ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΓΕΩΡΓΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ ΑΧΙΛΛΕΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

«Διερεύνηση του ρόλου των οιστρογόνων στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας»

«Investigating the role of estrogens in the regulation of mitochondrial function»

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο: «Διερεύνηση του ρόλου των οιστρογόνων στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας» εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ.

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΑΜΝΑΚΗ: ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την υπεύθυνη καθηγήτρια της παρούσας διπλωματικής εργασίας δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία, επίκουρη καθηγήτρια του ΤΒΒ για την τιμή που μου έκανε όλα αυτά τα χρόνια να αποτελώ μέλος της ερευνητικής της ομάδας. Ήταν μια ξεχωριστή εμπειρία για μένα η συνεργασία μου μαζί της καθώς οι συμβουλές της, οι γνώσεις που μου μετέφερε και η συνεχής καθοδήγησή της ήταν καθοριστικές. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, τον δρ. Λεωνίδα Δημήτριο, καθηγητή Βιοχημείας του ΤΒΒ, καθώς και την δρ. Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορα Βιοχημείας-Μεταβολισμού του ΤΒΒ για την άψογη συνεργασία, τις γνώσεις που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια στη σχολή και την πολύτιμη βοήθεια τους.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να σταθώ και να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου μας Γιάννη Τσιάλτα, για την καθημερινή του στήριξη, υπομονή και αδιάκοπη βοήθεια του οποιαδήποτε στιγμή κι αν αυτή χρειάστηκε, καθώς η συνεισφορά του είναι μεγαλύτερη απ' οτι μπορεί να φανεί στην εργασία! Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον δρ. Γοργογιέτα Βύρωνα αλλά και στα κορίτσια της ομάδας μας και υποψήφιες διδάκτορες Καρρά Κατερίνα και Καλούση Φωτεινή για την υπέροχη συνύπαρξη και την φοβερή συνεργασία μας. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στον φίλο και υποψήφιο διδάκτορα Κούλα Συμεών για τις ατελείωτες ώρες που περάσαμε μαζί εντός και εκτός εργαστηρίων, για τις επιστημονικές και μη ανησυχίες μας! Φυσικά, δεν θα μπορούσα να παραλείψω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για το άριστο κλίμα που επικράτησε όλο αυτό το διάστημα.

Τελευταίοι στις ευχαριστίες αλλά πρώτοι στην καρδία μου, οι γονείς μου που όλα αυτά τα χρόνια είναι δίπλα μου και μου προσφέρουν απλόχερα ότι έχουν, βοηθώντας να ολοκληρώσω έναν από τους μεγαλύτερους στόχους της ζωής μου, μέχρι τον επόμενο.

Περίληψη

Τα οιστρογόνα ανήκουν στην οικογένεια των στεροειδών ορμονών και κατέχουν εξέχοντα ρόλο στην ανάπτυξη και διατήρηση της φυσιολογικής αναπαραγωγικής λειτουργίας. Επιπλέον, τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες ασκούν μια τεράστια ποικιλία βιολογικών δράσεων στο καρδιαγγειακό, μυοσκελετικό, ανοσοποιητικό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Το πιο δραστικό οιστρογόνο που παράγεται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η 17β-οιστραδιόλη (E2). Η κυτταρική σηματοδότηση των οιστρογόνων διαμεσολαβείται μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων τους, οι οποίοι διακρίνονται σε δύο κύριους υποτύπους: τον υποδοχέα οιστρογόνων α (Estrogen Receptor alpha, ERα) και τον υποδοχέα οιστρογόνων β (Estrogen Receptor beta, ERβ). Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί και μια μεμβρανική G πρωτεΐνη που παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια για την E2 και ονομάζεται GPR30. Οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) εντοπίζονται σε υποκυτταρικά οργανίδια όπως: ο πυρήνας, το κυτταρόπλασμα, οι μεμβράνες και τα μιτοχόνδρια (Heldring et al., 2007). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη δράση των οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια προέκυψε μετά την ανακάλυψη του υποδοχέα οιστρογόνων β (ERβ), ο οποίος μάλιστα φαίνεται να εντοπίζεται σε αυτά είτε παρουσία είτε απουσία προσδέτη. Πιο συγκεκριμένα τα μιτοχόνδρια είναι ζωτικής σημασίας οργανίδια για τον οργανισμό γιατί εμπλέκονται στην παραγωγή ενέργειας του κυττάρου, σε ενδιάμεσα στάδια του μεταβολισμού αλλά και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Ένα ακόμη στοιχείο που υποδηλώνει πόσο σημαντικά είναι για το κύτταρο είναι ότι έχουν το δικό τους γονιδίωμα, το οποίο είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση πρωτεϊνών που εντοπίζονται στο εσωτερικό τους (Liao, Tzeng, Yu, Wang, & Kao, 2015).

