεταβολισμό πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων (*Deroo & Buensuceso, 2010*).

Τα υπόλοιπα μόρια αποτελούν μόρια-στόχους της μιτοχονδριακής οιστρογονικής σηματοδότησης. Η αφυδρογονάση του μηλικού (**MDH-2**) καταλύει την αντιστρεπτή οξειδωση του μηλικού σε οξαλοξικό άλας, χρησιμοποιώντας ως συμπαράγοντα το σύστημα NAD⁺/NADH στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (**GAPDH**) καταλύει το έκτο βήμα της γλυκόλυσης, συμμετέχοντας έτσι στη διάσπαση της γλυκόζης για παραγωγή ενέργειας. Εργαστηριακά χρησιμοποιείται ευρέως ως μόριο κανονικοποίησης, καθώς εμφανίζει ιδιοσυστατική έκφραση. Η αφυδρογονάση του ισοκιτρικού (**IDH-1**) συμμετέχει στον κύκλο του κιτρικού οξέος και καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού σε α -κετογλουταρικό, χρησιμοποιώντας ως συμπαράγοντα το NAD⁺ με ταυτόχρονη απώλεια ενός ατόμου άνθρακα, στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων. Η **συνθάση του κιτρικού** υπάρχει σε σχεδόν όλα τα ζωντανά κύτταρα και καταλύει την πρώτη αντίδραση του κύκλου του κιτρικού οξέος, δηλαδή τη σύνθεση κιτρικού οξέος από οξαλικό και ακέτυλο-CoA. Το γονίδιο *sdha* κωδικοποιεί για μία κύρια καταλυτική υπομονάδα οξειδοαναγωγής ηλεκτρικού-ουβικινόνης (**SDHA**: α-υπομονάδα της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού), που αποτελεί στο σύμπλοκο II της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Η SDHA, η οποία αποτελεί και ένζυμο του κύκλου του κιτρικού οξέος, περιέχει θέση σύνδεσης FAD και παράγει FADH₂ κατά την οξειδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό (*Berg, Tymoczko and Stryer, 2014*). Τέλος οι πυρηνικές λαμίνες (**Lamin A/C**) είναι ινώδεις πρωτεΐνες που παρέχουν δομική λειτουργία και μεταγραφική ρύθμιση στον πυρήνα του κυττάρου. Αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεμβράνη για να σχηματίσουν το πυρηνικό έλασμα στο εσωτερικό του πυρηνικού περιβλήματος. Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται στην αποσυναρμολόγηση και αναμόρφωση του πυρηνικού περιβλήματος κατά τη διάρκεια της μίτωσης και του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (*Dechat et al., 2010*).

Μελλοντικός στόχος του εργαστηρίου μας είναι πραγματοποίηση επιπλέον πειραμάτων, στο γενικότερο πλαίσιο της διερεύνησης του ρόλου της βήτα ισομορφής του υποδοχέα οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια. Άμεση προτεραιότητα αποτελεί η πραγματοποίηση ανοσοκυτταροχημείας και για τις υπόλοιπες αποικίες (7, 33, 50, 80), και στην συνέχεια διενέργεια ποσοτικής αξιολόγησης των σχετικών επιπέδων mRNA του mtER β , στις σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές Neuro-2a, με τη βοήθεια της QRT-PCR.

