



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**



**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

# **ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΚΑΡΙΠΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑ**

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ  
ΜΟΡΙΑΚΗΣ  
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ**

**ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2019**

**“ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ  
ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΒΗΤΑ ΣΤΗΝ  
ΑΠΟΠΤΩΣΗ ΝΕΥΡΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ”**

**“STUDIES ON THE ROLE OF THE MITOCHONDRIAL  
ESTROGEN RECEPTOR BETA IN APOPTOSIS OF  
NEURONAL CELLS”**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

### **Επιβλέπουσα**

**ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ**, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ  
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

### **Μέλος**

**ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ  
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

### **Μέλος**

**ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ  
ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα οιστρογόνα, ανήκουν στην οικογένεια των στεροειδών ορμονών και ασκούν σημαντικές βιολογικές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό, μυοσκελετικό, ανοσοποιητικό και κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs), ERα και ERβ. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι η βήτα μορφή του υποδοχέα οιστρογόνων (ERβ) εντοπίζεται σε διάφορες κυτταρικές σειρές στα μιτοχόνδρια, ενώ ελάχιστα είναι γνωστά για τις λειτουργίες του στο συγκεκριμένο οργάνο. Η κατανόηση των μοριακών του μηχανισμών στα μιτοχόνδρια είναι σημαντική, καθώς τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ενέργειας των κυττάρων και άλλων καίριων διαδικασιών, όπως η απόπτωση. Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε το ρόλο του μιτοχονδριακού ERβ στην ρύθμιση της επαγόμενης από σταυροσπορίνη (STS) απόπτωσης, χρησιμοποιώντας δύο σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές ποντικού, Neuro-2a. Η πρώτη είναι η κυτταρική σειρά N2A mtGFPERβ, η οποία υπερεκφράζει σταθερά τον ERβ, ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP), με μιτοχονδριακή στόχευση (mitochondrial targeting signal, mts) και η δεύτερη είναι η N2A mtGFP, η οποία υπερεκφράζει σταθερά την GFP, επίσης με μιτοχονδριακή στόχευση. Μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, εξετάστηκαν μέλη της οικογένειας των κασπασών (cysteine-aspartic proteases) (Procaspase-9, Caspase-9, Procaspase-3 και Caspase-3) και μέλη της οικογένειας BCL-2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2 και BCL2-associated X protein, BAX) ώστε να γίνει αξιολόγηση του ρόλου του mtERβ στην απόπτωση. Στην κυτταρική σειρά N2A mtGFPERβ φαίνεται να μειώνεται η επαγόμενη από την STS αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Caspase-3 και BAX, ύστερα από προσθήκη οιστραδιόλης (E2), ενώ για την κυτταρική σειρά N2A mtGFP δεν ισχύει κάτι ανάλογο. Συλλογικά, τα αποτελέσματά αυτής της μελέτης υποστηρίζουν ότι παρουσία E2, ο mtERβ είναι ικανός να ασκήσει αντι-αποπτωτική δράση σε νευρικά κύτταρα.

## ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

υποδοχέας οιστρογόνων βήτα, απόπτωση, οιστρογονική σηματοδότηση, μιτοχόνδριο

## ABSTRACT

Estrogens are a group of steroid hormones and they exert significant biological effects on the cardiovascular, musculoskeletal, immune and central nervous system through their interaction with estrogen receptors (ERs), ER $\alpha$  and ER $\beta$ . Previous studies reported that estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) is localized to mitochondria in various cell lines, whereas little is known about his physiological functions there. Understanding his molecular mechanisms in mitochondria is important, as mitochondria are the main source of cell energy production and other key processes such as apoptosis. In the present study, we explored the role of mitochondrial ER $\beta$  in regulating staurosporine (STS) - induced apoptosis using two stably transfected Neuro-2a murine cell lines. The first cell line is the N2A mtGFPER $\beta$ , which overexpresses ER $\beta$  as an hybrid protein, with the green fluorescent protein (GFP) with mitochondrial targeting signal (mts) and the second cell line is the N2A mtGFP, which overexpresses GFP, also with mitochondrial targeting signal. Through Western blot analysis in total cell extracts, members of the caspase family (cysteine-aspartic proteases) (Procaspase-9, Caspase-9, Procaspase-3 and Caspase-3) and members of the BCL-2 family (B-cell lymphoma 2, Bcl-2 and BCL2-associated X protein, BAX) were studied, in order to assess the role of mtER $\beta$  in apoptosis. In the N2A mtGFPER $\beta$  cell line, the STS-induced increase of protein levels of Caspase-3 and BAX appears to be reduced after the addition of estradiol (E2), whereas for the N2A mtGFP cell line such effect is not observed. Collectively, the results of this study suggest that in the presence of E2, mitochondrial ER $\beta$  has a protective effect against apoptosis in neuronal cells.

## KEY WORDS

estrogen receptor beta, apoptosis, estrogen signaling, mitochondrion

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς .....	10
1.1.1 Λειτουργία και ταξινόμηση πυρηνικών υποδοχέων .....	10
1.1.2 Δομή πυρηνικών υποδοχέων .....	10
1.1.3 Τρόπος δράσης πυρηνικών υποδοχέων .....	11
1.2 Στεροειδείς ορμόνες.....	12
1.3 Οιστρογόνα και υποδοχείς οιστρογόνων.....	12
1.3.1 Οιστρογόνα .....	12
1.3.2 Υποδοχείς οιστρογόνων (ERs).....	13
1.3.3 Ισομορφές υποδοχέων οιστρογόνων .....	15
1.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια υποδοχέων οιστρογόνων.....	16
1.4.1 Γενωμικές δράσεις ERs.....	16
1.4.1.1 Άμεση σύνδεση με το DNA .....	16
1.4.1.2 Έμμεση σύνδεση με το DNA.....	16
1.4.2 Μη γενωμικές δράσεις ERs .....	17
1.4.3 Σηματοδότηση ανεξάρτητη από προσδέτη .....	17
1.5 Μιτοχόνδριο.....	18
1.5.1 Λειτουργία μιτοχονδρίων .....	18
1.5.2 Δομή γονιδιώματος μιτοχονδρίων .....	19
1.5.3 Δράσεις ER στο μιτοχόνδριο .....	20
1.6 ER και καρκίνος.....	22
1.7 ER και νευρικό σύστημα .....	22
1.8 Σταυροσπορίνη .....	23
1.9 Σκοπός εργασίας.....	24
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.1 Οργανολογία .....	25
2.2 Υλικά .....	25
2.3 Κυτταρικές σειρές .....	27
2.4 Τεχνικές.....	27
2.4.1 Απόψυξη κυττάρων.....	27
2.4.2 Καλλιέργεια κυττάρων .....	28

2.4.3 Θρυψινοποίηση.....	28
2.4.4 Ψύξη Κυττάρων.....	28
2.4.5 Καταμέτρηση και στρώσιμο κυττάρων .....	29
2.4.6 Κατεργασία με ουσίες.....	29
2.4.7 Συλλογή κυττάρων .....	30
2.4.8 Λύση κυττάρων με χρήση υπερήχων (Sonication).....	30
2.4.9 Χρωματογραφική μέθοδος Bradford .....	31
2.4.10 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου .....	31
2.4.11 Παρασκευή δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση .....	31
2.4.12 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες .....	32
2.4.13 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blotting) .....	32
2.4.14 Δέσμευση μη ειδικών θέσεων (Blocking) .....	32
2.4.15 Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών .....	33
2.4.16 Εμφάνιση σήματος .....	33
2.4.17 Υπολογιστική επεξεργασία .....	33
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	34
3.1 Δοκιμαστικό πείραμα ελέγχου της δράσης της STS υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης.....	34
3.2 Αξιολόγηση του ρόλου του mtERβ στην απόπτωση υπό συνθήκες επώασης των κυττάρων N2A mtGFP και mtGFPERβ με 2 μM STS για 14 ώρες.....	35
3.3 Αξιολόγηση του ρόλου του mtERβ στην απόπτωση υπό συνθήκες επώασης των κυττάρων N2A mtGFP και mtGFPERβ με 2 μM STS για 6 ώρες.....	36
3.4 Αξιολόγηση του ρόλου του mtERβ στην απόπτωση υπό συνθήκες επώασης των κυττάρων N2A mtGFP και mtGFPERβ με 1 μM STS για 6 ώρες.....	37
3.5 Αξιολόγηση του ρόλου του mtERβ στην απόπτωση υπό συνθήκες επώασης των κυττάρων N2A mtGFP και mtGFPERβ με 0,5 μM STS για 12 ώρες.....	39
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	41
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	47

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1: Η δομική και λειτουργική οργάνωση των πυρηνικών υποδοχέων (Olefsky, 2001)	11
Εικόνα 2: Οι διαφορετικοί μηχανισμοί δράσης των NRs (Olefsky, 2001).....	12
Εικόνα 3: Χημική δομή των φυσικών οιστρογόνων .....	13
Εικόνα 4: Δομικές και λειτουργικές επικράτειες των ERα και ERβ (Gupte et al., 2015).....	15
Εικόνα 5: Τα διακριτά μοριακά μονοπάτια της δράσης των ERs (Heldring et al. 2007) .....	18

Εικόνα 6: Η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα (Chen et al., 2009).....	19
Εικόνα 7: Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών (Psarra & Sekeris, 2008).....	20
Εικόνα 8: Πιθανός μηχανισμός μετατόπισης του ERβ στο μιτοχόνδριο μέσω της δράσης του υποδοχέα Tom (Simpkins et al., 2008).....	21
Εικόνα 9: Νευροπροστατευτικοί καταρράκτες επαγόμενοι από την οιστραδιόλη (Arevalo et al., 2014) .....	22
Εικόνα 10: Μοριακή δομή σταυροσπορίνης.....	24
Εικόνα 11: Απεικόνιση των τεταρτημορίων του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer .....	29
Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των 6-well plates και των συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν .....	30
Εικόνα 13: Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Procasp-9, Casp-9, Casp-3 και β-actin. Τα κύτταρα mtGFP επωάστηκαν με 2μM STS για 2, 6 και 14 ώρες, και με 1μM STS για 6 και 9 ώρες.....	34
Εικόνα 14: Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Procasp-9, Casp-9, Casp-3, Bcl-2, β-actin και α-tubulin. Τα κύτταρα mtGFP και mtGFPERβ επωάστηκαν με 2μM STS για 14 ώρες.....	35
Εικόνα 15: Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Procasp-9, Bcl-2, β-actin και α-tubulin. Τα κύτταρα mtGFP και mtGFPERβ επωάστηκαν με 2μM STS για 6 ώρες .....	37
Εικόνα 16: Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Procasp-9, Procasp-3, Bcl-2 και β-actin. Τα κύτταρα mtGFP και mtGFPERβ επωάστηκαν με 1μM STS για 6 ώρες .....	38
Εικόνα 17: Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Procasp-9, Procasp-3, Casp-3, BAX και β-actin. Τα κύτταρα mtGFP και mtGFPERβ επωάστηκαν με 0,5μM STS για 12 ώρες .....	39

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Οργανολογία .....	25
Πίνακας 2: Χημικά .....	25
Πίνακας 3: Διαλύματα.....	26
Πίνακας 4: Θρεπτικά υλικά .....	26
Πίνακας 5: Αντισώματα.....	26
Πίνακας 6: Αναλώσιμα .....	27
Πίνακας 7: Πληροφορίες για κυτταρική σειρά N2A ( <a href="http://www.lgcstandards-atcc.org/">http://www.lgcstandards-atcc.org/</a> ) .....	27

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Διάγραμμα 1: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων α)Procasp-9, β)Casp-9 και γ)Casp-3 ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών του μορίου β-actin στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα με χρήση του προγράμματος ImageJ .....	35
Διάγραμμα 2: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων α)Procasp-9, β)Casp-9, και γ)Casp-3 ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων β-actin και α-tubulin στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα με χρήση του προγράμματος ImageJ.....	36
Διάγραμμα 3: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων α)Procasp-9 και β)Bcl-2 ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων α-	



<i>tubulin</i> και <i>β-actin</i> αντίστοιχα, στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα με χρήση του προγράμματος <i>ImageJ</i> .....	37
Διάγραμμα 4: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων α) <i>Procasp-9</i> , β) <i>Procasp-3</i> και γ) <i>Bcl-2</i> ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών του μορίου <i>β-actin</i> στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα με χρήση του προγράμματος <i>ImageJ</i> .....	38
Διάγραμμα 5: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων α) <i>Procasp-9</i> , β) <i>Procasp-3</i> , γ) <i>Casp-3</i> και δ) <i>BAX</i> ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών του μορίου <i>β-actin</i> στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα με χρήση του προγράμματος <i>ImageJ</i> .....	40

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς

### 1.1.1 Λειτουργία και ταξινόμηση πυρηνικών υποδοχέων

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (Nuclear Receptors, NRs) κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση, αναπαραγωγή και μεταβολική ομοιόσταση των ευκαρυωτικών οργανισμών (Bain et al., 2006). Αποτελούν ενδοκυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες που ρυθμίζουν την ενεργότητα σύνθετων δικτύων γονιδίων ως απόκριση στη σύνδεση με μικρά λιπόφιλα μόρια (Mangelsdorf et al., 1995). Η υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων υποδιαιρείται σε 3 κατηγορίες:

- I. Την οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών ορμονών που περιλαμβάνει τον υποδοχέα προγεστερόνης (progesterone receptor, PR), τον υποδοχέα οιστρογόνων (estrogen receptor, ER), τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor, GR), τον υποδοχέα ανδρογόνων (androgen receptor, AR) και τον υποδοχέα αλατοκορτικοειδών (mineralocorticoid receptor, MR). Μπορεί να είναι πυρηνικοί, κυτοσολικοί ή ακόμα και μεμβρανικοί (Levin, 2011).
- II. Την οικογένεια θυρεοειδών ορμονών/ρετινοειδών που περιλαμβάνει τον υποδοχέα θυρεοειδών ορμονών (thyroid hormone receptor, TR), τον υποδοχέα βιταμίνης D (vitamin D receptor, VDR), τον υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος (retinoic acid receptor, RAR), και τους ενεργοποιημένους υποδοχείς πολλαπλασιασμού των υπεροξεισωματίων (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs).
- III. Την οικογένεια «ορφανών» υποδοχέων που ορίζεται ως μια ομάδα πρωτεϊνών, που ταυτοποιήθηκαν με συγκριτική ανάλυση αλληλουχιών και ανήκουν στην υπερικογένεια πυρηνικών υποδοχέων αλλά ο προσδέτης είναι άγνωστος (Bain et al., 2007).

### 1.1.2 Δομή πυρηνικών υποδοχέων

Η δομή σχεδόν όλων των πυρηνικών υποδοχέων (Εικόνα 1) περιλαμβάνει δύο καλά χαρακτηρισμένες δομικές επικράτειες που δρούν ανεξάρτητα: μια περιοχή σύνδεσης με DNA (DNA-binding domain, DBD ή περιοχή C) εξαιρετικά συντηρημένη (Bain et al., 2006) και μια C-τελική περιοχή σύνδεσης με προσδέτη (ligand-binding domain, LBD ή περιοχή E) μέτρια συντηρημένη, απαραίτητη για το σχηματισμό ομοδιμερών ή/και ετεροδιμερών μετά από αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Αναφορικά, η συντηρημένη DBD κατευθύνει τους υποδοχείς προς τα στοιχεία απόκρισης ορμονών (Hormone Response Elements, HREs), τα οποία είναι ειδικές ακολουθίες DNA στους υποκινητές των γονιδίων που αναγνωρίζονται από τους NRs. Οι DBD και LBD συνδέονται μέσω μιας περιοχής αρμού (D) που επίσης ποικίλει και περιέχει ένα σήμα για την πυρηνική τοποθέτηση των υποδοχέων (Nuclear Localization Signal, NLS) ή τουλάχιστον κάποια στοιχεία του λειτουργικού NLS. Επίσης στην LBD αποδίδεται η προσδετοεξαρτώμενη μεταγραφική δραστηριότητα των υποδοχέων από

περιοχές ενεργοποίησης μεταγραφής (Activation Function-2, AF-2) και εντοπίζεται μια πολύ βασική επιφάνεια διμερισμού (Moras & Gronemeyer, 1998). Μερικοί πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να λειτουργήσουν και ως καταστολείς της μεταγραφής γονιδίων, όταν είναι συνδεδεμένοι στο DNA. Αυτό το φαινόμενο συμβαίνει κατά την απουσία ανταγωνιστών και σχετίζεται με τη στρατολόγηση συγκαταστολέων. Συνεπώς οι συρρυθμιστές ενεργούν κατά πολύ σαν σκαλωσιές στις οποίες οι σχετικοί παράγοντες τροποποίησης ιστονών αλλάζουν τη διαμόρφωση χρωματίνης για να επάγουν ή να καταστείλουν την έκφραση γονιδίων (O'Malley et al., 2008). Η N-τελική περιοχή (περιοχή A/B) των NRs ποικίλει τόσο σε αλληλουχία όσο και σε μέγεθος στους διαφορετικούς τύπους υποδοχέων, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις διαθέτει ισχυρές περιοχές ενεργοποίησης μεταγραφής (activation function-1, AF-1), ανεξάρτητες από τις αλληλεπιδράσεις της LBD με προσδέτες.