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας στόχος μας ήταν η αποσαφήνιση του ρόλου του μιτοχονδριακού υποδοχέα οιστρογόνων β (mtERβ) στη μιτοχονδριακή μεταγραφή αλλά και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι νευροβλαστωματικές κυτταρικές σειρές SH-SY5Y (ανθρώπινα κύτταρα) και Neuro-2a (κύτταρα ποντικού). Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί πως στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του συναδέλφου κ. Γιάννη Τσιάλτα κατασκευάστηκε η κυτταρική σειρά Neuro-2a που υπερεκφράζει την βήτα ισομορφή του υποδοχέα οιστρογόνων (ERβ) με μιτοχονδριακή στόχευση, σε χιμαιρικό αναγνωστικό πλαίσιο με το γονίδιο αναφοράς GFP, που κωδικοποιεί για την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein). Επιπλέον, κατασκευάστηκε και σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά Neuro-2a με τα κύτταρα της να υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη GFP με μιτοχονδριακή στόχευση τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα μάρτυρες (control). Για την επίτευξη των στόχων μας, χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) με εξειδικευμένους εκκινητές για την ανίχνευση επιπέδων mRNA μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων παρουσία και απουσία α-αμανιτίνης, μορίου που αναστέλλει την πυρηνική μεταγραφή. Επιπλέον, με τη μέθοδο της ανασοαποτύπωσης κατά Western (Western Blot Analysis) προσπαθήσαμε να ερμηνεύσουμε τον ρόλο του mtERβ στη διαδικασία της απόπτωσης με τη βοήθεια εξειδικευμένων αντισωμάτων έναντι μορίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι της μιτοχονδριακής απόπτωσης. Για τον έλεγχο αυτό, χρησιμοποιήσαμε τον αποπτωτικό παράγοντα υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

Τα αποτελέσματα μας υποδευκνύουν: Α) Συμμετοχή του mtERβ στη μιτοχονδριακή μεταγραφή ως ένα βαθμό, κυρίως με τη δράση της Ε2 στα κύτταρα SH-SY5Y και N2A mtGFP. Ωστόσο παρατηρήσαμε «συμπτώματα» αρνητικής ανατροφοδότησης στα κύτταρα N2A mtGFPERβ, στα οποία ο ERβ είναι ενεργοποιημένος και μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο ακόμη και απουσία προσδέτη. Β) Αντι-αποπτωτικές δράσεις του mtERβ, ύστερα από κατεργασία των κυττάρων με H_2O_2. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήσαμε αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων προκασπάση 9 και προκασπάση 3 σε κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ERβ σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως ο mtERβ είναι ικανός να ασκήσει αντι-αποπτωτική δράση σε νευρικά κύτταρα.