Βιβλιογραφία

1. Arevalo M.A., Azcoitia I., Garcia-Segura L.M., (2015), The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors, "Nature Reviews Neuroscience", 16(1): 17-29
2. Arevalo M.A. et al., (2010), Actions of estrogens on glial cells: Implications for neuroprotection, "Biochimica et Biophysica Acta", 1800(10): 1106-1112
3. Beato M., Klug J., (2000), Steroid hormone receptors: an update, "Human Reproduction Update", 6(3): 225-236
4. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L., (2014), ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 17-18: 509-574
5. Chen J.Q. et al., (2007), ER β shifts from mitochondria to nucleus during estrogen-induced neoplastic transformation of human breast epithelial cells and is involved in estrogen-induced synthesis of mitochondrial respiratory chain proteins, "Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research", 1773(12): 1732-1746
6. Chen, J.Q., Cammarata P.R., Baines C.P., Yager J.D., (2009), Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications, "Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research", 1793(10): 1540-1570
7. Cleary P.M., Grossmann M.E., (2009), Minireview: Obesity and breast cancer: The estrogen connection, "Endocrinology", 150(6): 2537-2542
8. Cui J., Shen Y., Li R., (2013), Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: From periphery to brain, "Trends in Molecular Medicine", 19(3): 197-209
9. Dahlman-Wright K. et al., (2006), International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors, "Pharmacological reviews", 58(4): 773-781
10. Dechat et al., (2010), Nuclear lamins, "Cold Spring Harbor perspectives in biology", 2(11): 1-23
11. Deroo B.J., Buensuceso A.V., (2010), Minireview: Estrogen Receptor- β : Mechanistic Insights from Recent Studies, "Molecular Endocrinology", 24(9): 1703-1714
12. Dey P., Ström A., (2014), Estrogen receptor β upregulates FOXO3a and causes induction of apoptosis through PUMA in prostate cancer, "Oncogene", 33: 4213-4225
13. Dhandapani M.K., Brann D.W., (2002), Protective Effects of Estrogen and Selective Estrogen Receptor Modulators in the Brain, "Biology of Reproduction", 67(5): 1379-1385
14. Eick N.G., Thornton J.W., (2011), Evolution of steroid receptors from an estrogen-sensitive ancestral receptor, "Molecular and Cellular Endocrinology", 334(1-2): 31-38
15. Gupta N., Mayer D., (2013), Interaction of JAK with steroid receptor function, "Jak-Stat", 2(4): e24911(1-7)
16. Heldring N. et al., (2007), Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets, "Physiology Review", 87: 905-931
17. Huang B., Warner M., Gustafsson J.Å., (2015), Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy, "Molecular and Cellular Endocrinology", 418: 240-244
18. Jia M., Dahlman-Wright K., Gustafsson J.Å., (2015), Estrogen receptor alpha and beta in health and disease, "Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism", 29(4): 557-568
19. Klinge C.M., (2008), Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis, "Journal of Cellular Biochemistry", 105(6): 1342-1351

20. Kumar R., Litwack G., (2009), Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain, "Steroids", 74(12): 877-883
21. Lagouge M., Larsson N. G., (2013), The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing, "Journal of Internal Medicine", 273(6): 529-543
22. Lee H-R., Kim T-H., Choi K-C., (2012), Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse, "Laboratory Animal Research", 28(2): 71-76
23. Levin R. E., Hammes S. R., (2016), Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors, "Nature Reviews Molecular Cell Biology", 17(12): 783-797
24. Leygue E., Murphy L. C., (2013), A bi-faceted role of estrogen receptor β in breast cancer, "Endocrine-Related Cancer", 20(3): 127-139
25. Liao T., (2015), Estrogen receptor- β in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis, "Annals of the New York Academy of Sciences", 1350(1): 52-60
26. Lombardi G., (2001), Estrogens and health in males, "Molecular and Cellular Endocrinology", 178(1-2): 51-55
27. Mangelsdorf D., (1995), The nuclear receptor superfamily: the second decade, "Cell", 83: 835-839
28. Marino M., Galluzzo P., Ascenzi P., (2006), Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription, "Current Genomics", 7(8): 497-508
29. Mechoulam R., Brueggemeier R. W., Denlinger, D. L., (1984), Estrogens in insects, "Experientia", 40(9): 942-944
30. Olefsky J., (2001), Nuclear Receptor Minireview Series, "Journal of Biological Chemistry", 276(40): 36863-36864
31. Prokai L., Simpkins J. W., (2007), Structure-nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds, "Pharmacology and Therapeutics", 114(1): 1-12
32. Psarra A. M. G., Sekeris C., (2008), Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment, "Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research", 1783(1): 1-11
33. Psarra A. M. G., Sekeris C., (2008), Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria, "IUBMB Life", 60(4): 210-223
34. Psarra G. A. M., Solakidi S., Sekeris C., (2006), The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: Presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells, "Molecular and Cellular Endocrinology", 246(1-2): 21-33
35. Renaud J. P., Moras D., (2000), Structural studies on nuclear receptors, "Cellular and Molecular Life Sciences", 57(12): 1748-1769
36. Robinson-Rechavi M., Escriva H., Laudet V., (2003), The nuclear receptor superfamily, "Journal of Cell Science", 116(4): 585-586
37. Sever R., Glass C., (2013), Signaling by Nuclear Receptors, "Cold Spring Harb. Perspect. Biol.", 5(6): 1-4
38. Simpkins J. W., Yi K. D., Yang S. H., Dykens, James A., (2010), Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection, "Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects", 1800(10): 1113-1120
39. Simpkins J. W., Yang S.H (2008), Estrogen actions on mitochondria-Physiological and pathological implications, "Molecular and Cellular Endocrinology", 290, 51-59