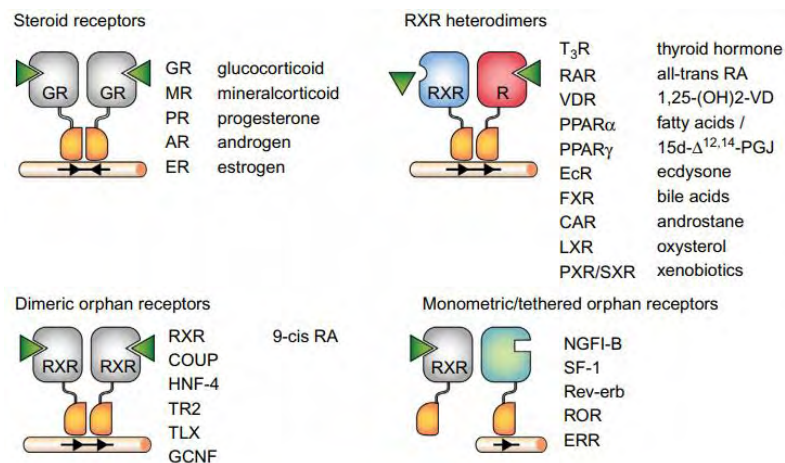
**Εικόνα 1:** Η δομική και λειτουργική οργάνωση των πυρηνικών υποδοχέων (Olefsky, 2001)

### 1.1.3 Τρόπος δράσης πυρηνικών υποδοχέων

Αν και όλοι οι πυρηνικοί υποδοχείς ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση, μεταξύ των τριών οικογενειών υπάρχουν λεπτές διαφορές στους βιοχημικούς μηχανισμούς με τους οποίους εκτελούν αυτή τη λειτουργία (Εικόνα 2). Οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να υπάρχουν ως μονομερή, ομοδιμερή, ή ετεροδιμερή, αναγνωρίζουν HREs και ομαδοποιούνται σε τέσσερις υποτύπους βάσει του μηχανισμού τους (Gupta & Mayer, 2013):

- I. Οι υποδοχείς τύπου I περιλαμβάνουν τους AR, ER, GR, MR, PR και είναι αγκυροβολημένοι στο κυτταρόπλασμα, όπου σε ανενεργή κατάσταση είναι δεσμευμένοι σε πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat-shock proteins, Hsp). Η σύνδεση με τον προσδέτη έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευσή τους από τις Hsp, τον ομοδιμερισμό τους και την μετακίνησή τους στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί συνδέονται σε HREs που αποτελούνται από 2 μισές ανάστροφες επαναλήψεις στις περιοχές του υποκινητή των γονιδίων στόχων. Εν συνεχεία στρατολογούνται άλλες πρωτεΐνες στο σύμπλεγμα DNA/υποδοχέα και αρχίζει η μεταγραφή του DNA σε mRNA (Glass and Rosenfeld, 2000).
- II. Οι υποδοχείς τύπου II περιλαμβάνουν τους PPARs και τους VDRs, που βρίσκονται σε ανενεργή κατάσταση στον πυρήνα, ενώ συνδέονται σε ευθείες επαναλήψεις στο DNA ως ετεροδιμερή. Σε αυτή τη μορφή είναι συμπλοκοποιημένοι με συγκαταστολείς, που συσχετίζονται με αποακετυλάσες ιστονών και έτσι αποσιωπώνται τα γονίδια-στόχοι. Η σύνδεση με τον προσδέτη επάγει απελευθέρωση των συγκαταστολέων, στρατολόγηση των πρωτεϊνών συνενεργοποίησης που περιλαμβάνουν ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών και έναρξη της γονιδιακής έκφρασης (Glass and Rosenfeld, 2000).

- III. Οι υποδοχείς τύπου III περιλαμβάνουν τους «ορφανούς υποδοχείς» και έχουν παρόμοια λειτουργία με τους υποδοχείς τύπου I καθώς και οι δύο προσδένονται ως ομοδιμερή, ενώ τα HREs που προσδένονται είναι ευθείες επαναλήψεις και όχι ανάστροφες.
- IV. Οι υποδοχείς τύπου IV περιλαμβάνουν επίσης τους «ορφανούς υποδοχείς», αλλά προσδένονται ως μονομερή σε μισά τμήματα (half-sites) των HREs (Mangelsdorf et al., 1995).



**Εικόνα 2:** Οι διαφορετικοί μηχανισμοί δράσης των NRs (Olefsky, 2001)

## 1.2 Στεροειδείς ορμόνες

Οι στεροειδείς ορμόνες συντίθενται από ένα κοινό πρόδρομο μόριο, τη χοληστερόλη και δεν αποθηκεύονται, αλλά απελευθερώνονται μόλις συντεθούν. Οι κύριοι ιστοί σύνθεσης των οιστρογόνων και ανδρογόνων είναι οι γονάδες, και σε μικρότερο βαθμό τα επινεφρίδια. Τα οιστρογόνα, οιστρόνη και οιστραδιόλη, μπορούν επίσης να παραχθούν σε σημαντικές συγκεντρώσεις στον λιπώδη ιστό (Cleary & Grossmann, 2009). Τα γλυκοκορτικοειδή και αλατοκορτικοειδή παράγονται στον φλοιό των επινεφριδίων (Gupta & Mayer, 2013). Οι στεροειδείς ορμόνες είναι λιπόφιλα μόρια, κυκλοφορούν στο αίμα και συνδέονται με πρωτεΐνες του πλάσματος που ονομάζονται σφαιρίνες δέσμησης στεροειδών ορμονών. Οι στεροειδείς ορμόνες ασκούν τις βιολογικές τους δράσεις μόνο όταν διαχέονται ελεύθερες, και για αυτόν τον λόγο η σύνδεσή τους με πρωτεΐνες δέσμησης στοχεύουν στην ελεγχόμενη δράση τους.

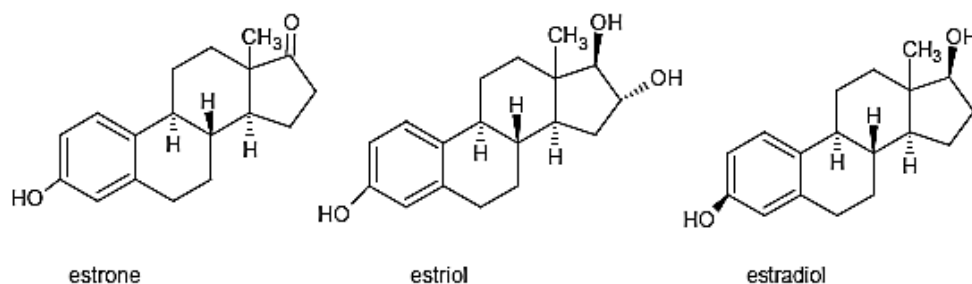
## 1.3 Οιστρογόνα και υποδοχείς οιστρογόνων

### 1.3.1 Οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα παίζουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη και διατήρηση των δευτερογενών φυλετικών χαρακτηριστικών καθώς και της αναπαραγωγικής λειτουργίας, κυρίως στις γυναίκες. Ωστόσο τόσο στις γυναίκες, όσο και στους άνδρες ασκούν μια τεράστια ποικιλία βιολογικών επιδράσεων στο καρδιαγγειακό, μυοσκελετικό, ανοσοποιητικό και κεντρικό νευρικό σύστημα (Gustafsson, 2003). Παράγονται κυρίως από τα πρωτογενή ωοθυλάκια κατά την περίοδο της ωρίμανσής τους, το ωχρό σωματίο, και το πλακούντα. Σε μικρότερες ποσότητες, παράγονται σε άλλους ιστούς όπως ο μαστός, το ήπαρ και τα επινεφρίδια.

Τα τρία κύρια φυσικά οιστρογόνα είναι η οιστρόνη (estrone, E1), η οιστραδιόλη (estradiol, E2), και η οιστριόλη (estriol, E3) (Εικόνα 3). Όλα τα φυσικά οιστρογόνα έχουν 18 άτομα άνθρακα και ένα φαινολικό δακτύλιο με μια ομάδα υδροξυλίου στον άνθρακα στη θέση 3. Το πιο ισχυρό οιστρογόνο που παράγεται στο ανθρώπινο σώμα είναι η 17β-οιστραδιόλη (Heldring et al., 2007). Η βιοσύνθεση των οιστρογόνων αρχίζει στα κύτταρα του ωοθυλακίου, με την σύνθεση ανδροστενοδιόνης από χοληστερόλη. Αυτή περνά το βασικό υμένα και μπαίνει στα κύτταρα της κοκκιώδους στοιβάδας της ωοθήκης, όπου μετατρέπεται είτε σε οιστρόνη, είτε σε τεστοστερόνη και ύστερα σε οιστραδιόλη. Η αντίδραση μετατροπής της οιστρόνης σε οιστραδιόλη καταλύεται από το ένζυμο 17β-HSD1 (17β-Hydroxysteroid dehydrogenase 1), ενώ για την τεστοστερόνη είναι η αρωματάση, μέλος του κυτοχρώματος P450 και κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP19.

Η οιστρόνη και η οιστριόλη, αν και έχουν υψηλή συγγένεια για τους υποδοχείς οιστρογόνων, είναι ασθενέστεροι αγωνιστές σε σχέση με την οιστραδιόλη. Αυτοί οι μεταβολίτες θεωρήθηκαν επισήμως ότι είναι ανενεργοί, αλλά πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι μπορεί να έχουν συγκεκριμένους ιστοειδικούς ρόλους (Gruber & Huber, 1999).



**Εικόνα 3:** Χημική δομή των φυσικών οιστρογόνων

### 1.3.2 Υποδοχείς οιστρογόνων (ERs)

Στα τέλη της δεκαετίας του 1950 ο Elwood Jensen ανακάλυψε τον ERα (NR3A1) που θεώρησε ότι είναι ο μοναδικός υποδοχέας οιστρογόνων στους οργανισμούς. Για να κατανοήσουν τη σημαντικότητά του, σχεδόν τρεις δεκαετίες αργότερα δημιούργησαν τον πρώτο knockout ποντικό ως προς αυτόν. Περίεργως ο ποντικός επιβίωσε, και συνειδητοποιήσαν ότι η ζωή είναι δυνατή χωρίς αυτόν τον υποδοχέα, που έως τότε θεωρούνταν ο μοναδικός μεσολαβητής της σηματοδότησης των οιστρογόνων. Λίγα χρόνια αργότερα ανακαλύφθηκε και ο ERβ (NR3A2) όπου έλυσε αυτό το μυστήριο. Με αυτά τα δεδομένα δημιούργησαν τόσο knockout ποντικούς ως προς τον ERβ, όσο και διπλά

knockouts ERα/β. Αυτά τα μοντέλα ποντικών απέδειξαν ότι η ζωή είναι εφικτή χωρίς έναν ή και τους δύο ERs, αλλά οι αναπαραγωγικές λειτουργίες είναι σοβαρά εξασθενημένες (Heldring et al., 2007). Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε και ένας άλλος υποδοχέας αυτής της οικογένειας, ο GPER (G protein coupled E2 receptor ή GPR30) (Gupte et al., 2015) ο οποίος βρίσκεται στη πλασματική μεμβράνη και η συγγενεία του για την 17β-οιστραδιόλη είναι σημαντικά χαμηλότερη.

Οι ERα και ERβ είναι προϊόντα έκφρασης διαφορετικών γονιδίων. Το ανθρώπινο γονίδιο που κωδικοποιεί τον ERα (ESR1) είναι 300 kb και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6 στη θέση 6q25.1. Το γονίδιο ESR1 περιλαμβάνει οκτώ εξώνια που εκφράζουν πρωτεΐνη πλήρους μήκους 66 kDa που αποτελείται από 595 αμινοξέα. Παρόμοια, το γονίδιο για τον ERβ (ESR2), το οποίο χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 14 στη θέση 14q23.2, είναι 254 kb με οκτώ εξώνια που εκφράζουν πρωτεΐνη 530 αμινοξέων με μοριακό βάρος 60 kDa (Yaşar et al., 2016).

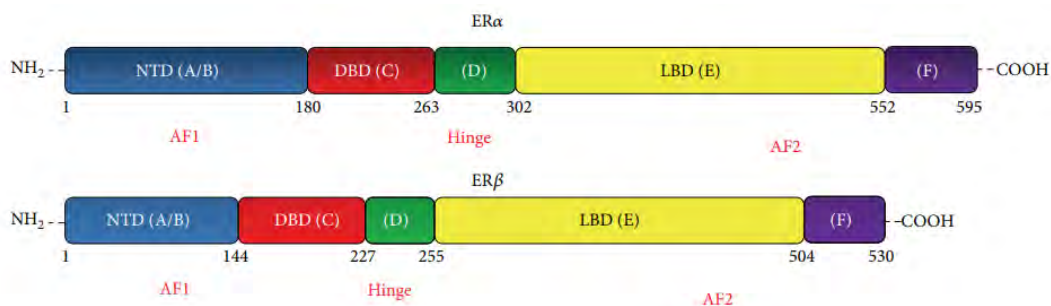
Οι δύο αυτοί υποδοχείς έχουν διακριτές λειτουργίες. Ο ERα κυριαρχεί, εκεί όπου ο ERβ παίζει δευτερεύοντα ρόλο, δηλαδή στη μήτρα, στους μαστικούς αδένες, στην υπόφυση, στους σκελετικούς μύες, στον λιπώδη ιστό και στα οστά. Ο ERβ αντίθετα βρέθηκε ότι κυριαρχεί στις ωοθήκες, στον προστάτη, στον πνεύμονα, στο καρδιαγγειακό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Ακόμη και εντός ενός απλού ιστού, το πρότυπο έκφρασης κάθε υποτύπου είναι ειδικό για κάθε τύπο κυττάρων (Yaşar et al., 2016). Σε ορισμένα γονίδια, ιδιαίτερα εκείνα που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, οι ERα και ERβ μπορεί να έχουν αντίθετες δράσεις (Liu et al., 2002), εύρημα που υποδηλώνει ότι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ως απόκριση στην E2 είναι το αποτέλεσμα μιας ισορροπίας μεταξύ της σηματοδότησης του ERα και του ERβ.

Για να είναι λειτουργικός ένας ER πρέπει να διμεριστεί. Ο διμερισμός των υποδοχέων επιτυγχάνεται με την ανταλλαγή υπομονάδων. Συγκεκριμένα, μέσα στο διμερές, το μονομερές του πρώτου υποδοχέα ανταλλάσσει τις υπομονάδες του με το μονομερές του δεύτερου υποδοχέα και αντίστροφα, σε κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας. Η ανταλλαγή αυτή πραγματοποιείται περιοδικά υπακούοντας στον κύκλο σύνδεσης και αποσύνδεσης των μονομερών (Erijman et al., 1993). Κάθε κατηγορία προσδέτη ασκεί μια χαρακτηριστική επίδραση στο ρυθμό ανταλλαγής μονομερών. Συνολικά, η διατήρηση της συνένωσης των μονομερών επιτυγχάνει τη σταθερότητα του διμερούς και τη λειτουργικότητα του υποδοχέα.

Οι ERs περιέχουν εξελικτικά διατηρημένες διακριτές δομικές και λειτουργικές επικράτειες, αντιπροσωπευτικές της δομής των NRs. Οι δύο ERs μοιράζονται υψηλό βαθμό ομολογίας των αλληλουχιών τους, εκτός από τις N-τελικές περιοχές, έχοντας παρόμοια συγγενεία για την E2 και συνδέονται με τα ίδια στοιχεία απόκρισης σε οιστρογόνα (Estrogen Response Elements, EREs). Συνοπτικά οι δομικές περιοχές των ERs είναι (Εικόνα 4):

- Η DBD (περιοχή C), που επιτρέπει στον ER να διμεριστεί και να δεσμευτεί στα EREs στο DNA μέσω των δύο δακτυλίων ψευδαργύρου.
- Η LBD (περιοχή E), που περιλαμβάνει την περιοχή δέσμευσης με τον προσδέτη (π.χ. E2) και τη προσδετοεξαρτώμενη μεταγραφική δραστικότητα των υποδοχέων (AF-2) όπου συνεργάζεται με την περιοχή A/B στην ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής.

- Η περιοχή D, που παίζει ρόλο στο διμερισμό του υποδοχέα και στη πρόσδεση σε Hsp. Λειτουργεί ως άρθρωση για την περιστροφή της περιοχής C γύρω από την περιοχή E και ρυθμίζει την είσοδο του ER στον πυρήνα.
- Η περιοχή A/B εμπλέκεται τόσο στις διαμοριακές όσο και στις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις καθώς και στην ενεργοποίηση της γονιδιακής μεταγραφής (AF-1).
- Οι δύο περιοχές AF-1 και AF-2, αλληλεπιδρούν με έναν αριθμό συνενεργοποιητών μεταγραφής, οι οποίοι μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή ανεξάρτητα, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις, συνεργάζονται μεταξύ τους. Η περιοχή AF-1 θα μπορούσε να ενεργοποιηθεί ακόμη και με προσδετοανεξάρτητο τρόπο, ανάλογα με την κατάσταση φωσφορυλίωσης του ER. Συγκεκριμένα, το κατάλοιπο Ser118 στην περιοχή AF-1 του ERα, καθώς και τα κατάλοιπα Ser106 και Ser124 στην περιοχή AF-1 του ERβ, είναι θέσεις φωσφορυλίωσης, απαραίτητες για τη προσδετοανεξάρτητη ενεργοποίηση του ER μέσω της σηματοδότησης Ras-MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Marino et al., 2006). Η περιοχή AF-2 είναι υπεύθυνη για διμερισμό και επηρεάζεται από συγκαταστολείς και συνενεργοποιητές για την πρόσδεση του υποδοχέα με την ορμόνη.



**Εικόνα 4:** Δομικές και λειτουργικές επικράτειες των ERα και ERβ (Gupte et al., 2015)

Η κοιλότητα του ER για τη σύνδεσή του με κάποιον προσδέτη είναι γενναιόδωρη σε μέγεθος, επιτρέποντας στον ER να δεσμεύει ένα ευρύ φάσμα ενώσεων με εντυπωσιακά διαφορετικές δομές. Συνεπώς, εκτός από τα οιστρογόνα ο ER εμφανίζει επίσης συγγένεια για πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, φθαλικούς εστέρες, ξενοοιστρογόνα και φυτοοιστρογόνα (Bolger et al., 1998).

Έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία συνθετικών ανταγωνιστών των οιστρογόνων και μερικοί από αυτούς χρησιμοποιούνται κλινικά για να αντιστρέψουν τις επιδράσεις των οιστρογόνων ως προς την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Ο όρος SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators) περιγράφει προσδέτες για τον ER που εμφανίζουν ιστοειδικότητα. Οι SERMs ως αντι-οιστρογόνα αντιτίθενται στη δράση των οιστρογόνων σε συγκεκριμένους ιστούς, ενώ μιμούνται τη δράση των ενδογενών οιστρογόνων σε άλλους (Katzenellenbogen BS & Katzenellenbogen JA, 2002).

### 1.3.3 Ισομορφές υποδοχέων οιστρογόνων

Έχουν περιγραφεί αρκετά εναλλακτικά μετάγραφα για αμφότερους υποτύπους των ERs, αλλά δεν είναι σαφές αν όλα εκφράζονται ως λειτουργικές πρωτεΐνες με βιολογικές λειτουργίες. Τα περισσότερα εναλλακτικά μετάγραφα του ERα διαφέρουν στην 5'-αμετάφραστη περιοχή τους (UTR). Επιπλέον, βραχύτερες ισομορφές του ERα που δεν έχουν το εξόνιο 1 και συνεπώς την NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή AF-1, έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές με το ρόλο τους να παραμένει άγνωστος.

Σε αντίθεση με τον ERα, αρκετά εναλλακτικά μετάγραφα του ERβ εκφράζονται ως πρωτεΐνες σε ιστούς. Η ισομορφή 530-αμινοξέων του ERβ του ανθρώπου θεωρείται σήμερα ως ο φυσικός τύπος ERβ. Η ανθρώπινη ισομορφή ERβ2, με 26 μοναδικά κατάλοιπα αμινοξέων που αντικαθιστούν το C-τελικό τμήμα της LBD, δεν είναι ικανή να συνδεθεί με προσδέτη ή συνενεργοποιητές και δεν έχει καμία μεταγραφική δραστηριότητα. Ο ERβ2 διμερίζεται με τον ERα, αποσιωπώντας έτσι τη σηματοδότηση (Ogawa et al., 1998).

## 1.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια υποδοχών οιστρογόνων

### 1.4.1 Γενωμικές δράσεις ERs

#### 1.4.1.1 Άμεση σύνδεση με το DNA

Η trans ενεργοποίηση των ERs, ξεκινά με τη σύνδεση του υποδοχέα με την E2 ή κάποια άλλη οιστρογονική ένωση (Εικόνα 5), όπου σχηματίζονται ομο- ή ετερο-διμερή ERα/ERβ και μετατοπίζονται στον πυρήνα για να συνδεθούν με υψηλή συγγένεια στα EREs που βρίσκονται σε υποκινητές, ιντρόνια ή στις 3' αμετάφραστες περιοχές. Η σύνδεση του προσδέτη με τον υποδοχέα προκαλεί επίσης τη στρατολόγηση μίας ποικιλίας συρρυθμιστών σε ένα σύμπλοκο που μεταβάλλει τη δομή της χρωματίνης και διευκολύνει την στρατολόγηση της RNA πολυμεράσης II (Vrtačnik et al., 2014). Με τον τρόπο αυτό, το σύμπλοκο E2-ER δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής που προάγει τη γονιδιακή έκφραση.

Το στοιχείο ERE αρχικά περιγράφηκε στο *Xenopus laevis* στον υποκινητή της βιτελλογενίνης A2: 5b-**GGTCACAGTGACC**-3b. Αυτή η «ιδανική» αλληλουχία ERE αποδείχθηκε ότι λειτουργεί με τρόπο ανεξάρτητο του προσανατολισμού και της απόστασης. Τα ανθρώπινα πλήρη EREs έχουν 3 bp μεταξύ των δύο μισών θέσεων (half-sites), με εξαίρεση τα EREs στον υποκινητή του γονιδίου του ανθρώπινου αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού (Transforming growth factor, TGF) που έχει 4 bp. Υπάρχει ακόμα αντιπαράθεση σχετικά με τη δέσμευση του ER στο DNA μέσω των μισών θέσεων των EREs, παρ'όλο που υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός παραδειγμάτων που συμφωνούν με αυτή τη θεωρία. Ακριβώς όπως οι αλλαγές στη διαμόρφωση των ERs που προκαλούνται από το προσδέτη επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις των ERs με τους συνενεργοποιητές τους, «μη ιδανικά» EREs επηρεάζουν επίσης την ικανότητα των ERs να δεσμεύουν τους συνενεργοποιητές τους (Marino et al., 2006).

#### 1.4.1.2 Έμμεση σύνδεση με το DNA



Η E2 μπορεί επίσης να επηρεάσει την έκφραση γονιδίων που δεν φέρουν EREs στους υποκινητές τους (Εικόνα 5). Στην πραγματικότητα, περίπου το 1/3 των γονιδίων που ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα δεν έχουν αλληλουχίες τύπου ERE. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι ERs δεν συνδέονται απευθείας με το DNA αλλά μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με άλλες κατηγορίες μεταγραφικών παραγόντων στα αντίστοιχα στοιχεία απόκρισης. Ένα από τα καλύτερα παραδείγματα περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση του συμπλόκου E2-ER με τις πρωτεΐνες FOS και JUN του συμπλόκου AP-1 (activator protein 1), και η πρόσδεση του AP-1 σε γονίδια που κωδικοποιούν την ωολευκωματίνη, τον ινσουλινόμορφο αυξητικό παράγοντα 1 (insulin-like growth factor, IGF1), την κολλαγενάση, την κυκλίνη D1, και την ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης. Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που συμμετέχουν σε αυτό τον τρόπο σηματοδότησης αποτελούν το Sp1 (Specificity protein 1), το NFκB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), το C/EBPβ (CCAAT/enhancer binding protein β), το GATA 1 και το STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5). Τα αποτελέσματα αυτών των αλληλεπιδράσεων εξαρτώνται από τον υποτύπο του ER, τον τύπο του προσδέτη και τον κυτταρικό τύπο (Björnström et al., 2005).

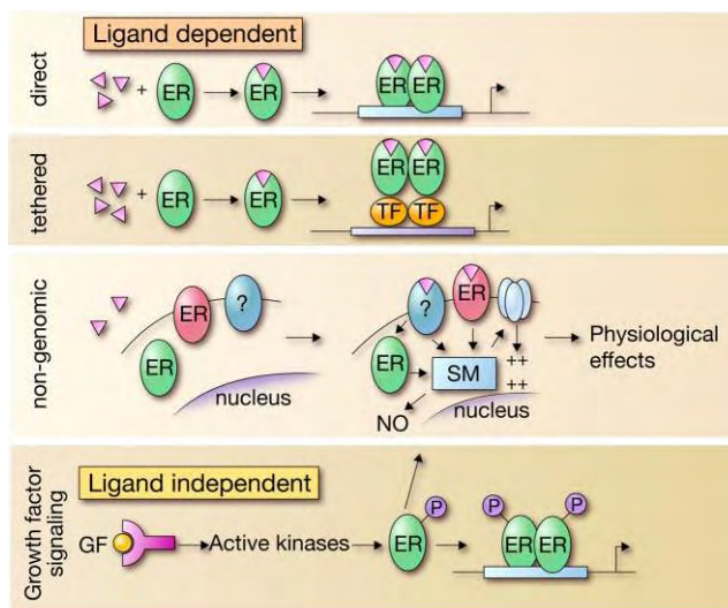
#### 1.4.2 Μη γενωμικές δράσεις ERs

Οι μη γενωμικές δράσεις είναι κοινές στις στεροειδείς ορμόνες και σχετίζονται συνήθως με την ενεργοποίηση διαφόρων καταρρακτών κινάσων που μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε έμμεσες αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση λόγω φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων (Εικόνα 5). Η μη γενωμική οιστρογονική σηματοδότηση σχετίζεται συχνότερα με τον μεμβρανικό ER, π.χ. GPER1 και με ορισμένες ισομορφές των ERα και ERβ. Η σύνδεση των οιστρογόνων στους ERs που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου μπορεί να προκαλέσει αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, διέγερση της δραστηριότητας της αδενυλικής κυκλάσης (AC) με αποτέλεσμα την παραγωγή της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP), ενεργοποίηση του καταρράκτη MAPK, ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3 (PI3K), και ενεργοποίηση μεμβρανικών υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (Ajj et al., 2013). Επίσης, υπάρχει δυνατότητα οιστρογονικής απόκρισης με αλληλεπίδραση (cross-talk) μεταξύ γενωμικών και μη γενωμικών οδών (Björnström et al., 2005).

#### 1.4.3 Σηματοδότηση ανεξάρτητη από προσδέτη

Ο ER μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί απουσία E2 ή άλλου κατάλληλου προσδέτη (Εικόνα 5). Αυξητικοί παράγοντες όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal growth factor, EGF) και ο IGF1 αυξάνουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της cAMP με αποτέλεσμα να ενεργοποιούνται πρωτεϊνικές κινάσες (PKA, PKC) και να φωσφορυλιώνουν τους ERs. Άλλα εξωκυτταρικά σήματα είναι κυτοκίνες, νευροδιαβιβαστές και ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου. Η φωσφορυλίωση των υποδοχέων σε ορισμένα κατάλοιπα ή στους σχετικούς συρρυθμιστές προκαλεί ενεργοποίηση των ERs, τον διμερισμό τους, την σύνδεση τους στο

DNA και τέλος τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Marino et al., 2006). Τα δύο πιο στοχευμένα αμινοξέα για φωσφορυλίωση είναι η Ser και η Tyr.



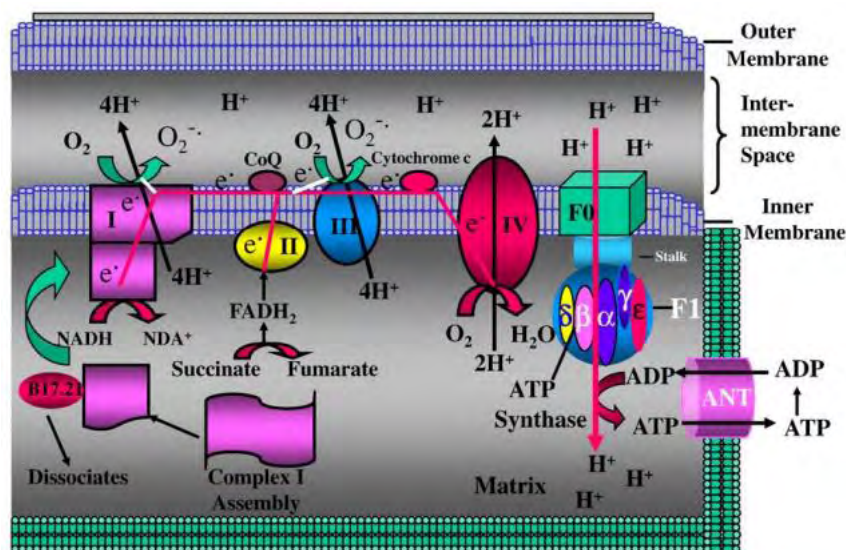
**Εικόνα 5:** Τα διακριτά μοριακά μονοπάτια της δράσης των ERs (Heldring et al., 2007)

## 1.5 Μιτοχόνδριο

### 1.5.1 Λειτουργία μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια ζωτικής σημασίας, καθώς συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως στην παραγωγή ουρίας, στη βιοσύνθεση της αίμης και στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Αποτελούν αισθητήρες των ενεργειακών απαιτήσεων του κυττάρου, παρέχοντας περισσότερο από το 90% των ενεργειακών απαιτήσεων του μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Oxidative phosphorylation, OXPHOS) στην αναπνευστική αλυσίδα. Εμπλέκονται σε πολλά στάδια του ενδιάμεσου μεταβολισμού. Επιπλέον, είναι βασικά συστατικά της απόκρισης στο στρες, διαδραματίζοντας κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), στην ρύθμιση του ανοσοποιητικού, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στη γήρανση. Εάν οι ενεργειακές ανάγκες δεν είναι υπερβολικές, η αναπνευστική αλυσίδα αυξάνει την απόδοση ATP με αλλοστερική ενεργοποίηση της OXPHOS από μεταβολίτες, όπως το ADP. Σε περιπτώσεις υψηλότερων ενεργειακών αναγκών, όπως προκαλούνται από γλυκοκορτικοειδείς και θυρεοειδείς ορμόνες σε κύτταρα-στόχους και κατά τη διάρκεια ορισμένων περιόδων ανάπτυξης, τα κύτταρα αντιδρούν με αυξημένη βιοσύνθεση ενζύμων OXPHOS ή σε ακραίες περιπτώσεις, με μιτοχονδριακή βιογένεση, αυξάνοντας τη μεταγραφή των πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων OXPHOS. Οι διαταραχές των λειτουργιών των μιτοχονδρίων, τόσο οι μεταλλάξεις των δομικών γονιδίων, όσο και των ρυθμιστικών τους περιοχών, έχουν

συσχετιστεί με νευρομυϊκές εκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson, η πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση και ο καρκίνος (Psarra & Sekeris, 2008). Η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα (Mitochondrial Respiratory Chain, MRC) (Εικόνα 6) αποτελείται από μια σειρά μεταλλοπρωτεϊνών δεσμευμένων στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Υπάρχουν τέσσερα μεγάλα συμπλέγματα πρωτεϊνών (I-IV) που σχετίζονται με την μεταφορά ηλεκτρονίων. Αυτά τα συμπλοκα συνεργάζονται στη μεταφορά ηλεκτρονίων και στην άντληση πρωτονίων στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ αυτών των συμπλόκων επιτυγχάνεται με τα κινητά συνένζυμα ουβικινόνης (CoQ) στη λιπιδιακή μεμβράνη, από τα συμπλοκα I και II προς το σύμπλοκο III, και το κυτόχρωμα c στον χώρο μεταξύ των μεμβρανών, από το σύμπλοκο III στο σύμπλοκο IV. Το σύμπλοκο F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub>-ATP συνθάση, συζεύγνει τη βαθμίδωση πρωτονίων κατά μήκος της μιτοχονδριακής εσωτερικής μεμβράνης στη σύνθεση του ATP από το ADP και P<sub>i</sub>. Η πιο γνωστή λειτουργία της MRC είναι η ικανότητά της να παράγει πάνω από 90% της κυτταρικής ενέργειας με τη μορφή ATP. Επιπλέον, η MRC παράγει μεγάλη ποσότητα ROS ως παράπροϊόντα, οι οποίες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην οξειδοαναγωγική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της απόπτωσης, και δρουν επίσης ως δευτεροί αγγελιοφόροι, ενώ μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη στο DNA και σε άλλα κρίσιμα μόρια μέσα στα μιτοχόνδρια (Chen et al., 2009).

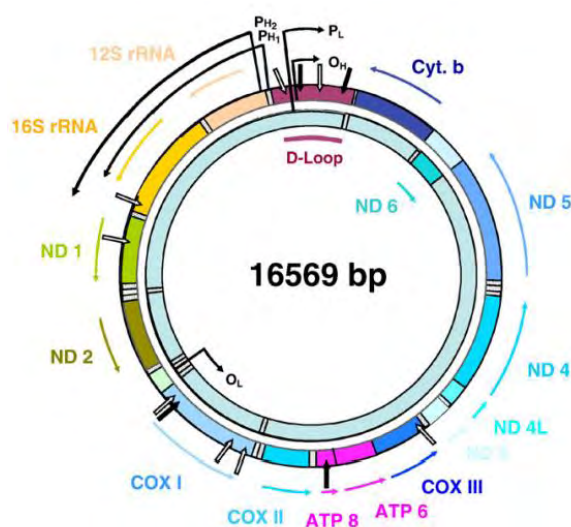


**Εικόνα 6:** Η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα (Chen et al., 2009)

### 1.5.2 Δομή γονιδιώματος μιτοχονδρίων

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA περίπου 16 Kb (Εικόνα 7). Οι δύο κλώνοι του DNA έχουν ασύμμετρη κατανομή των πουρινών και πυριμιδινών τους, δημιουργώντας τον βαρύ (H) και ελαφρύ (L) κλώνο. Ο κλώνος L μεταγράφεται από έναν επικρατέστερο υποκινητή (PL), ενώ ο κλώνος H μεταγράφεται από δύο γειτονικούς υποκινητές (PH1 και PH2), που βρίσκονται στην περιοχή ελέγχου που περιλαμβάνει έναν βρόχο εκτόπισης (D-loop). Η απουσία ενδογενούς χώρου υποδηλώνει ότι

η διαφοροποίηση της γονιδιακής έκφρασης περιορίζεται στον βρόχο D, αν και η πιθανή παρουσία ενδογενών ρυθμιστικών αλληλουχιών θα μπορούσε να προσφέρει δυνατότητες ρύθμισης άλλων σταδίων της μεταγραφικής διαδικασίας. Η μεταγραφή που προέρχεται από τους PH2 και PL παράγει μακρά, πολυκιστρονικά προϊόντα, μερικά από τα οποία έχουν μήκος ολόκληρου γονιδιώματος, που στη συνέχεια υποβάλλονται σε επεξεργασία απελευθερώνοντας ώριμα mRNAs και tRNAs, ενώ η μεταγραφή από τον PH1 δημιουργεί ένα μικρό σε μήκος μετάγραφο που κωδικοποιεί δύο rRNAs. Συνολικά κωδικοποιούνται 13 υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας, 2 rRNAs και 22 tRNAs. Το μιτοχονδριακό DNA περιέχει αλληλουχίες παρόμοιες με τα HREs και οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών δεσμεύονται σε αυτές (Psarra & Sekeris, 2008).