Λέξεις κλειδιά: υποδοχέας οιστρογόνων β, μιτοχόνδριο, μεταγραφή, απόπτωση

Abstract

Estrogens play key role in development and maintenance of normal reproductive function. In addition, in both men and women they exert a vast range of biological effects in the cardiovascular, musculoskeletal, immune, and central nervous systems. The most potent estrogen produced in the human body is 17β-estradiol (E2). Cellular signaling of estrogens is mediated through two Estrogen Receptors, ERα (Estrogen Receptor alpha) and ERβ (Estrogen Receptor beta), which are localized in various subcellular organelles such as nucleus, cytoplasm, membranes and mitochondria (Heldring et al., 2007). Also, recent studies have identified a membrane G protein receptor (GPR30) with high affinity for E2. Studies have shown that mitochondria are

an important target of estrogen and estrogen receptor-β (ERβ) has been shown to localize to mitochondria in a ligand-dependent or -independent manner. Mitochondria are vital organelles that are involved in cellular energy production, cell metabolism and programmed cell death. Mitochondria also have their own genome encoding a set of proteins which in total are located in them, indicating their importance (Liao, Tzeng, Yu, Wang, & Kao, 2015 ; Heldring et al., 2007).

In this diploma study the aim is to investigate the role of mitochondrial estrogen receptor beta (mtERβ) in mitochondrial transcription and programmed cell death via apoptosis. For this purpose we used two neuroblastoma cell lines, SH-SY5Y (human cell line) and Neuro-2a (mouse cell line). Neuro-2a cell line is stably overexpressing mitochondrial targeted ERβ, in a chimeric reading frame with the reference gene GFP, while control cells, stably overexpressing the mitochondrial targeted GFP. These stable cell lines were manufactured by Mr. Ioannis Tsialtas during his doctoral thesis. To achieve our goals, we used Real Time PCR (qPCR) with specific primers to detect levels of mRNA mitochondrial encoded genes in presence or absence of α-amanitin, which inhibits nuclear transcription. In addition, Western blot analysis has attempted to interpret the role of mtERβ in the process of apoptosis, with specialized antibodies against molecules involved in the pathway of mitochondrial apoptosis. For this study, we used the apoptotic factor hydrogen peroxide (H_2O_2).

Our results indicate: A) Participation of mtERβ in mitochondrial transcription to some point, mainly by the action of E2 on SH-SY5Y and N2A mtGFP cells. However, we observed possible negative feedback in the N2A mtGFPERβ cells, in which ERβ is transfered to the mitochondria even without ligand. B) Anti-apoptotic effects of mtERβ were noticed, after treatment of the cells with H_2O_2. In particular, elevated protein levels of procapsae 9 and procapsa 3 were observed in cells overexpressing ERβ in contrast to N2A mtGFP cells. This leads us to the conclusion that mtERβ is capable of exerting anti-apoptotic action on nerve cells

Key words: Estrogen receptor β, mitochondria, transcription, apoptosis

1. Εισαγωγή

1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (Nuclear Receptors, NRs) αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι μετά την ενεργοποίησή τους από τον κατάλληλο προσδέτη (στεροειδείς ορμόνες και άλλα λιποδιαλυτά μόρια), συμμετέχουν σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών όπως: η ομοιόσταση, η αναπαραγωγή, η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός. Στην ανενεργή τους κατάσταση βρίσκονται ως μονομερή συζευγμένοι με πρωτεΐνες συνοδούς (Chaperones), ενώ μετά την ενεργοποίηση τους συναντώνται ως ομοδιμερή ή έτεροδιμερη και ασκούν τις δράσεις τους στα γονίδια στόχους. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν ταυτοποιηθεί 48 γονίδια που κωδικοποιούν πυρηνικούς υποδοχείς, ενώ στο γονιδίωμα του ποντικού 49. Η ικανότητά τους να συνδέονται με μικρά μόρια, τα οποία μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν, τους καθιστά σημαντικούς φαρμακευτικούς στόχους καθώς πιθανές δυσλειτουργίες τους σχετίζονται με σημαντικές ασθένειες όπως: ο καρκίνος, η οστεοπόρωση, η παχυσαρκία και ο διαβήτης.