40. Sladek M.F, (2011), What are nuclear receptor ligands? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 334: 3-13
41. Spence R.D., Voskuhl R. (2012), Neuroprotective effects of estrogens and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration, "Frontiers in Neuroendocrinology", 13(1): 105-115
42. Strom J. O., Theodorsson A., Theodorsson E., (2011), Mechanisms of estrogens' dose-dependent neuroprotective and neurodamaging effects in experimental models of cerebral ischemia, "International Journal of Molecular Sciences", 12(3): 1533-1562
43. Travis C.R., Key T.J. (2003), Oestrogen exposure and breast cancer risk, "Breast Cancer Research", 5(5): 239-247
44. Vrtačnik P., Ostanek B., Mencej-Bedrač S., Marc J., (2014), The many faces of estrogen signaling, "Biochemia Medica", 24(3): 329-342
45. Warner M., Huang B., Gustafsson J.A., (2017), Estrogen Receptor beta as a Pharmaceutical Target, "Trends in Pharmacological Sciences", 38(1): 92-99
46. Yang S.H., Liu R., Perez E.J., (2004), Mitochondrial localization of estrogen receptor, "Proceedings of the National Academy of Sciences", 101(12): 4130-4135
47. Yang S.H., (2009), Estrogen receptor β as a mitochondrial vulnerability factor, "Journal of Biological Chemistry", 284(14): 9540-9548
48. Younes M., (2011), Estrogen Receptor b Antibody, "Archives Pathology Lab Med", 135: 63-66
49. Zhao C., Dahlman-Wright K., Gustafsson J.A., (2007), Estrogen receptor β : an overview and update, "Nuclear Receptor Signaling", 4: 1-10
50. Zhao L., Wu T.W., Brinton R. D., (2004), Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons, "Brain Research", 1010(2): 22-34

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, Επ. Καθηγήτρια ΤΒΒ, για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να συμμετέχω στην ερευνητική της ομάδα βοηθώντας με, με τον τρόπο αυτό, να πραγματώσω ένα από τα παιδικά μου όνειρα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Τσιάλτα Ιωάννη για την άριστη επικοινωνία που είχαμε, την άρτια καθοδήγησή του τους τελευταίους δέκα μήνες, την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, τις γνώσεις και τη βοήθεια που μου πρόσφερε επί καθημερινής βάσης, την υπομονή και ανοχή του όλο αυτό το διάστημα, το ατελείωτο των ωρών που δουλέψαμε μαζί και τις άπειρες ώρες συζητήσεων κατά τις οποίες προσπάθησε να λύσει κάθε μου απορία.

Θα ήθελα ακόμα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας της κας Άννας-Μαρίας Ψαρρά για τη βοήθεια, τη στήριξη και το οικογενειακό κλίμα που δημιούργησαν και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την ομαλή συνεργασία.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον συνάδελφο Αλεξόπουλο Σεραφείμ, επίσης προπτυχιακό φοιτητή του εργαστηρίου μας στην ερευνητική ομάδα της κας. Ψαρρά, και πλέον πολύ καλό μου φίλο, για την άψογη και ανιδιοτελή συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μας εργασίας, για τις υπέροχες συζητήσεις εντός κι εκτός του χώρου του εργαστηρίου και τέλος για την απaráμιλλη στήριξη του σε στιγμές ιδιαίτερα δύσκολες.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου που με την συνεχή ηθική και όχι μόνο στήριξη της, με βοήθησε να εισαχθώ στο πανεπιστήμιο, να σπουδάσω αλλά και να ολοκληρώσω με επιτυχία ένα σημαντικό κομμάτι της ζωής μου στο *Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας*. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου εξαιτίας των οποίων διαβάζετε την παρούσα πτυχιακή εργασία και στον αγαπημένο μου αδερφό, που σε κάθε μου βήμα μου δίνουν κουράγιο να συνεχίσω να ακολουθώ τα όνειρα μου.

Σε μια δημιουργική σταδιοδρομία, η οποία μόλις ξεκίνησε...