**Εικόνα 7:** Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών (Psarra & Sekeris, 2008)

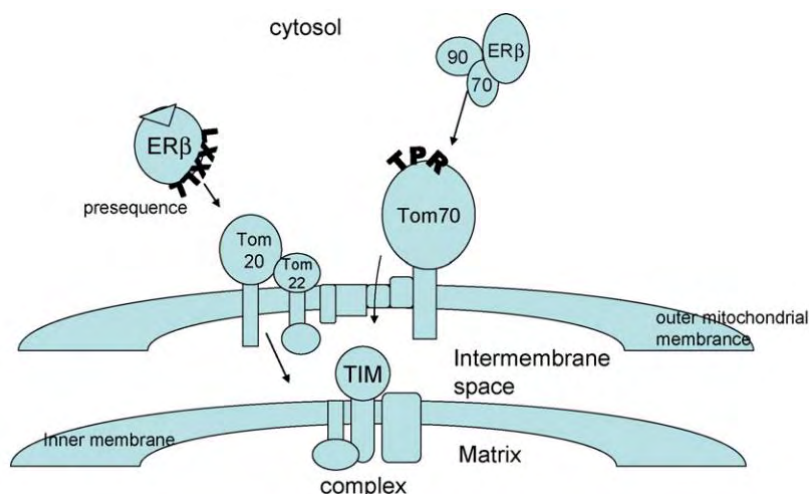
### 1.5.3 Δράσεις ER στο μιτοχόνδριο

Για την παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης απαιτούνται τόσο πυρηνικά όσο και μιτοχονδριακά ένζυμα για το σχηματισμό ενεργών αναπνευστικών συμπλεγμάτων. Ο συντονισμός της μεταγραφής γονιδίων OXPHOS στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα από τις ορμόνες, προέρχεται από τον πυρήνα, όπου το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα αλληλεπιδρά με τα αντίστοιχα HREs για να επάγουν τη μεταγραφή των πυρηνικών γονιδίων OXPHOS και των μεταγραφικών παραγόντων για αυτά τα γονίδια. Επιπλέον, επάγονται μιτοχονδριακοί μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι μετατοπίζονται στα μιτοχόνδρια. Όμως η παρουσία ERs στα μιτοχόνδρια καθώς και αλληλουχιών που μοιάζουν με EREs στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα πρότεινε έναν πρόσθετο τρόπο συντονισμού, με άμεση επίδραση του ER στην μιτοχονδριακή μεταγραφή (Psarra & Sekeris, 2008).

Τα οιστρογόνα αποτελούν σημαντικά αντι-αποπτωτικά σήματα για πολλούς τύπους κυττάρων, όπως καρκινικά κύτταρα μαστού, ενδοθηλιακά και εγκεφαλικά κύτταρα. Τα οιστρογόνα προωθούν την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μαστού. Μελέτες σε HepG2 κύτταρα που προέρχονται από ανθρώπινο ήπαρ και σε ανθρώπινα καρκινικά μαστικά κύτταρα MCF-7, έχουν δείξει ότι

η χορήγηση της E2 οδηγεί σε μετακίνηση των ERα και ERβ στα μιτοχόνδρια. Περαιτέρω, η E2 αυξάνει τα επίπεδα μιτοχονδριακών mRNAs που κωδικοποιούν τις υπομονάδες I, II και III της κυτοχρωμικής οξειδάσης και τη δραστηριότητα των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας (Psarra & Sekeris, 2008). Η παρουσία των ERα και ERβ στα μιτοχόνδρια των ιστών του μαστού, της καρδιάς, του εγκεφάλου, των οστών, των ματιών, του σπέρματος και των περιοδοντικών συνδέσμων, που έχουν υψηλή ζήτηση για παροχή ενέργειας από τα μιτοχόνδρια για τις λειτουργίες τους, δείχνει ότι οι μιτοχονδριακοί ERα και ERβ μπορεί να έχουν σημαντικούς ρόλους στη ρύθμιση του μιτοχονδριακού ενεργειακού μεταβολισμού στα συστήματα αυτά (Chen et al., 2009).

Πιθανοί μηχανισμοί μετατόπισης του ERβ στο μιτοχόνδριο απεικονίζονται στην Εικόνα 8. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω του συμπλόκου της μετατοπάσης (translocase) της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (TOM). Ο υποδοχέας Tom20 με τον υποδοχέα Tom22 μπορούν να αναγνωρίσουν μια ακολουθία LXXLL (όπου L λευκίνη και X οποιοδήποτε αμινοξύ) στο N-τελικό άκρο ή εσωτερικά και να μεταφέρουν τον ERβ από την εξωτερική μεμβράνη στην εσωτερική, στο σύμπλοκο μετατοπάσης της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, TIM. Εναλλακτικά, ένας ERβ χωρίς προσδέτη μπορεί να αναγνωριστεί από τον Tom70 μέσω του συμπλόκου Hsp90/70 (Simpkins et al., 2008).



**Εικόνα 8:** Πιθανοί μηχανισμοί μετατόπισης του ERβ στο μιτοχόνδριο μέσω της δράσης του υποδοχέα Tom (Simpkins et al., 2008)

Πειράματα υποστηρίζουν την αντι-αποπτωτική δράση του μιτοχονδριακού ERβ στην περίπτωση του μυοκαρδίου αρουραίων, που υπέστη τραύμα και αιμορραγία. Υπό αυτές τις συνθήκες, συνέβη παρατεταμένη καταστολή των καρδιαγγειακών λειτουργιών, και η συγκέντρωση του ERβ στα μιτοχόνδρια των καρδιακών κυττάρων μειώθηκε. Η E2 και ο αγωνιστής DPN (Diarylpropionitrile) για τον ERβ, αλλά όχι ο αγωνιστής PPT (Propylpyrazoletriol) για τον ERα, αποκατέστησαν την καρδιακή λειτουργία και αύξησαν την συγκέντρωση του ERβ στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, η E2 αύξησε την δέσμευση του ERβ στο μιτοχονδριακό DNA, ενώ παράλληλα αυξήθηκε η έκφραση των COX I και COX II, η δραστηριότητα του αναπνευστικού συμπλέγματος IV και η παραγωγή του ATP, το οποίο υποδεικνύει την καρδιοπροστατευτική δράση της ορμόνης (Hsieh et al., 2006).

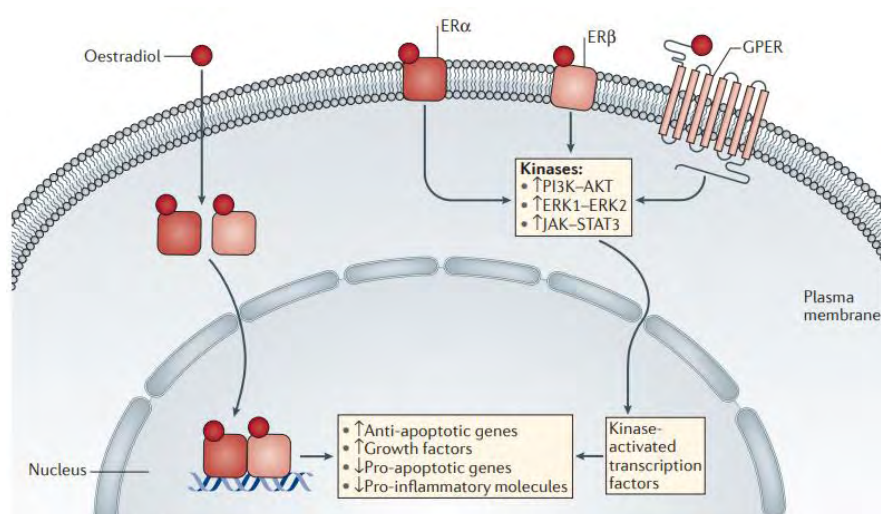


## 1.6 ER και καρκίνος

Τα οιστρογόνα είναι σημαντικά αντι-αποπτωτικά σήματα για πολλούς κυτταρικούς τύπους, όπως καρκινικά κύτταρα μαστού, ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και κύτταρα εγκεφάλου. Η δράση τους επιτυγχάνεται μέσω των ERs. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι ο ERα επάγει την ογκογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Αντιθέτως, ο ERβ φαίνεται να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μαστού, μέσω της καταστολής των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK and PI3K, της καταστολής της δράσης του ERα και της ρύθμισης γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση (Gorgoglietas et al., 2018). Επιπλέον, έχουν καταγραφεί μειωμένα επίπεδα του ERβ κατά τη διάρκεια ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και του προστάτη. Ωστόσο, μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο ERβ εμφανίζει τόσο αντιπολλαπλασιαστικές όσο και πολλαπλασιαστικές δράσεις, γεγονός που υποδηλώνει έναν διπτό ρόλο.

## 1.7 ER και νευρικό σύστημα

Η 17β-οιστραδιόλη είναι ισχυρός νευροπροστατευτικός παράγοντας *in vitro* για εγκεφαλική βλάβη που προκαλείται από ισχαιμία. Οι ERα, ERβ και GPER ενεργοποιούν παράλληλους νευροπροστατευτικούς μηχανισμούς στον εγκέφαλο (Εικόνα 9), συμπεριλαμβανομένων των καταρρακτών σηματοδότησης ERK1-ERK2 (extracellular signal-regulated kinases) και PI3K, ενώ παράλληλα αναστέλλουν το σηματοδοτικό μονοπάτι JNK (c-Jun N-terminal kinase). Αυτές οι ενέργειες καταλήγουν στην έκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών και νευροπροστατευτικών αυξητικών παραγόντων, ενώ καταστέλλεται η έκφραση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών και η παραγωγή προ-φλεγμονωδών μορίων στα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου (Arevalo et al., 2014).



**Εικόνα 9:** Νευροπροστατευτικοί καταρράκτες επαγόμενοι από την οιστραδιόλη (Arevalo et al., 2014)

Μελέτες σε θηλυκά τρωκτικά έχουν δείξει ότι η μείωση των επιπέδων E2 στο πλάσμα λόγω ωοθηκεκτομής, ενισχύει την εγκεφαλική βλάβη, μειώνοντας έτσι το μεταβολισμό της γλυκόζης στον εγκέφαλο και αυξάνοντας τα ολιγομερή β-αμυλοειδούς. Με τη σειρά του, η αποκατάσταση των επιπέδων E2 στο πλάσμα των συγκεκριμένων ζώων με ορμονική θεραπεία μειώνει τις παραπάνω βλάβες. Σε ανθρώπους, η μείωση των επιπέδων E2 λόγω εμμηνόπαυσης σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εξασθένησης της γνωστικής λειτουργίας, συναισθηματικές διαταραχές και ακόμη νόσο του Alzheimer. Αυτό υποδηλώνει ότι η E2 είναι επίσης νευροπροστατευτική στο είδος μας. Επιπλέον, τόσο σε τρωκτικά όσο και σε πτηνά, ο εγκέφαλος αποκρίνεται σε οξεία βλάβη αυξάνοντας την έκφραση και τη δραστηριότητα της αρωματάσης και επομένως τη παραγωγή E2. Αυτό ρυθμίζεται ταχέως στον εγκέφαλο από τις γλουταμινεργικές συνάψεις. Η σημασία της αρωματάσης ως νευροπροστατευτικό μόριο στους ανθρώπους υποδηλώνεται από την ύπαρξη αυξημένου κινδύνου για τη νόσο του Alzheimer, λόγω γενετικών παραλλαγών του συγκεκριμένου ενζύμου (Arevalo et al., 2014).

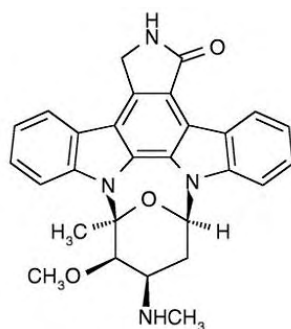
Ένα σημαντικό κομμάτι των νευροπροστατευτικών μηχανισμών της οιστραδιόλης είναι η ρύθμιση των μελών της οικογένειας B λεμφοκυττάρων 2 (BCL-2) που εμπλέκονται στον έλεγχο της απόπτωσης. Στον εγκέφαλο, η οιστραδιόλη αυξάνει την έκφραση των αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας BCL-2, όπως Bcl-2, Bcl-XL και Bcl-W, και ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των προ-αποπτωτικών μελών της οικογένειας BCL-2, όπως τα BAD (Bcl-2-associated death promoter) και BIM (Bcl-2-like protein 11). Τόσο ο ERα όσο και ο ERβ μεσολαβούν στην επαγόμενη από E2 αύξηση της έκφρασης του μορίου Bcl-2 στους νευρώνες του ιππόκαμπου. Η ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης ERK1-ERK2 ή PI3K από τους ERs έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση του μορίου BAD και την επαγωγή της έκφρασης του μορίου Bcl-2 (Arevalo et al., 2014).

Τέλος, η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3β (GSK3β) έχει προταθεί ότι είναι ένας πιθανός στόχος για τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Ένα από τα αποτελέσματα της μη φυσιολογικής ενεργοποίησης της GSK3β σε νευροεκφυλιστικές νόσους είναι η υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau, υπεύθυνη για τη σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων, και είναι η κύρια αιτία της δυσλειτουργίας αυτής της πρωτεΐνης στη νόσο του Alzheimer. Η δραστηριότητά της μειώνεται με φωσφορυλίωση στη Ser9 από την AKT (Protein kinase B, PKB). Η E2, μέσω του ERα και του GPER, ενεργοποιεί την PI3K στον εγκέφαλο και στους πρωτογενείς νευρώνες. Η PI3K, με τη σειρά της, φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την AKT, η οποία φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την GSK3β και μειώνοντας την φωσφορυλίωση της Tau (Arevalo et al., 2014).

## 1.8 Σταυροσπορίνη

Η σταυροσπορίνη (STS), που χρησιμοποιείται ευρέως ως αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) με ευρύ φάσμα δραστηριότητας, είναι ένα αλκαλοειδές που απομονώνεται από το βακτήριο *Streptomyces staurospores* (Εικόνα 10). Είναι ισχυρός αλλά μη εκλεκτικός αναστολέας κινάσων και ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων που συναγωνίζονται το ATP. Η μη ειδική της δράση οφείλεται στο ότι η θέση πρόσδεσης του ATP στις κινάσες είναι εξαιρετικά συντηρημένη και για αυτόν τον λόγο αποκλείστηκε η κλινική της χρήση (Sanchez

et al., 2006). Η STS έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου σε μια ποικιλία κυτταρικών σειρών, ενισχύει τη διαφοροποίηση των κυττάρων προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας στον άνθρωπο και προκαλεί μορφολογικές αλλαγές τυπικές της απόπτωσης σε κύτταρα μυοκαρδίου και σε νευρώνες στον ιππόκαμπο αρουραίων. Ενεργοποιεί μηχανισμούς απόπτωσης όπως κασπάσες, κεραμίδια και σηματοδότηση SAPK/JNK1. Επομένως, η επαγόμενη από σταυροσπορίνη απόπτωση έχει αναγνωριστεί ως χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση του μηχανισμού απόπτωσης σε κύτταρα θηλαστικών (Chae et al., 2000).



**Εικόνα 10:** Μοριακή δομή σταυροσπορίνης

## 1.9 Σκοπός εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου του μιτοχονδριακού ERβ (mitochondrial ERβ, mtERβ) στην απόπτωση νευρικών κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν δύο σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές που προέρχονται από την κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού (Neuro-2a, N2A), και παρασκευάστηκαν από τον υποψήφιο διδάκτορα Ιωάννη Τσιάλτα. Η επιλογή της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς έγινε λόγω του κομβικού ρόλου που διαδραματίζει ο ERβ στο συγκεκριμένο ιστό καθώς και λόγω του ότι ενδογενώς οι ERs εκφράζονται σε μικρές ποσότητες. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε η κυτταρική σειρά N2A mtGFPERβ, η οποία υπερεκφράζει σταθερά τον ERβ, ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (green fluorescent protein, GFP), με μιτοχονδριακή στόχευση (mitochondrial targeting signal, mts) και η κυτταρική σειρά N2A mtGFP, η οποία υπερεκφράζει σταθερά την GFP, επίσης με μιτοχονδριακή στόχευση, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Τα κύτταρα επωάστηκαν με σταυροσπορίνη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους ώστε να επαχθεί απόπτωση και με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western να διερευνηθεί κατά πόσο ο ERβ μπορεί να ασκήσει αντι-αποπτωτική δράση, παρουσία ή απουσία της E2 .