Receptor	Abbreviation	Ligand
Androgen receptor	AR	Testosterone
Estrogen receptor	ER	Estrogen
Estrogen-related receptor	ERR	?
Glucocorticoid receptor	GR	Cortisol
Mineralocorticoid receptor	MR	Aldosterone
Progesterone receptor	PR	Progesterone
Retinoic acid receptor	RAR	Retinoic acid
Retinoid orphan receptor	ROR	?
Retinoic acid-related receptor	RXR	Rexinoids
Liver X receptor	LXR	Oxysterols
Peroxisome proliferator-activated receptor γ	PPARγ	Fatty acid metabolites
Thyroid hormone receptor	TR	Thyroid hormone
Vitamin D_3 receptor	VDR	Vitamin D_3

Εικόνα 1: Οι κυριότεροι πυρηνικοί υποδοχείς και οι φυσικοί τους προσδέτες. Υπάρχουν βέβαια και υποδοχείς των οποίων οι προσδέτες δεν έχουν βρεθεί ακόμη και είναι γνωστοί με τον όρο «ορφανοί» (Sever & Glass, 2013).

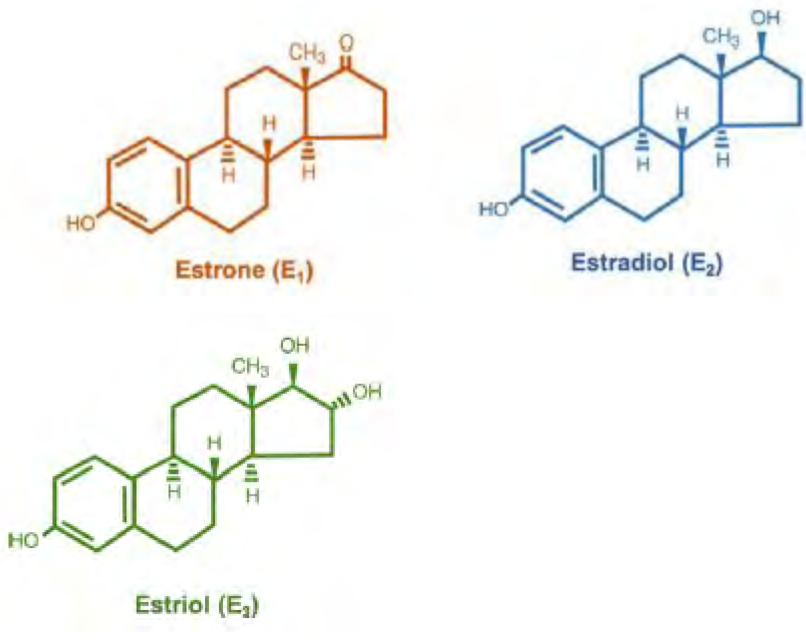
1.2 Στεροειδείς ορμόνες και υποδοχείς στεροειδών ορμονών

Οι στεροειδείς ορμόνες (Steroid Hormones, SHs) είναι μικρά λιπόφιλα μόρια, τα οποία συντίθενται από ένα κοινό πρόδρομο μόριο, τη χοληστερόλη· απελευθερώνονται μόλις παραχθούν και κυκλοφορούν στον οργανισμό μέσω του αίματος. Διακρίνονται στις ορμόνες που παράγονται στον φλοιό των επινεφριδίων, γνωστές ως γλυκοκορτικοειδή (αλδοστερόνη, κορτιζόλη) και στις ορμόνες που παράγονται στους γεννητικούς αδένες (τεστοστερόνη, οιστραδιόλη). Οι τελευταίες διαφοροποιούνται ανάλογα με το φύλο, είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία γαμετικών κυττάρων και την εμφάνιση δευτερογενών χαρακτηριστικών σε άνδρες και γυναίκες. Σπουδαίο ρόλο για τη σύνθεση και τη διαφοροποίηση όλων των στεροειδών ορμονών διαδραματίζουν τα ένζυμα της οικογένειας του κυτοχρώματος P450. Παρά την κοινή μοριακή τους προέλευση αλλά και τις βασικές δομικές ομοιότητες που παρουσιάζουν, διακρίνονται σε ξεχωριστές κατηγορίες. Οι SHs ελέγχουν μια ποικιλία φυσιολογικών και κυτταρικών διεργασιών σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως: η σεξουαλική διαφοροποίηση, η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή, η ανοσοαπόκριση, ο μεταβολισμός και η συμπεριφορά (Gargiulo, 2019). Επειδή εμπλέκονται σε μια πληθώρα σημαντικών διαδικασίων στον ανθρώπινο οργανισμό, δυσλειτουργίες στη φυσιολογική δράση τους έχουν συσχετιστεί με ασθένειες. Οι πιο γνωστές από αυτές είναι: ο διαβήτης, ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη. Κατά κύρια βάση οι SHs ασκούν τις δράσεις τους μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων τους.

Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών (Steroid Hormone Receptors, SHRs) ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs), υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptors, GRs), υποχοδείς ανδρογόνων (Androgen Receptors, ARs), υποδοχείς μεταλλοκορτικοειδών (Mineralocorticoid Peceptors, MRs) και τέλος υποδοχείς προγεστερόνης (Progesterone Receptors PRs). Όπως είναι αναμενόμενο παρουσιάζουν την ίδια δομή με τους πυρηνικούς υποδοχείς και η κατανομή τους στο κύτταρο εντοπίζεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα, στις μεμβράνες, ενώ ορισμένοι έχουν βρεθεί και στα μιτοχόνδρια. Η βασική αρχή της δράση τους είναι παρόμοια με αυτή των πυρηνικών υποδοχέων. Τέλος, χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ότι έχουν τη δυνατότητα πρόκλησης μη γενωμικής δράσης, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους πυρηνικούς υποδοχείς, ενώ ακόμη παρατηρείται προσδετο-επαγώμενη καταστολή της δράσης τους, υποδηλώνοντας έναν μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης (Gupte, Pownall, & Hamilton, 2015).

1.3 Οιστρογόνα

Με τον όρο οιστρογόνα αναφερόμαστε σε μια ομάδα ορμονών, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η οιστραδιόλη, η οιστρόνη και η οιστριόλη. Είναι οργανικές ενώσεις που αποτελούνται από 18 άνθρακες οι οποίοι είναι διατεταγμένοι σε 3 δακτυλίους κυκλοεξανίου και 1 δακτύλιο κυκλοπεντανίου. Αποτελούνται από ένα βενζολικό δακτύλιο, μια φαινολική ομάδα ενώ η οιστρόνη διαθέτει μια κετονική ομάδα, σε αντίθεση με την 17β-οιστραδιόλη που περιέχει μια υδροξυλομάδα και την οιστριόλη που διαθέτει δύο υδροξυλομάδες. Τα οιστρογόνα συντίθενται κυρίως στις ωοθήκες αλλά και στα επινεφρίδια και το λιπώδη ιστό. Παρ' όλο που τα θυληκά άτομα παράγουν όλα τα οιστρογόνα κατά τη διάρκεια της ζωής τους, με την οιστριόλη να υπερισχύει στη διάρκεια της εγκυμοσύνης και την οιστρόνη κατά τη διάρκεια της εμμυνόπαυσης, το πιο γνωστό οιστρογόνο είναι η 17β-οιστραδιόλη (E2) λόγω των φυσικών δράσεων και της αφθονίας της στη διάρκεια των αναπαραγωγικών ετών (Fuentes & Silveyra, 2019). Η E2 εκκρίνεται από τα κύτταρα των ωοθηκών και σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα οιστρογόνα διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στο καρδιαγγειακό, μυοσκελετικό, αναπαραγωγικό, ανοσοποιητικό και κεντρικό νευρικό σύστημα και των 2 φύλων (Liang, Xie, Li, Zhong, & Chen, 2015).



Εικόνα 2: Χημικές δομές των ενδογενών οιστρογόνων (Fuentes & Silveyra, 2019).