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Οργανολογία

Πίνακας 1: Οργανολογία

Μηχάνημα (Εταιρεία)	Μηχάνημα (Εταιρεία)
Αναδευτήρας (Heidolph Rotamax)	Φυγόκεντρος (Eppendorf 5810R)
Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης) (A. Kruss Optronic Germany)	Φυγόκεντρος (Helme Z36HK)
Αυτόματος πιπιεταδόρος (HTC Lab solution)	Φωτόμετρο (Spectronic® 20 GENESYSTM)
Επωαστήρας (SHEL LAB)	Heat blocker (KISKER)
Ζυγοί (KERN EW και KERN 440-47 N)	Incubator (New Brunswick Galaxy 170S)
Μηχάνημα εμφάνισης W.B και gel (FluoChemE/ ProteinSimple)	Laminar Flow Hood Tel Star AV-30/70
Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών (W.B Kodak)	Quick spin (Nippon Genetics Europe GmbH)
Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (Biorad mini-trans Blot)	Sonicator herscher (Ultrasound Technologies, model UP400S)
Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad miniPROTEAN® tetra cell)	Vortex (Bio Vortex V1)
Υδατόλουτρο (P. SELECTA)	

### 2.2 Υλικά

Πίνακας 2: Χημικά

Χημική ουσία (Εταιρεία)	Χημική ουσία (Εταιρεία)
Αιθανόλη 100% (Sigma)	FBS (Invitrogen)
Βιοαιθανόλη (kalochem)	Fixer (Kodak)
β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)	Glycerol (Applichem)
Ισοπροπανόλη (Sigma)	Glycine (Serva)
Μεθανόλη (Sigma)	HCl (Merck)
Μείγμα αναστολέων πρωτεασών (Sigma)	L-Glutamine (Invitrogen)
Πενικιλίνη-στρεπταμυκίνη (Invitrogen)	NaCl (Panreac)
Acrylamide/Bis acrylamide 40 % (Bio-Rad)	Pageruler TM Prestained Protein (ThermoScientific Fermentas)
APS (Sigma)	SDS (Sigma)
Bradford protein assay (Bio-Rad)	Skimmed milk powder (Regilait)
Bromophenol blue (Fluca)	STS
Developer (Kodak)	TEMED (Applichem)
DMSO (Sigma)	Tris (Serva)
DTT (Serva)	Tween 20 (Sigma)
E2 (Sigma)	Triton X-100 (Applichem)
ECL (A & B) (Santa Cruz)	Trypsin-EDTA 5% 10x (Gibco)
EDTA (Serva)	

**Πίνακας 3: Διαλύματα**

Διαλύματα	Τρόπος παρασκευής
Διάλυμα Bradford	Stock 5x. Χρήση σε C <sub>TEΛ</sub> 1x, αραιωμένο σε ddH <sub>2</sub> O. Αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford, 1:1000.
APS	Παρασκευή δ/τος συγκέντρωσης 10% w/v με χρήση ως διαλύτη ddH <sub>2</sub> O. Αποθήκευση στους -20°C.
Developer/Fixer	Παρασκευή με ανάμειξη 1 : 3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα σε dH <sub>2</sub> O.
Lysis Buffer	20mM Tris pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 250mM NaCl και 3mM EDTA Αποθήκευση στους 4°C. Πριν τη χρήση του γίνεται προσθήκη 1mM DTT, 0,1mM PMSF και κατάλληλη ποσότητα κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών από την εταιρεία Roche.
PMSF 200mM	Με αραιώση 10% σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20mM.
Running Buffer 10x	25mM Tris, 192mM glycine, 0.1% SDS διαλυμένων σε ddH <sub>2</sub> O.
Running Buffer 1x	Παρασκευή δ/τος σε συγκέντρωση 10% v/v από RB 10x και χρήση dH <sub>2</sub> O ως διαλύτη. Προσθήκη SDS 0.1%.
Sample Buffer 4x	1M Tris pH 6.8, 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% κυανού της βρωμοφαινόλης. Αποθήκευση στους -20°C.
TBS 10x	24g Tris-base, 88g NaCl σε 1L ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4-7,6.
TBST 1x	Αραίωση του stock buffer TBS 10x σε dH <sub>2</sub> O. Προσθήκη Tween-20 σε αναλογία 1%.
Transfer Buffer 10x	10% Running Buffer 10x, 20% MeOH και 0.05% SDS. Συμπλήρωση όγκου με dH <sub>2</sub> O. Αποθήκευση στους 4°C.
Tris 20mM pH 7.5	Αραίωση διαλύματος Tris 1M pH 7.5 (4°C) σε ddH <sub>2</sub> O.
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	Διάλυση κατάλληλης ποσότητας Tris σε dH <sub>2</sub> O. Ρύθμιση pH στο 8.8 με προσθήκη HCl 12N. Αποθήκευση στους 4°C.

**Πίνακας 4: Θρεπτικά υλικά**

Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco®	Glucose	L-glutamate
DMEM low glucose	1g/mol	+

**Πίνακας 5: Αντισώματα**

Αντίσωμα έναντι	Εταιρεία
<b>Πρωτογενή αντισώματα</b>	
α-tubulin	Sigma
β-actin	Sigma
BAX	Cell Signalling
Bcl-2	Cell Signalling
caspase 3	Cell Signalling
caspase-3 mouse specific	Cell Signalling
caspase-9	Cell Signalling
<b>Δευτερογενή Αντισώματα</b>	
mouse IgG-HRP	Pierce Antibodies
rabbit IgG-HRP	Pierce Antibodies

**Πίνακας 6: Αναλώσιμα**

<b>Αναλώσιμα (Εταιρεία)</b>
Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15mL, 50mL) (Sarstedt)
Γυάλινα σιφώνια (Kimble)
Ειδικές φιάλες για ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων (Sarstedt)
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,2μm (Amersham™ Protran™)
Πιπέττες ορολογικές -Serological (2, 5, 10 και 25mL) (Sarstedt)
Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6× wells (Sarstedt)
Πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorfs (1.5mL, 2.0mL) (Sarstedt)
Ρύγχοι (0.2-10μL, 20-200μL και 100-1000μL) (Sarstedt)
Σωληνάρια για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (cryovials ή cryotubes) (Sarstedt)
Φωτογραφικά φιλμ (FUJI MEDICAL)
Χαρτιά Whatman (Sigma)

## 2.3 Κυτταρικές σειρές

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι σταθερές κυτταρικές σειρές α) N2A mtGFP ERβ, η οποία υπερεκφράζει σταθερά την βήτα μορφή του υποδοχέα οιστρογόνων (ERβ) ως υβριδική πρωτεΐνη με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική (Green Fluorescent protein, GFP) με μιτοχονδριακή στόχευση, και β) N2A mtGFP, που υπερεκφράζει σταθερά την GFP με μιτοχονδριακή στόχευση και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Οι παραπάνω σταθερές κυτταρικές σειρές, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 1.9, παρασκευάστηκαν από τον υποψήφιο διδάκτορα Ιωάννη Τσιάλτα από την κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού Neuro-2a (N2A) (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7: Πληροφορίες για κυτταρική σειρά N2A (<http://www.lgcstandards-atcc.org/>)**

<b>Neuro-2a (ATCC® CCL-131™)</b>	
Οργανισμός	Mus musculus, mouse
Ιστός	Εγκέφαλος
Κυτταρικός τύπος	Νευροβλάστης
Ασθένεια	Νευροβλάστωμα

## 2.4 Τεχνικές

### 2.4.1 Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα φυλάσσονται σε cryovials σε βαθιά κατάψυξη, είτε σε θερμοκρασία -80°C, είτε σε υγρό άζωτο στους -120°C. Η διαδικασία για το ξεπάγωμα ξεκινάει με την επώαση του cryovial στο υδατόλουτρο στους 37°C, όπου πριν ξεπαγώσει πλήρως το οποθετούμε στον θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Ύστερα μεταφέρεται το περιεχόμενό του (1 ml) σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 4-5 ml θρεπτικό μέσο (DMEM), ώστε να μειωθεί ο χρόνος επαφής των κυττάρων με το DMSO το οποίο υπήρχε κατά τη φύλαξή τους. Στη συνέχεια ο δοκιμαστικός σωλήνας φυγοκεντρείται για 5 min, στους 1000 rpm και στους 25°C. Γίνεται

απόρριψη του υπερκείμενου και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 5ml θρεπτικό. Το επαναδιαλυτοποιημένο περιεχόμενο μεταφέρεται σε φλάσκα και τοποθετείται εντός του επωαστικού κλίβανου με 5% CO<sub>2</sub> και θερμοκρασία 37°C.

#### **2.4.2 Καλλιέργεια κυττάρων**

Τα N2A κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε DMEM cis low glucose με προσθήκη 10% FBS, 2 mM L-γλουταμίνης και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν στους 37°C σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα με 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2.4.3 Θρυψινοποίηση**

Η θρυψινοποίηση γίνεται με σκοπό να πρωτεολυθούν οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων τόσο στην επιφάνεια της φλάσκας όσο και σε γειτονικά τους κύτταρα, ώστε να γίνει χρήση των κυττάρων. Εκτός αυτού, η διαδικασία αυτή γίνεται και σε περιπτώσεις κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας κατά 80-90% ή σε περιπτώσεις ύπαρξης πολλών συσσωματωμάτων. Η κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα πέρασμα (passage). Αρχικά γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού από τη φλάσκα και προσθήκη 1-2 ml θρυψίνης. Με ήπιες κινήσεις γίνεται ανάδευση για κάλυψη όλων των κυττάρων από τη θρυψίνη. Πραγματοποιείται μικροσκοπικός έλεγχος και άμεση τοποθέτηση της φλάσκας στον κλίβανο για 1- 2 min, ώστε να δράσει η θρυψίνη. Ξανά γίνεται εξέταση της φλάσκας στο μικροσκόπιο ώστε να επιβεβαιωθεί ότι όλα τα κύτταρα επιπλέουν. Επίσης η θρυψίνη μπορεί να προκαλέσει κυτταροτοξικότητα αν μείνει αρκετό χρόνο στη φλάσκα. Στη συνέχεια προστίθεται στη φλάσκα θρεπτικό σε ποσότητα 4x του όγκου της θρυψίνης, για να σταματήσει τη δράση της, και μεταφέρεται το περιεχόμενο της φλάσκας σε falcon. Ύστερα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 5min, στους 1000rpm και στους 25°C. Τέλος γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε θρεπτικό για να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω τα κύτταρα ή να επανατοποθετούνται στη φλάσκα για περαιτέρω ανάπτυξη.

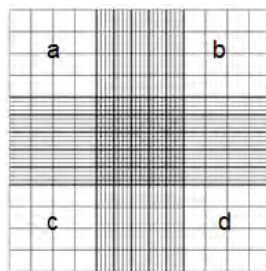
#### **2.4.4 Ψύξη Κυττάρων**

Μετά τη θρυψινοποίηση της φλάσκας και τη μεταφορά της ποσότητας των κυττάρων που υπολογίσθηκε να παγώσουν σε falcon, γίνεται φυγοκέντρηση και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος των κυττάρων με FBS. Η ποσότητα των κυττάρων που ψύχεται εξαρτάται από την εκάστοτε κυτταρική σειρά καθώς και από τη διαθεσιμότητα των κυττάρων. Το σύνηθες είναι η ψύξη δύο cryovial με προσθήκη στο καθένα 90% FBS με τα διαλυτοποιημένα κύτταρα και 10% DMSO. Λογω υψηλής κυτταροτοξικότητας του DMSO πρέπει να προστεθεί τελευταίο στο vial και η μεταφορά του vial στην κατάψυξη πρέπει να γίνει όσο το γρηγορότερο γίνεται, με συνεχή ανάδευση.

## 2.4.5 Καταμέτρηση και στρώσιμο κυττάρων

Για να επιτευχθεί το στρώσιμο σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας απαιτείται η μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού και η ισόποση τοποθέτησή του στο well-plate. Ύστερα από θρυψινοποίηση και καλή επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων με θρεπτικό μέσο, μεταφέρονται 10 μl εντός της καλυπτρίδας στο αιμοκυτταρόμετρο neubauer και μετράται ο αριθμός των κυττάρων στα αντίστοιχα τεταρτημόρια του neubauer στο μικροσκόπιο (Εικόνα 11). Ο υπολογισμός της ποσότητας των κυττάρων γίνεται:

- Έστω a, b, c και d ο συνολικός αριθμός των κυττάρων σε κάθε τεταρτημόριο, υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων που διαθέτει ανά ml μέσω του τύπου:  
$$N_{\text{διαθέσιμων κυτ.}} = (a+b+c+d) \times 10.000 / 4$$
- Υπολογίζεται ο αριθμός των επιθυμητών κυττάρων μέσω του τύπου:  
$$N_{\text{επιθυμητών κυτ.}} = N_{\text{κυτ./well}} \times N_{\text{well}}$$
- Υπολογίζεται ο όγκος του διαλύματος που περιέχει τον αριθμό επιθυμητών κυττάρων μέσω του τύπου:  $V_{\text{επιθυμητό}} = N_{\text{επιθυμητών κυτ.}} / N_{\text{διαθέσιμων κυτ.}}$
- Γίνεται μεταφορά του  $V_{\text{επιθυμητό}}$  σε νέο falcon και φυγοκέντρωση για 5 min, στους 1000 rpm και σε RT.
- Διαλυτοποίηση του ιζήματος σε κατάλληλο  $V_{\text{θρεπτικού}}$  (Όγκος θρεπτικού που προτείνεται για το well x  $N_{\text{well}}$ ) και ισοκατανομή του παραπάνω διαλύματος στα wells.
- Τέλος, μετά την τοποθέτηση των κυττάρων εντός των wells, το plate κλείνει και γίνεται μία περιφερική κίνηση προκειμένου να είναι ομοιόμορφη η κατανομή των κυττάρων εντός των πηγαδιών. Πριν, τοποθετηθούν στον επωαστικό κλίβανο, εξετάζεται η εικόνα τους μικροσκοπικά.



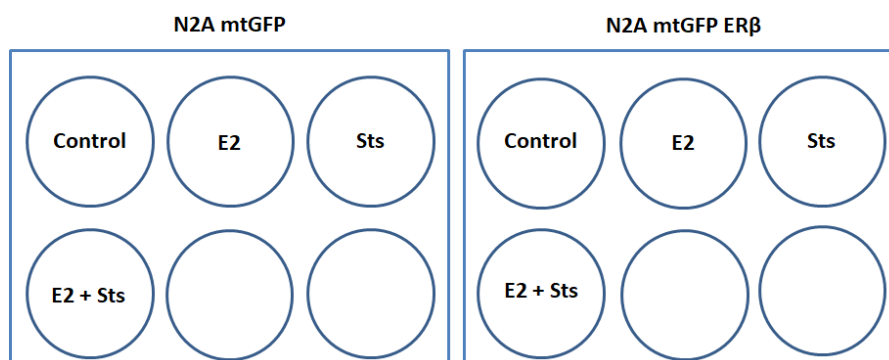
**Εικόνα 11:** Απεικόνιση των τεταρτημορίων του αιμοκυτταρόμετρου neubauer

## 2.4.6 Κατεργασία με ουσίες

Τόσο το στρώσιμο των κυττάρων όσο και η προσθήκη ουσιών πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό που περιείχε charcoal inactivated FBS, απ' το οποίο έχουν απομακρυνθεί ορμόνες και ανάλογα ορμονών ώστε να είναι δυνατή η αντικειμενική εκτίμηση της επίδρασής τους μετά την εξωγενή τους προσθήκη. Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι η σταυροσπορίνη (STS) σε  $C_{\text{TEL}}=0,5 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$  και  $2 \mu\text{M}$  και η οιστραδιόλη (E2) σε  $C_{\text{TEL}}=10^{-9} \text{ M}$ . Στις συνθήκες που δεν προστέθηκαν οι παραπάνω ουσίες προστέθηκαν οι διαλύτες τους, σε ανάλογες ποσότητες, προς αποφυγή λανθασμένης αξιολόγησης αποτελεσμάτων λόγω της πιθανής επίδρασης του διαλύτη τους. Έτσι όπου δεν προστέθηκε η E2 προστέθηκε

αιθανόλη (στην οποία είναι διαλυμένη η E2) και όπου δεν προστέθηκε STS προστέθηκε DMSO (στο οποίο είναι διαλυμένη η STS).

Μελετήθηκαν 4 συνθήκες όμοιες και για τις δύο κυτταρικές σειρές (Εικόνα 12). Η πρώτη περιλαμβάνει τον μάρτυρα (control), όπου τα κύτταρα επωάστηκαν μόνο με αιθανόλη και DMSO. Στη δεύτερη τα κύτταρα επωάστηκαν με E2 και DMSO, στη τρίτη με STS και αιθανόλη, ενώ στην τελευταία προστέθηκε τόσο E2 όσο και STS. Προς αποφυγή λανθασμένης αξιολόγησης αποτελεσμάτων λόγω της πιθανής επίδρασης του διαλύτη, σε όλες τις συνθήκες κατεργασίας των κυττάρων διατηρήθηκε σταθερή η συγκέντρωση του της αιθανόλης και του DMSO αντίστοιχα. Μελετήθηκαν διαφορετικοί χρόνοι επώασης των κυττάρων με τις ουσίες σε ένα φάσμα από 2 έως 14 ώρες.



**Εικόνα 12:** Σχηματική απεικόνιση των 6-well plates και των συνθηκών που χρησιμοποιήθηκαν

#### 2.4.7 Συλλογή κυττάρων

Αφού τελειώσει ο χρόνος επώασης με τις ουσίες γίνεται συλλογή των κυττάρων. Έτσι, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και γίνεται πλύση με PBS 1x. Έπειτα, χρησιμοποιώντας μια ράβδο με πλαστική εύκαμπτη επιφάνεια στην άκρη (scraper) συλλέγονται τα κύτταρα σε PBS x1 και , τοποθετούνται σε αποστειρωμένα erpendorfs τα οποία βρίσκονται σε πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στους 2000 rpm στους 4°C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα, το οποίο αποτελεί τα κύτταρα, είτε φυλάσσεται στους -80°C είτε χρησιμοποιείται απευθείας για λύση των κυττάρων.

#### 2.4.8 Λύση κυττάρων με χρήση υπερήχων (Sonication)

Αρχικά προστίθεται διάλυμα λύσης κυττάρων (lysis buffer), ο όγκος του οποίου εξαρτάται από την ποσότητα του εκάστοτε ιζήματος, και επώαση για 20 min στον πάγο. Ακολουθεί λύση με χρήση υπερήχων (sonication) στον πάγο όπου επιτυγχάνεται αποτελεσματικότερη λύση και κατακερματισμός του DNA. Γίνεται επανάληψη 4 κύκλων όπου τα κυτταρικά περιεχόμενα εκτίθενται για 1 sec στους υπερήχους που εκπέμπονται από την αντίστοιχη συσκευή, με τους κύκλους να απέχουν μεταξύ τους 35 sec.

#### 2.4.9 Χρωματογραφική μέθοδος Bradford

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται για ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών που υπάρχουν στο εκάστοτε δείγμα. Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 προσδένεται στα μόρια των πρωτεϊνών, ειδικότερα στα κατάλοιπα λυσίνης, παράγοντας έγχρωμο (μπλέ) προϊόν, όπου η έντασή του εξαρτάται από τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Αυτή η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα 595 nm. Σε νέα αποστειρωμένα erpendorf, όπου έχει ήδη προστεθεί το δείγμα σε συγκέντρωση 1/1000 (1 μl), προστίθεται το αντιδραστήριο της Bradford (1 ml), ακολουθεί vortex και επώαση των δειγμάτων για 20 min στο σκοτάδι σε RT. Σε ένα erpendorf προστίθεται lysis buffer 1/1000 (1 μl) αντί για δείγμα για τη χρήση του ως τυφλό. Μόλις ολοκληρωθεί ο χρόνος της αντίδρασης, τα δείγματα φωτομετρούνται, ύστερα από μηδενισμό με το τυφλό. Η συγκέντρωση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης του κάθε 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. Ανάλυση των δεδομένων με τη βοήθεια του προγράμματος excel, παρέχουν τελικά την ακριβή σύσταση των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση.

#### 2.4.10 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

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

#### 2.4.11 Παρασκευή δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Τα δείγματα που θα δημιουργηθούν για την ηλεκτροφόρηση περιέχουν τα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα, Tris-HCl pH 7,5 και Sample buffer 4x (περιέχει SDS και β-μερκαπτοαιθανόλη). Ο τελικός όγκος που θα φορτωθεί στα πηγαδάκια από κάθε δείγμα πρέπει να είναι ο ίδιος, όπως και η ποσότητα των πρωτεϊνών που θα περιέχονται σε αυτά. Για αυτόν τον λόγο έγινε υπολογισμός των ποσοτήτων από τα κυτταρικά εκχυλίσματα βάσει της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης που προέκυψε με εφαρμογή της μεθόδου Bradford στον προσδιορισμό συγκέντρωσης διαλυμάτων γνωστής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη. Ο όγκος του Tris-HCl και του κυτταρικού εκχυλίσματος καθορίζεται ανάλογα με την πρωτεϊνική συγκέντρωση του κυτταρικού εκχυλίσματος. Το sample buffer που προστίθεται έχει τον ίδιο όγκο για όλα τα δείγματα σε σταθερή τελική συγκέντρωση 1x, ενώ το Tris-HCl προστίθεται για να επιτευχθεί

ο ίδιος όγκος σε όλα τα δείγματα. Καθ' όλη τη διάρκεια παρασκευή τους τα δείγματα παραμένουν στον πάγο (4°C).

#### **2.4.12 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες**

Τα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα θερμαίνονται στους 95°C, για 5min, συνθήκες οι οποίες είναι αποδιατακτικές. Ο βρασμός παρουσία SDS έχει ως αποτέλεσμα την κατάργηση ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων και της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών, ενώ η β-μερκαπτοαιθανόλη προκαλεί αναγωγή των ομοιοπολικών δισουλφιδικών δεσμών και κατάργηση της τριτοταγής δομής τους. Οι πρωτεΐνες με την έκθεσή τους στο αρνητικά φορτισμένο απορροπτικό SDS, αποκτούν αρνητικό φορτίο. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα, γίνεται ανάλυση μείγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (protein marker), που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες μοριακών μεγεθών. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή ένταση ηλεκτρικού ρεύματος στα 0,02 A, σε Running buffer 1x.

#### **2.4.13 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blotting)**

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών, που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά, από το πήκτωμα σε μια μεμβράνη νιτροκυταρίνης με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου κάθετα προς τις δύο επιφάνειες, και την ανίχνευσή τους με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα. Το διάλυμα μεταφοράς περιέχει SDS και μεθανόλη. Το SDS αυξάνει την ικανότητα μεταφοράς αλλά μειώνει την πρόσδεση των πρωτεϊνών στη νιτροκυταρίνη. Η μεθανόλη χρησιμοποιείται γιατί ελαχιστοποιεί το φούσκωμα του πηκτώματος κατά τη διάρκεια του αποτυπώματος και αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών στη νιτροκυταρίνη. Στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς οι πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο και μετακινούνται μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο προς το θετικό πόλο.

Συγκεκριμένα μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί η εξισορρόπηση με εμπότιση του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου, της μεμβράνης νιτροκυταρίνης, των σφουγγαριών και των χαρτιών Whatman στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς. Έπειτα, στην κασετίνα τοποθετούνται κατά σειρά με τη μέθοδο "sandwich": ένα σφουγγαράκι, τρία απορροφητικά χαρτιά Whatmann, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, η μεμβράνη, τρία απορροφητικά χαρτιά Whatmann και ένα σφουγγαράκι. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με διαβίβαση ρεύματος σταθερής έντασης 0,35 A για 70 min στους 4°C. Με το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη τοποθετείται εντός TBST 1x.

#### **2.4.14 Δέσμευση μη ειδικών θέσεων (Blocking)**

Η μεμβράνη νιτροκυταρίνης επωάζεται σε διάλυμα TBST1x με 10% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα (3%-5%), υπό ανάδευση σε RT για 1h. Με τη διαδικασία αυτή γίνεται δέσμευση των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης νιτροκυταρίνης από τις πρωτεΐνες του



γάλακτος, έτσι ώστε να παρεμποδιστεί πιθανή μη ειδική πρόσδεση αντισωμάτων στις θέσεις αυτές.

#### **2.4.15 Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών**

Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα, αραιωμένο σε διάλυμα TBST1x με 2% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα, στους 4°C υπό ανάδευση καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Το ποσοστό αραιώσής του δίνεται από την εταιρεία προμήθευσής του και είναι τέτοιο ώστε να δίνει μόνο ειδικό σήμα. Μετά την επώαση με το πρώτο αντίσωμα πραγματοποιούνται διαδοχικές 5x5 min πλύσεις με TBSTx1 υπό ανάδευση σε RT. Αυτό αποσκοπεί στην απομάκρυνση της περίσσειας αντισώματος έτσι ώστε να παραμείνει στη μεμβράνη μόνο ότι έχει συνδεθεί ειδικά. Ύστερα, πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα για 1 h σε RT, το οποίο είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδος (horseradish peroxidase, HRP). Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει ειδικά σταθερές περιοχές επιτόπων IgG του πρωτογενούς αντισώματος και είναι ειδικό του ζώου από το οποίο έχει παραχθεί. Είναι αραιωμένο σε διάλυμα TBST1x με 2% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα και με αραιώση 1/50.000. Αφού αφαιρεθεί το δευτερογενές αντίσωμα, γίνονται εκ νέου 3x5 min πλύσεις με TBST1x σε RT.

#### **2.4.16 Εμφάνιση σήματος**

Η ανίχνευση γίνεται με το σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence) που βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Το φως μπορεί να ανιχνευθεί καθώς «προσβάλει» φωτοευαίσθητα φιλμ αυτοραδιογραφίας ύστερα από σύντομη έκθεση. Το σήμα λαμβάνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα και παραμένει μόνιμα αποτυπωμένο στο υπό έκθεση φιλμ ως ζώνες της πρωτεΐνης που αντέδρασε με το αντίσωμα. Συγκεκριμένα με το πέρασμα των πλύσεων, η μεμβράνη τοποθετείται σε γυάλινη επιφάνεια και επωάζεται για 3 min με τα αντιδραστήρια χημειοφωταύγειας ECL A και ECL B (σε αναλογία 1:1) στο σκοτάδι. Ύστερα, τοποθετείται σε λεπτή, διάφανη μεμβράνη και σε κασέτα έκθεσης. Πάνω σε αυτήν εφαρμόζεται ένα κομμάτι X-ray φιλμ και κλείνεται η κασέτα για χρόνους έκθεσης ανάλογους τους πρωτογενούς αντισώματος. Στη συνέχεια, το φιλμ τοποθετείται σε διάλυμα εμφανιστή (Developer), ξεπλένεται με νερό και μονιμοποιείται σε διάλυμα fixer. Τέλος ξεπλένεται πάλι με νερό και αφήνεται να στεγνώσει.

#### **2.4.17 Υπολογιστική επεξεργασία**

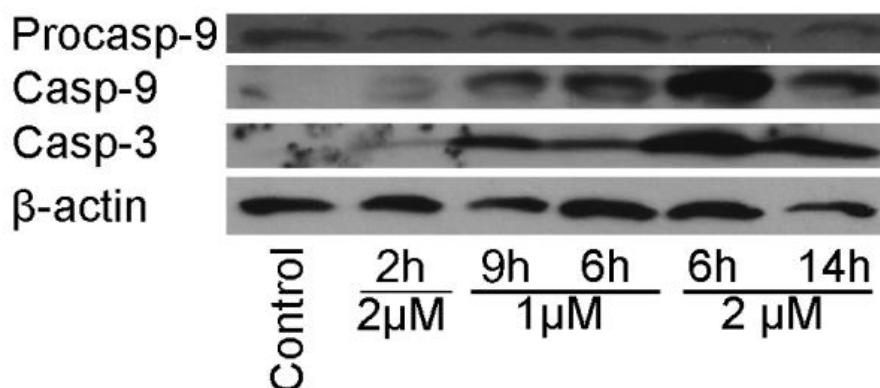
Η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με τη χρήση της μεθόδου Bradford, ο υπολογισμός της μετέπειτα σύστασης των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση καθώς και οι κανονικοποιήσεις όλων των πειραματικών διαδικασιών έγιναν στο Microsoft Office Excel. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ και για την απεικόνισή τους το Adobe Photoshop CS.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

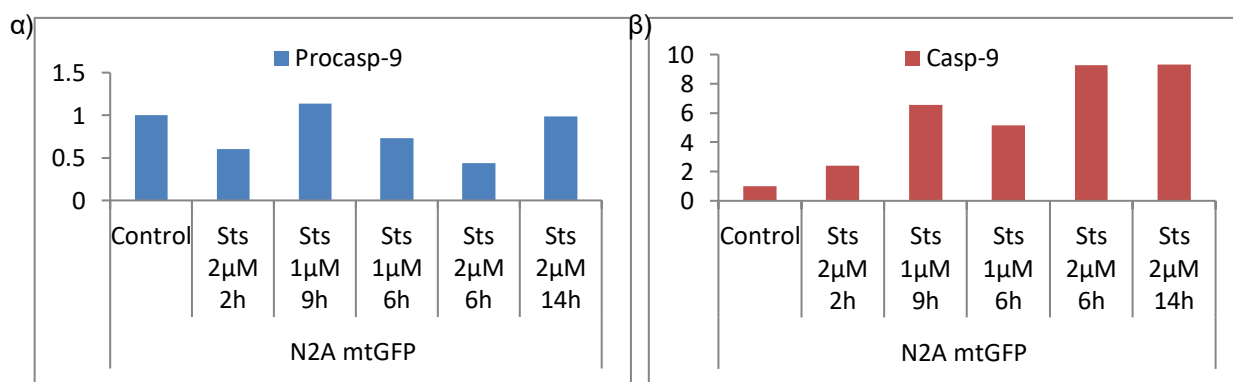
Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Χρησιμοποιήθηκαν ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από τις σταθερές κυτταρικές σειρές N2A mtGFP και mtGFPERβ αφού πρώτα επωάστηκαν με E2, σε σταθερή τελική συγκέντρωση  $10^{-9}$  M, με STS, σε διάφορες συγκεντρώσεις, καθώς και με συνδυασμό αυτών. Σε όλα τα πειράματα η E2 προστέθηκε 8 ώρες πριν την επώαση των κυτάρων με STS και ανανεώνονταν κατά τη προσθήκη της STS.

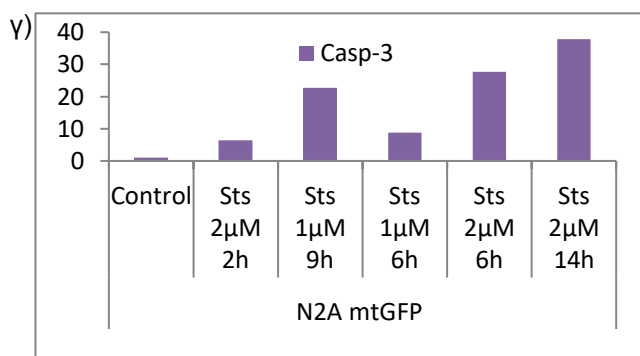
#### 3.1 Δοκιμαστικό πείραμα ελέγχου της δράσης της STS υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης

Με σκοπό να ελεγχθεί η αποπτωτική δράση της STS στην κυτταρική σειρά N2A, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυτάρων N2A mtGFP με STS σε συγκεντρώσεις 2  $\mu$ M (για 2, 6 και 14 ώρες) και 1  $\mu$ M (για 6 και 9 ώρες). Στην Εικόνα 13 απεικονίζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων προκασπάση-9 (Procaspase-9, Procasp-9), κασπάση-9 (Caspase-9 Casp-9), κασπάση-3 (Caspase-3, Casp-3) και  $\beta$ -ακτίνη ( $\beta$ -actin) (μόριο αναφοράς), μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα. Στο Διάγραμμα 1 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνικών ζωνών, σε διάφορες συνθήκες του πειράματος, μετά την κανονικοποίηση αυτών ως προς το μόριο αναφοράς,  $\beta$ -actin.



**Εικόνα 13:** Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Procasp-9, Casp-9, Casp-3 και  $\beta$ -actin. Τα κύτταρα mtGFP επωάστηκαν με 2  $\mu$ M STS για 2, 6 και 14 ώρες, και με 1  $\mu$ M STS για 6 και 9 ώρες



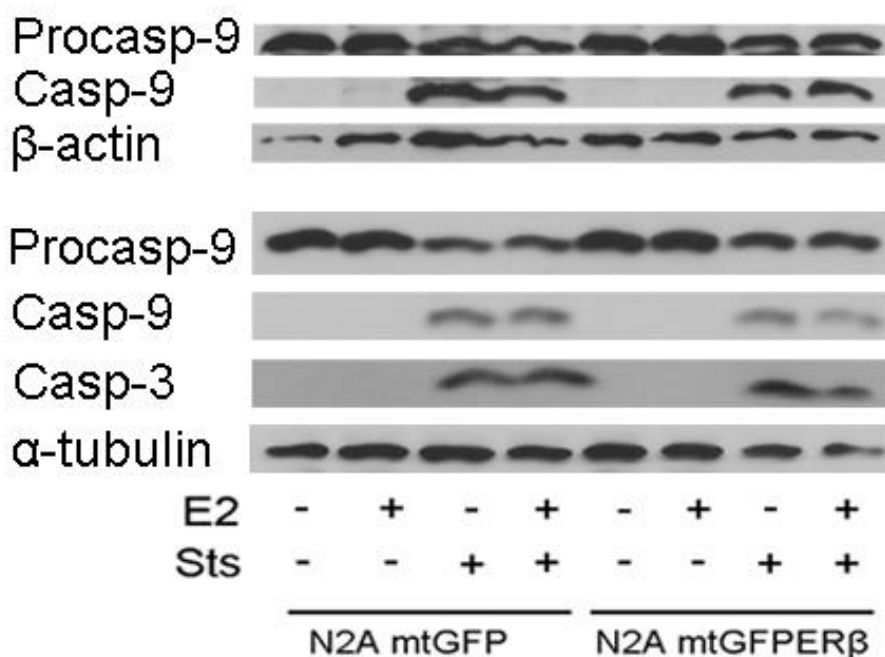


**Διάγραμμα 1:** Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων α) *Procasp-9*, β) *Casp-9* και γ) *Casp-3* ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών του μορίου  $\beta$ -actin στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα με χρήση του προγράμματος *ImageJ*

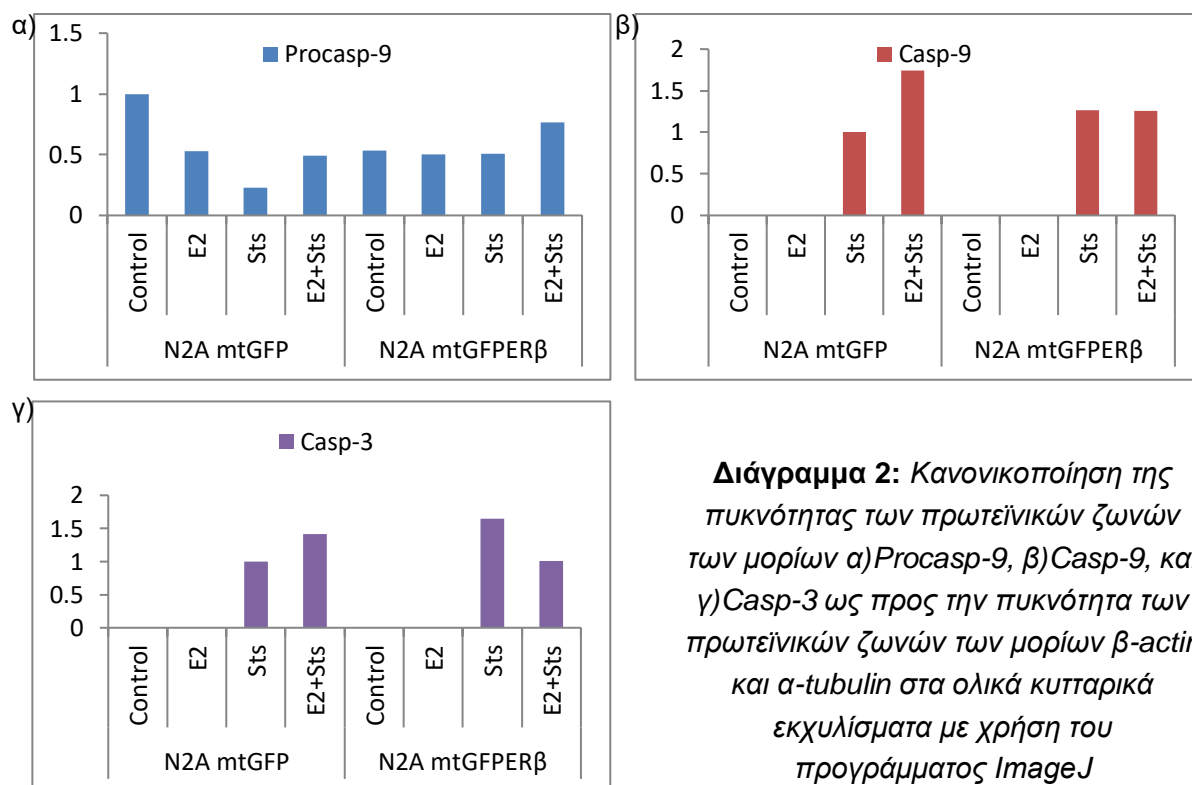
Στην Εικόνα 13/Διάγραμμα 1 παρατηρούμε ότι τα κύτταρα που επώαστηκαν με 2  $\mu$ M STS εμφανίζουν, ανεξαρτήτως χρόνου επώασης, αισθητά πιο αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα όλων των υπο εξέταση μορίων.