1.4 Υποδοχείς οιστρογόνων

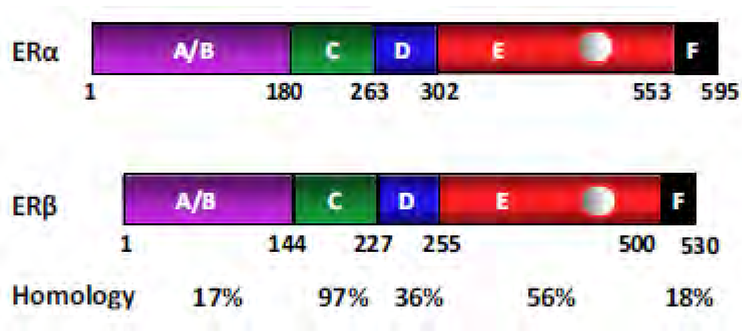
Το 1958 ο Elwood Jensen ανακάλυψε τον πρώτο υποδοχέα οιστρογόνων, ενώ μερικά χρόνια αργότερα απέδειξε πως το σύμπλοκο υποδοχέα-οιστρογόνου μπορεί να μετακινηθεί από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του (Jensen, Desombre, Hurst, Kawashima, & Jungblut, 1967) (Jensen, 1968). Ο συγκεκριμένος υποδοχέας ονομάστηκε υποδοχέας οιστρογόνων α (Estrogen Receptor alpha, ERα) και το γονίδιο του κλωνοποιήθηκε το 1985. Ο δεύτερος υποδοχέας οιστρογόνων, γνωστός σήμερα ως Estrogen Receptor beta (ERβ) περιγράφηκε 10 χρόνια αργότερα από την ερευνητική ομάδα του Δρ. Jan-Ake Gustafsson και κλωνοποιήθηκε από τον προστάτη και την ωοθήκη αρουραίου το 1996 (Kuiper, Enmark, Pelto-Huikko, Nilsson, & Gustafsson, 1996). Πιο πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ένας νέος τύπος πρωτεΐνης ικανής για τη δέσμευση οιστρογόνων. Ο υποδοχέας οιστρογόνων GPER1 ή GPR30, είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη G που έχει την ικανότητα να δεσμεύει με μεγάλη συγγένεια την 17β-οιστραδιόλη και ευθύνεται για την ενεργοποίηση πολυάριθμων ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών οδών. Σε αντίθεση με τους πυρηνικούς υποδοχείς οιστρογόνων ERα και ERβ, οι οποίοι απομονώθηκαν με παραδοσιακές βιοχημικές προσεγγίσεις, ο GPER1 ταυτοποιήθηκε με μεθόδους μοριακής κλωνοποίησης (Almey, Filardo, Milner, & Brake, 2012).