### 3.2 Αξιολόγηση του ρόλου του mtER $\beta$ στην απόπτωση υπό συνθήκες επώασης των κυττάρων N2A mtGFP και mtGFPER $\beta$ με 2 $\mu$ M STS για 14 ώρες

Στην Εικόνα 14 απεικονίζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων *Procasp-9*, *Casp-9*, *Casp-3*,  $\beta$ -actin και  $\alpha$ -τουμπουλίνη ( $\alpha$ -tubulin) (μόριο αναφοράς), μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα. Στο Διάγραμμα 2 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνικών ζωνών, σε διάφορες συνθήκες του πειράματος, μετά την κανονικοποίηση αυτών ως προς τα μόρια αναφοράς,  $\beta$ -actin και  $\alpha$ -tubulin.



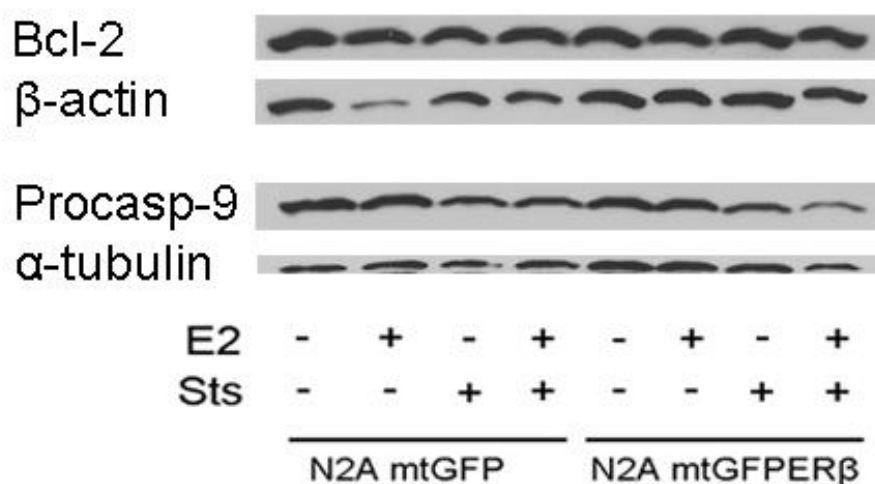
**Εικόνα 14:** Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων *Procasp-9*, *Casp-9*, *Casp-3*,  $\beta$ -actin και  $\alpha$ -tubulin. Τα κύτταρα mtGFP και mtGFPER $\beta$  επώαστηκαν με 2  $\mu$ M STS για 14 ώρες



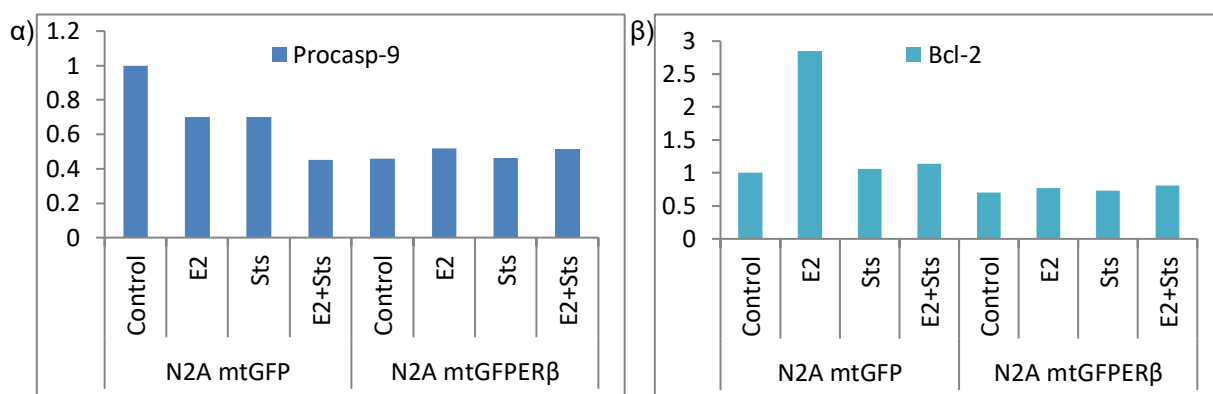
Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 14/Διάγραμμα 2, στη συνθήκη κατά την οποία επώασαμε τα κύτταρα με συνδυασμό E2 και STS, τα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον mtERβ φαίνεται να έχουν αυξημένα τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μορίου Procasp-9 και αντίστοιχα μειωμένα τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων Casp-9 και Casp-3, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες, mtGFP. Επιπρόσθετα, στα κύτταρα N2A mtGFPERβ, μειώνεται η επαγόμενη από την STS αύξηση του μορίου Casp-3, ύστερα από προσθήκη E2.

### 3.3 Αξιολόγηση του ρόλου του mtERβ στην απόπτωση υπό συνθήκες επώασης των κυττάρων N2A mtGFP και mtGFPERβ με 2 $\mu$ M STS για 6 ώρες

Στην Εικόνα 15 απεικονίζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων Procasp-9, Bcl-2, β-actin και α-tubulin, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα. Στο Διάγραμμα 3 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνικών ζωνών, σε διάφορες συνθήκες του πειράματος, μετά την κανονικοποίηση αυτών ως προς τα μόρια αναφοράς, β-actin και α-tubulin.



**Εικόνα 15:** Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων *Procasp-9*, *Bcl-2*,  $\beta$ -actin και  $\alpha$ -tubulin. Τα κύτταρα *mtGFP* και *mtGFPERβ* επώαστηκαν με 2  $\mu$ M STS για 6 ώρες



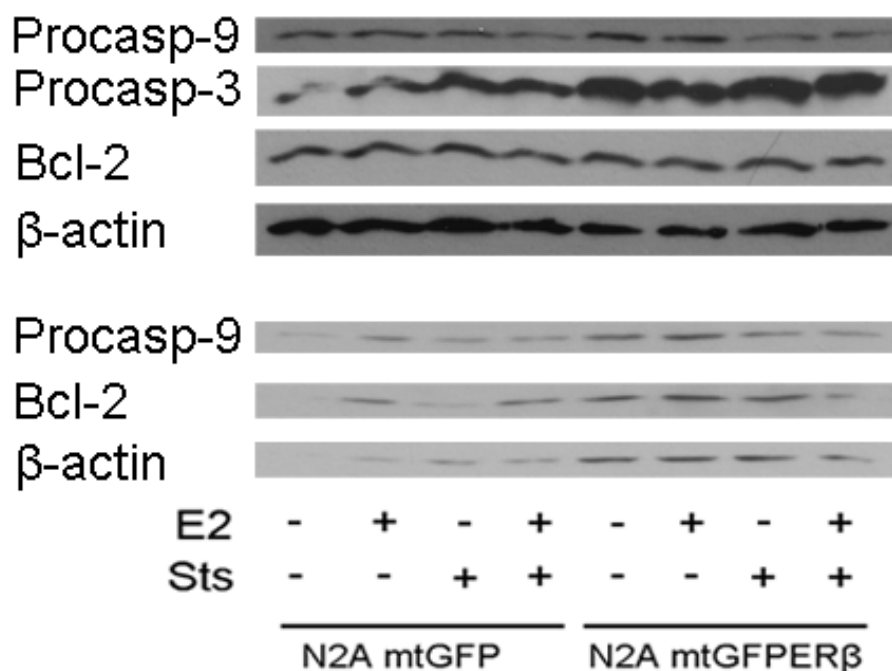
**Διάγραμμα 3:** Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων α) *Procasp-9* και β) *Bcl-2* ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων  $\alpha$ -tubulin και  $\beta$ -actin αντίστοιχα, στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα με χρήση του προγράμματος *ImageJ*

Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 15/Διάγραμμα 3, δε παρατηρείται αισθητή διαφορά στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων *Procasp-9* και *Bcl-2* στα κύτταρα *N2A mtGFPERβ*, καθώς σε όλες τις συνθήκες παρουσιάζονται ίδια επίπεδα έκφρασης. Στο σύνολό τους όμως, τα κύτταρα *N2A mtGFPERβ* φαίνεται να έχουν μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων *Procasp-9* και *Bcl-2* σε σύγκριση με τα *N2A mtGFP*.

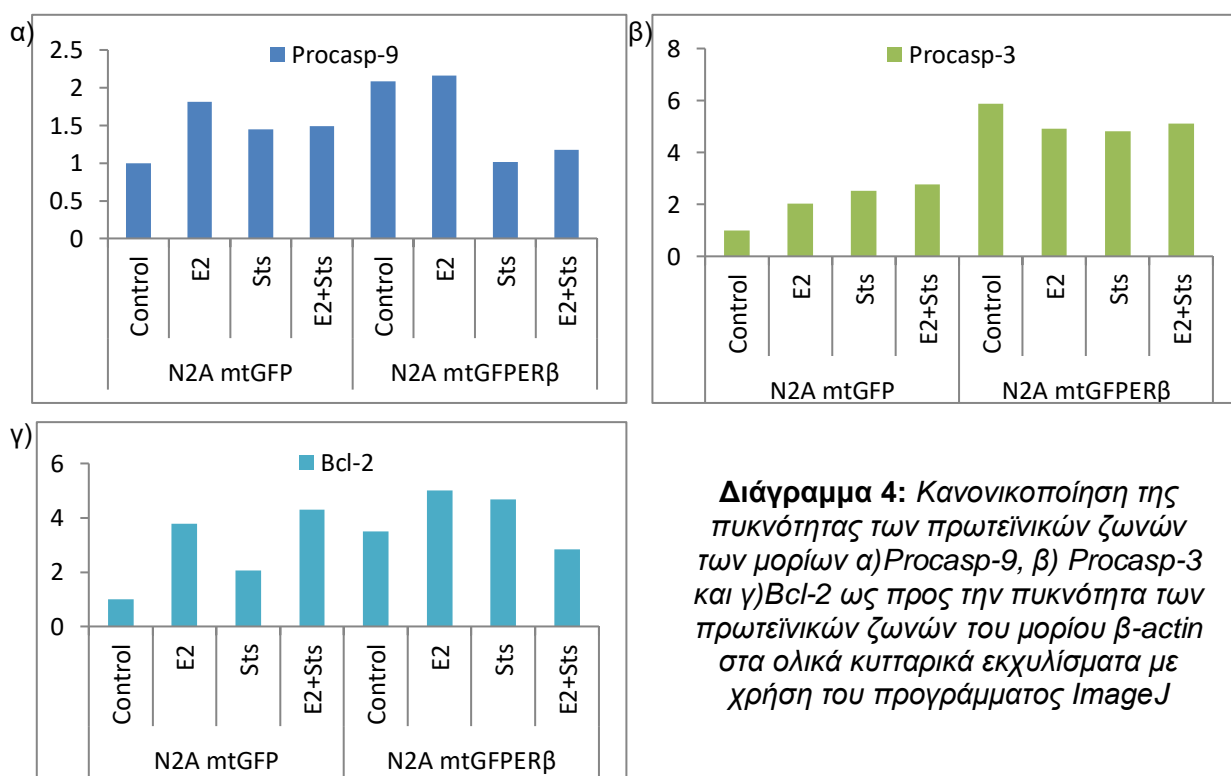
### 3.4 Αξιολόγηση του ρόλου του *mtERβ* στην απόπτωση υπό συνθήκες επώασης των κυττάρων *N2A mtGFP* και *mtGFPERβ* με 1 $\mu$ M STS για 6 ώρες

Στην Εικόνα 16 απεικονίζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων *Procasp-9*, προκασπάση-3 (*Procaspase-3*, *Procasp-3*), *Bcl-2* και  $\beta$ -actin μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα. Στο Διάγραμμα 4 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της

ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνικών ζωνών, σε διάφορες συνθήκες του πειράματος, μετά την κανονικοποίηση αυτών ως προς το μόριο αναφοράς,  $\beta$ -actin.



**Εικόνα 16:** Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων *Procasp-9*, *Procasp-3*, *Bcl-2* και  $\beta$ -actin. Τα κύτταρα *mtGFP* και *mtGFPERβ* επωάστηκαν με 1  $\mu$ M STS για 6 ώρες

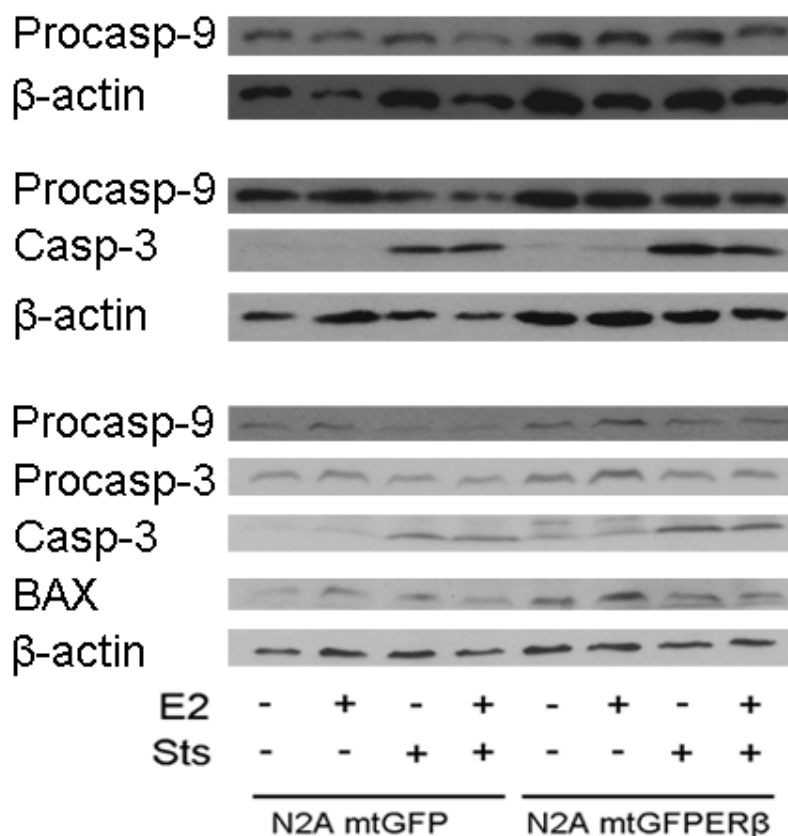


**Διάγραμμα 4:** Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων α) *Procasp-9*, β) *Procasp-3* και γ) *Bcl-2* ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών του μορίου  $\beta$ -actin στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα με χρήση του προγράμματος *ImageJ*

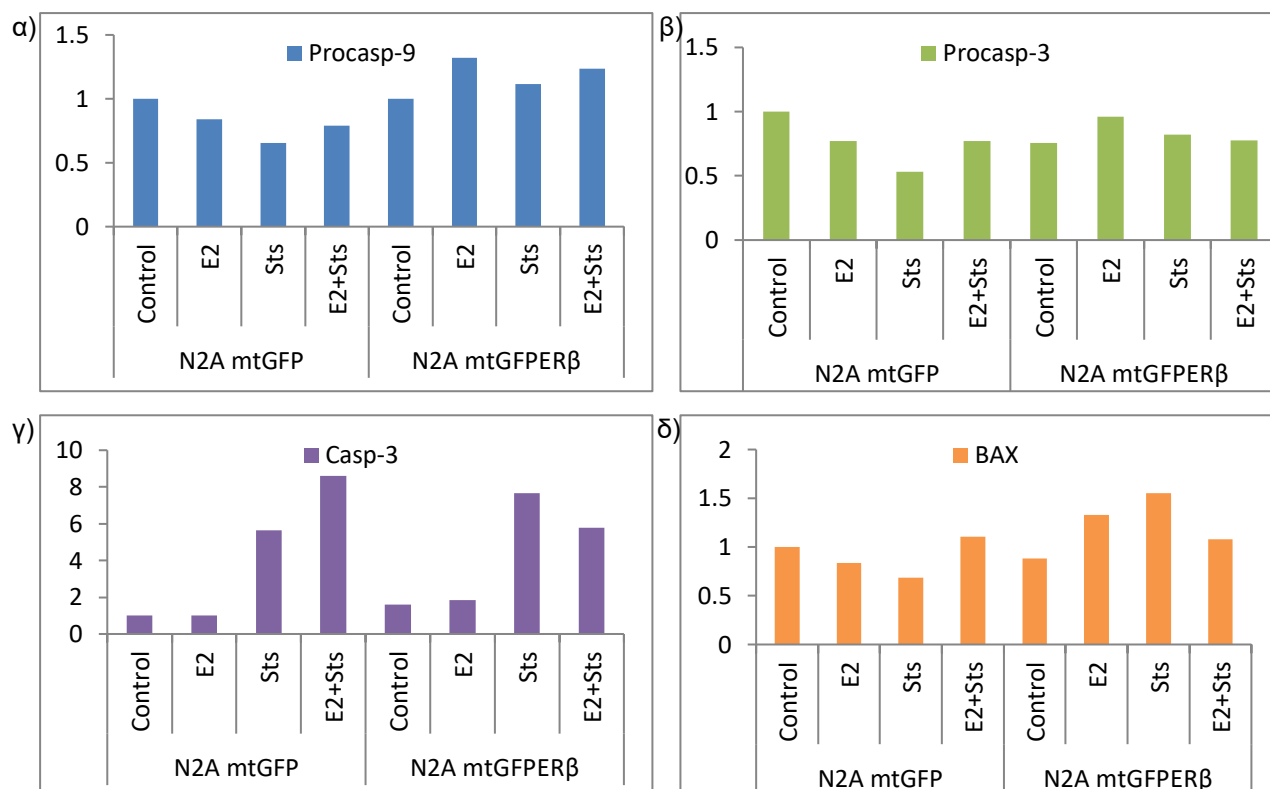
Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 16/Διάγραμμα 4, φαίνεται τα κύτταρα N2A mtGFPERβ να παρουσιάζουν μια τάση προς αύξηση των επαγόμενων από STS μειωμένων πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Procasp-9 και Procasp-3, παρουσία E2. Αντιθέτως, στις αντίστοιχες συνθήκες στα κύτταρα N2A mtGFP, δεν παρατηρούνται αλλαγές στα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης. Επιπλέον, στη συνθήκη κατά την οποία επωάσαμε τα κύτταρα με STS, φαίνεται τα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ERβ να παρουσιάζουν αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του μορίου Bcl-2 σε σχέση με τα N2A mtGFP, ενώ ύστερα από προσθήκη E2, αυξάνεται η επαγόμενη από την STS μείωση των επιπέδων του.

### 3.5 Αξιολόγηση του ρόλου του mtERβ στην απόπτωση υπό συνθήκες επώασης των κυττάρων N2A mtGFP και mtGFPERβ με 0,5 $\mu$ M STS για 12 ώρες

Στην Εικόνα 17 απεικονίζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων Procasp-9, Procasp-3, Casp-3, BAX και  $\beta$ -actin, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα. Στο Διάγραμμα 5 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνικών ζωνών, σε διάφορες συνθήκες του πειράματος, μετά την κανονικοποίηση αυτών ως προς το μόριο αναφοράς,  $\beta$ -actin.



**Εικόνα 17:** Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Procasp-9, Procasp-3, Casp-3, BAX και  $\beta$ -actin. Τα κύτταρα mtGFP και mtGFPERβ επωάστηκαν με 0,5  $\mu$ M STS για 12 ώρες



**Διάγραμμα 5:** Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων α)Procasp-9, β) Procasp-3, γ)Casp-3 και δ)BAX ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών του μορίου β-actin στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα με χρήση του προγράμματος ImageJ

Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 17/Διάγραμμα 5, τα κύτταρα N2A mtGFPERβ, στη συνθήκη κατά την οποία επωάστηκαν με συνδυασμό E2 και STS, φαίνεται να εμφανίζουν μικρές διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων Procasp-9 και Procasp-3 σε σχέση με τη συνθήκη όπου επωάστηκαν μόνο με STS. Είναι αξιοσημείωτο να επισημανθεί ότι στα κύτταρα N2A mtGFPERβ, μειώνεται η επαγόμενη από την STS αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Casp-3 και BAX, ύστερα από προσθήκη E2.



## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα οιστρογόνα παίζουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη και διατήρηση των δευτερογενών φυλετικών χαρακτηριστικών καθώς και της αναπαραγωγικής λειτουργίας κυρίως στις γυναίκες και σε μικρότερο βαθμό στους άνδρες. Επιπλέον, ασκούν μια τεράστια ποικιλία βιολογικών επιδράσεων στο καρδιαγγειακό, μυοσκελετικό, ανοσοποιητικό και κεντρικό νευρικό σύστημα (Gustafsson, 2003). Τα τρία κύρια φυσικά οιστρογόνα είναι η οιστρόνη (E1), η οιστραδιόλη (E2), και η οιστριόλη (E3) και οι κύριοι υποδοχείς για αυτά είναι οι ERα και ERβ, προϊόντα έκφρασης διαφορετικών γονιδίων (Menasce et al., 1993). Οι δύο αυτοί υποδοχείς, ως μεταγραφικοί παράγοντες, εμφανίζουν αντίθετες δράσεις στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων, ιδιαίτερα εκείνων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό (Liu et al., 2002), εύρημα που υποδηλώνει ότι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων ως απόκριση στην E2 είναι το αποτέλεσμα μιας ισορροπίας μεταξύ της σηματοδότησης του ERα και του ERβ. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι ο ERα επάγει την ογκογένεση και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, ενώ ο ERβ φαίνεται να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού, μέσω της καταστολής των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK and PI3K, της καταστολής της δράσης του ERα και της ρύθμισης γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση (Gorgoglietas et al., 2018). Οι ERα και ERβ ενεργοποιούν παράλληλους νευροπροστατευτικούς μηχανισμούς στον εγκέφαλο που καταλήγουν στην επαγωγή της έκφρασης αντι-αποπτωτικών μορίων και νευροπροστατευτικών αυξητικών παραγόντων, ενώ καταστέλλουν την έκφραση προ-αποπτωτικών και προ-φλεγμονωδών μορίων στα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου (Arevalo et al., 2014).

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής ROS, στην ρύθμιση του ανοσοποιητικού, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στη γήρανση. Μελέτες σε HepG2 κύτταρα, που προέρχονται από ανθρώπινο ήπαρ, και σε ανθρώπινα καρκινικά μαστικά κύτταρα MCF-7 έχουν δείξει ότι η χορήγηση της E2 οδηγεί σε μετακίνηση των ERα και ERβ στα μιτοχόνδρια (Psarra & Sekeris, 2008, Chen et al., 2009).

Η σταυροσπορίνη αποτελεί ισχυρό αλλά μη εκλεκτικό αναστολέα κινασών και χρησιμοποιείται ευρέως ως αναστολέας της πρωτεϊνικής κινάσης C. Ανήκει στην κατηγορία των αναστολέων που συναγωνίζονται το ATP και έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί αποπτωτικούς μηχανισμούς (Chae et al., 2000).

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου του mtERβ στην απόπτωση νευρικών κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν δύο σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές που παρασκευάστηκαν από τον υποψήφιο διδάκτορα Ιωάννη Τσιάλτα. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε η κυτταρική σειρά N2A mtGFPERβ, η οποία υπερεκφράζει σταθερά τον ERβ, ως υβριδική πρωτεΐνη με την GFP, με μιτοχονδριακή στόχευση και η κυτταρική σειρά N2A mtGFP, η οποία υπερεκφράζει σταθερά την GFP, επίσης με μιτοχονδριακή στόχευση. Οι κυτταρικές αυτές σειρές επωάστηκαν με STS ώστε να επαχθεί απόπτωση και εφαρμόστηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western, για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων μορίων που ρυθμίζουν αποπτωτικές διεργασίες. Τα κύτταρα

επώαστηκαν με STS σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και διαφορετικούς χρόνους ώστε να επαχθεί απόπτωση, και να διερευνηθεί η πιθανή αντι-αποπτωτική δράση του mtERβ.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ένα δοκιμαστικό πείραμα με διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης των κυττάρων N2A mtGFP με STS, έτσι ώστε να βρεθούν οι πιο κατάλληλες συνθήκες επώασης με STS στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, καθώς χαρακτηρίζεται ως ισχυρός επαγωγέας της απόπτωσης (Belmokhtar et al., 2001). Εξετάσθηκαν μέλη της οικογένειας των κασπασών (Procasp-9, Casp-9, Procasp-3 και Casp-3) και μέλη της οικογένειας BCL-2 (Bcl-2 και BAX), τα οποία κατέχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα που προέκυψαν με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western, η συνθήκη που φαίνεται να έχει τα επιθυμητά σχετικά επίπεδα έκφρασης των παραπάνω μορίων είναι η συνθήκη κατά την οποία τα κύτταρα επώαστηκαν με 2  $\mu$ M STS για 14 ώρες. Θεωρήσαμε ότι με αυτή τη συνθήκη θα μπορέσουμε να παρατηρήσουμε διακριτές διαφορές στην έκφραση των παραπάνω μορίων στις κυτταρικές σειρές mtGFP και mtGFPERβ.

Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western από ολικά εκχυλίσματα κυττάρων N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ, που επώαστηκαν με 2  $\mu$ M STS για 14 ώρες δείχνουν ότι παρουσία E2 μειώνεται η επαγόμενη από STS αύξηση του μορίου Casp-3 στην κυτταρική σειρά N2A mtGFPERβ, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στην κυτταρική σειρά N2A mtGFP. Παρόμοια δράση παρατηρείται και στο μόριο Casp-9 αλλά σε μικρότερα επίπεδα. Οι νευροπροστατευτικές δράσεις της E2 είναι γνωστές και από δεδομένα παγκόσμιας βιβλιογραφίας (Simpkins et al., 2009). Παρατηρήθηκαν πολλά νεκρά κύτταρα, κατά τη συλλογή τους, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στον υψηλό χρόνο (14 ώρες) και στην υψηλή συγκέντρωση (2  $\mu$ M) επώασης των κυττάρων με STS. Λόγω αυτού, θεωρήσαμε ότι θα έχει ενδιαφέρον να ελέγξουμε εάν οι παρατηρήσεις αυτές λαμβάνονται και σε συνθήκες αρχικών σταδίων απόπτωσης.

Ακολούθησε λοιπόν επώαση των κυττάρων με 2  $\mu$ M STS για 6 ώρες και εφαρμόζοντας τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western, δεν παρατηρήσαμε και πάλι κάποιες αισθητές διαφορές, όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που σχετίζονται με την απόπτωση μεταξύ των συνθηκών του πειράματος της ίδιας κυτταρικής σειράς. Παρουσιάζονται όμως διαφορές μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών.

Παραμένοντας στο ίδιο ερώτημα, μειώσαμε τη συγκέντρωση επώασης των κυττάρων με STS στο 1  $\mu$ M και κρατήσαμε σταθερό το χρόνο του προηγούμενου πειράματος, 6 ώρες. Σε αυτές τις συνθήκες διαπιστώνεται μια πιθανή αντι-αποπτωτική δράση του mtERβ παρουσία E2, καθώς παρατηρούμε μια τάση προς αύξηση των επαγόμενων από STS μειωμένων πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων Procasp-9 και Procasp-3. Παρ'όλα αυτά, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του μορίου Bcl-2 δεν συμφωνούν με αυτήν την υπόθεση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι χρειάζεται περισσότερος χρόνος για να εκφραστούν μέλη της οικογένειας BCL-2 που αποτελούν ρυθμιστές της απόπτωσης, σε αντίθεση με την ταχεία ρύθμιση της σηματοδότησης των κασπασών.

Λαμβάνοντας υπόψιν όλες τις παραπάνω παρατηρήσεις, ακολούθησε πείραμα όπου μειώσαμε τη συγκέντρωση της STS στο 0,5  $\mu$ M και αυξήσαμε το χρόνο επώασης στις 12 ώρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων Casp-3 και BAX φαίνεται να μειώνονται

συν-παρουσία E2 και STS σε σχέση τα επίπεδά τους μόνο παρουσία STS, στην κυτταρική σειρά N2A mtGFPERβ. Τίποτα από τα παραπάνω δεν ισχύει για την κυτταρική σειρά N2A mtGFP προσδίδοντας έτσι στον mtERβ αντι-αποπτωτικό ρόλο. Παρόμοιες μελέτες από τους Liang et al. απέδειξαν ότι ο μιτοχονδριακά εντοπισμένος ERβ αλληλεπιδρά με τη προ-αποπτωτική πρωτεΐνη BAD, η οποία καταστέλλει την ενεργοποίηση του BAX και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Liang et al., 2014), επιβεβαιώνοντας έτσι τα ευρήματά μας.

Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν πως ο mtERβ ασκεί πιθανή αντι-αποπτωτική δράση παρουσία του φυσικού του προσδέτη, της E2. Πάραυτα, κρίνεται απαραίτητη η επαναληπτική και εκτενέστερη διερεύνηση του συγκεκριμένου ρόλου του ώστε να αποσαφηνιστεί πλήρως η μιτοχονδριακή δράση του όσον αφορά την απόπτωση.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arevalo, M., Azcoitia, I., & Garcia-segura, L. M. (2014). The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nature Publishing Group*, (November). <https://doi.org/10.1038/nrn3856>
- Bain, D. L., Heneghan, A. F., Connaghan-jones, K. D., & Miura, M. T. (2007). Nuclear Receptor Structure : Implications for Function. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.160308>
- Belmokhtar, Â. A., Hillion, J., & Se, E. (2001). Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms, 3354–3362.
- Bjornstrom L. and Sjoberg M. (2005). Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling : Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes, 19(4), 833–842. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0486>
- Bolger R, Wiese TE, Ervin K, Nestich S, Checovich W. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect* 106: 551–557, 1998.
- Chae, H. J., Kang, J. S., Byun, J. O., Han, K. S., Kim, D. U., Oh, S. M., ... Kim, H. R. (2000). Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacological Research*, 42(4), 373–381. <https://doi.org/10.1006/phrs.2000.0700>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.06.001>
- Cleary, M. P., & Grossmann, M. E. (2015). Minireview : Obesity and Breast Cancer : The Estrogen Connection, 150(June 2009), 2537–2542. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0070>
- Erijman L., Paladinisb, A. A., Lorimem, G. H., & Weber, G. (1993). Plurality of Protein Conformations of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Monomers Probed by High Pressure Electrophoresis\*, 268(34), 25914–25919.
- Flouriort, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, È., Kos, M., Reid, G., ... Gannon, F. (2000). Identifi cation of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha ( hER- a ) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER- a activation function 1, 19(17).
- Glass C.K , Rosenfeld M.G, (2000), The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors *Genes Dev.*, 14 (2000), pp. 121-141
- Gorgogietas, V. A., Tsialtas, I., Sotiriou, N., Laschou, V. C., Leonidas, D. D., Chrousos, G. P., Protopapa E., Psarra A.M.G (2018). HHS Public Access, 7(1), 1–13.
- Gupta, N., & Mayer, D. (2013). Interaction of JAK with steroid receptor function, (December), 1–7.
- Gruber DM, Huber JC. Conjugated estrogens—the natural SERMs. *Gynecol Endocrinol* 13 Suppl 6: 9–12, 1999
- Gupte, A. A., Pownall, H. J., & Hamilton, D. J. (2015). Estrogen : An Emerging Regulator of Insulin Action and Mitochondrial Function, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/916585>
- Gustafsson JA. (2003). What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling, 24(9), 479–485. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00229-3](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00229-3)

- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Treuter, E., ... Stro, A. (2019). Estrogen Receptors : How Do They Signal and What Are Their Targets, 905–931. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2006>.
- Hsieh Y.C., Yu H.P., Suzuki T., Choudhry M.A., Schwacha M.G., Bland K.I., Chaudry I.H., (2006), Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 41 511–521.
- Katzenellenbogen BS. & Katzenellenbogen JA. (2002). Defining the “ S ” in SERMs, (March), 2380–2381.
- Levin, D. E. (2011). Regulation of Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* : The Cell Wall Integrity Signaling Pathway, 189(December), 1145–1175. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128264>
- Liang, J., Xie, Q., Li, P., Zhong, X., & Chen, Y. (2014). Mitochondrial estrogen receptor b inhibits cell apoptosis via interaction with Bad in a ligand-independent manner. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2293-y>
- Liu, M., Albanese, C., Anderson, C. M., Hilty, K., Webb, P., Uht, R. M., ... Kushner, P. J. (2002). Opposing Action of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  on Cyclin D1 Gene Expression \*, 277(27), 24353–24360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201829200>
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Evans, R. M. (1995). The Nuclear Receptor Superfamily : The Second Decade, 83(6), 835–839.
- Marino, M., Galluzzo, P., & Ascenzi, P. (2006). Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription, 497–508.
- Moras D. & Gronemeyer H. (1998) The nuclear receptor ligand-binding domain : structure and function Dino Moras \* and Hinrich Gronemeyer I-IAT, 384–391.
- Ogawa, S., Eng, V., Taylor, J., Lubahn, D. B., Korach, K. S., Pfaff, D. W., & York, N. (1998). Roles of Estrogen Receptor-  $\alpha$  Gene Expression in Reproduction-Related Behaviors in Female Mice \*, 139(12), 5070–5081.
- Olefsky, J. M. (2001). Nuclear Receptor, Minireview Series \*, 36863–36865. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100047200>
- O'Malley BW, Qin J, Lanz RB. Cracking the coregulator codes. *Curr Opin Cell Biol.* 2008; 20:310–15. [PubMed: 18499426]
- Psarra, A. M. G., & Sekeris, C. E. (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. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.10.021>
- Sanchez, C., Brana, A. F., Mendez, C., & Salas, J. A. (2006). Reevaluation of the Violacein Biosynthetic Pathway and its Relationship to Indolocarbazole Biosynthesis, 1231–1240. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600029>
- Simpkins, J. W., Yang, S. H., Sarkar, S. N., & Pearce, V. (2008). Estrogen actions on mitochondria-Physiological and pathological implications. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290(1–2), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.013>
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-bedrač, S., & Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling, 24(3), 329–342.

Yaşar, P., Ayaz, G., Damla, S., Gizem, U., & Mesut, G. (2017). Molecular mechanism of estrogen – estrogen receptor signaling, (May 2016), 4–20.  
<https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, για την εμπιστοσύνη και τη δυνατότητα που μου έδωσε για την εκπόνηση της διπλωματικής αυτής εργασίας, καθώς και για το διαρκές ενδιαφέρον που έδειχνε. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Τσιάλτα Ιωάννη, για τη συνεχή καθοδήγηση, αμέριστη βοήθεια και υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής μου εργασίας. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας της Δρ. Ψαρρά για την άψογη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα. Ευχαριστώ πολύ και τον Καθηγητή Βιοχημείας Λεωνίδα Δημήτριο, καθώς και την Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού Σκαμνάκη Βασιλική, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή. Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την αρμονική συνεργασία που είχαμε. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου για την αμέτρητη στήριξη και κατανόηση που έδειξαν κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.