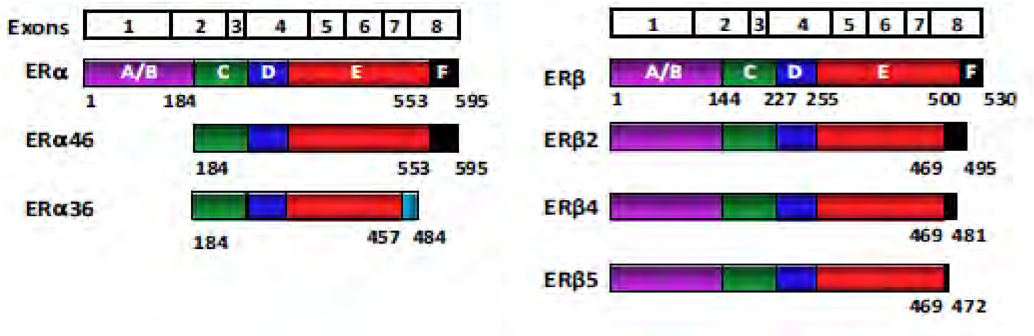
1.4.1 Δομή υποδοχέων οιστρογόνων

Οι υποδοχείς οιστρογόνων όντας μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, είναι μεταγραφικοί παράγοντες που αποτελούνται από 4 βασικές δομικές και λειτουργικές περιοχές οι οποίες μάλιστα εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τους υποδοχείς οιστρογόνων εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Πιο συγκεκριμένα: το ανθρώπινο γονίδιο για τον ERα (ESR1) έχει έκταση ~300 kb και βρίσκεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 6 στην περιοχή q24-q27. Το ESR1 περιλαμβάνει 8 εξόνια που κωδικοποιούν τον ERα, μια πρωτεΐνη 66 kDa που αποτελείται από 595 αμινοξέα. Αντίστοιχα το ανθρώπινο γονίδιο για τον ERβ (ESR2) χαρτογραφείται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 14, στο τμήμα q22-24. Έχει έκταση 254 kb και περιλαμβάνει και αυτό 8 εξόνια που κωδικοποιούν τον ERβ. Ο ERβ είναι μια πρωτεΐνη 530 αμινοξέων με μοριακή μάζα 60 kDa (Yasar, Ayaz, User, Gupur, & Muyan, 2017). Όσον αφορά τη δομική και λειτουργική οργάνωση των υποδοχέων οιστρογόνων, αποτελούνται από:

- Την περιοχή A/B που αντιπροσωπεύει το αμινοτελικό άκρο (NTD) και είναι η λιγότερο συντηρημένη περιοχή μεταξύ των υποδοχέων. Συμμετέχει στην ενεργοποίηση της trans-μεταγραφής καθώς περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης AF-1 η οποία είναι ιδιοσυστατικά ενεργή.
- Την περιοχή C που αντιστοιχεί στο κέντρο σύνδεσης στο DNA (DBD). Οι ειδικές παλίνδρομες αλληλουχίες του DNA των γονιδίων στόχων παρουσιάζουν το γενικό μοτίβο **5′-GGTCAnnnTGACC-3′**, όπου **n**= οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο και είναι γνωστές ως στοιχεία απόκκρισης οιστρογόνων (EREs). Επιπλέον, είναι η πιο καλά συντηρημένη περιοχή σε ποσοστό 97% ενώ συμμετέχει και στο διμερισμό των υποδοχέων. Από κρυσταλλογραφικές μελέτες έχει βρεθεί πως η DBD αποτελείται από 2 δακτυλίους ψευδαργύρου κάθε ένας από τον οποίο φέρει 4 κυστεΐνες, υπεύθυνες για τη σύνδεση των ιόντων Zn^{2+}
- Την περιοχή άρθρωσης D η οποία περιέχεται και το σήμα πυρηνικού εντοπισμού επιτρέποντας το σύμπλοκο υποδοχέα-οιστρογόνου να μετατοπιστεί στον πυρήνα.
- Στο καρβοξυτελικό άκρο, ανήκει η περιοχή E/F. Η E είναι γνωστή και ως περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (LBD). Ακόμη περιέχει περιοχές που συμμετέχουν στη σύνδεση συμπλόκων ενεργοποίησης ή καταστολής της μεταγραφής (AF-2).

Αμφότερα στα γονίδια για τον ERα και τον ERβ, το εξόνιο 1 κωδικοποιεί την περιοχή A / B. Η περιοχή σύνδεσης στο DNA (DBD), κωδικοποιείται από τα εξόνια 2 και 3, ενώ το εξόνιο 4 κωδικοποιεί ένα τμήμα της περιοχής C, όλη την περιοχή D και μέρος της περιοχής E. Η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (LBD) κωδικοποιείται από τα εξόνια 4-8 (Yasar et al., 2017).





Εικόνα 3: Δομική και λειτουργική οργάνωση των υποδοχέων οιστρογόνων (ERs) αλλά και των ισομορφών τους. Επιπλέον απεικονίζονται τα ποσοστά ομολογίας για κάθε επικράτεια μεταξύ των υποδοχέων (Yasar et al., 2017).

1.4.2 Κατανομή των υποδοχέων οιστρογόνων (ERs) στους ιστούς

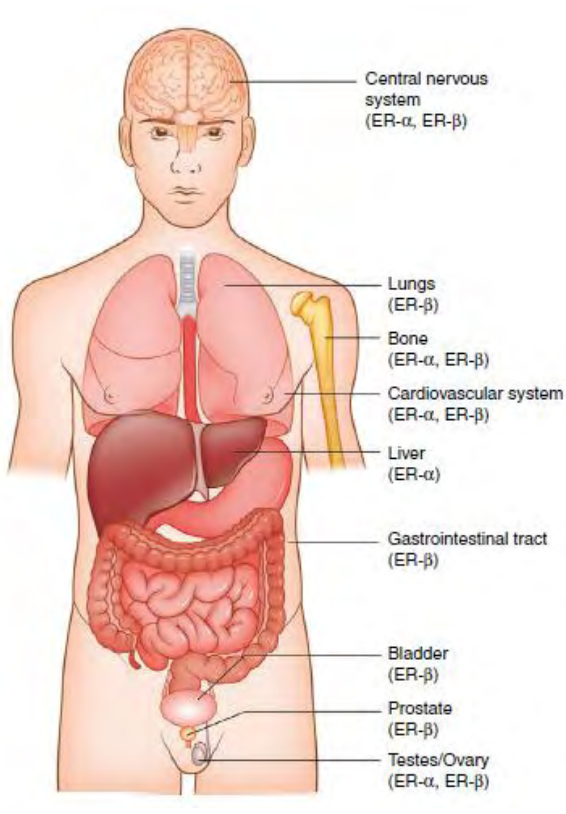
Η σηματοδότηση των οιστρογόνων πραγματοποιείται κυρίως μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων (ERs). O ERα και ERβ είναι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες υπεύθυνοι για βιολογικά συμβάντα που διαρκούν από κάποιες ώρες έως και ημέρες. Ωστόσο, τα οιστρογόνα ασκούν τις δράσεις τους και μέσω του υποδοχέα GPR30, ο οποίος είναι μια μεμβρανική G πρωτεΐνη και ευθύνεται για άμεσες δράσεις και ενεργοποίηση άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών σε μερικά δευτερόλεπτα. Η συνεργασία αυτών των υποδοχέων σε επίπεδο κυττάρου και ιστού, αλλά και η ανταγωνιστική τους δράση πολλές φορές είναι υπεύθυνη για την εύρυθμη λειτουργία του οργανισμού.

Παρ’ όλο που ο ERα και ERβ εμφανίζουν διαφορετικό μοτίβο κατανομής, το οποίο ακόμη δεν είναι ξεκάθαρο, υπάρχουν τύποι κυττάρων όπου έχουμε συνεντοπισμό αυτών των υποδοχέων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το ενδοθήλιο, το επιθήλιο, τα κύτταρα των μυών, των οστών και των νευρώνων. Φυσικά υπάρχουν και ιστοί στους οποίους υπερισχύει ένας εκ των δύο υποτύπων όπως φαίνεται παρακάτω:

- **ERα:** εκφράζεται κατά κύριο λόγο στη μήτρα, στην επιδιδυμίδα, στα οστά, στο στήθος, στο ήπαρ, στους νεφρούς, στο λιπώδη ιστό, στο στρώμα του προστάτη, στα ενδιάμεσα κύτταρα των ωοθηκών και στα κύτταρα Leydig των όρχεων.
- **ERβ:** εκφράζεται κυρίως στο κόλον, στους όρχεις, στο μυελό των οστών, στο αγγειακό ενδοθήλιο, στους πνεύμονες, στην ουροδόχο κύστη, στο επιθήλιο του προστάτη και στα κοκκιώδη κύτταρα των ωοθηκών.

➢ **GPR30:** ανιχνεύεται στο μυελό των επινεφριδίων, στη νεφρική πύελο και στις ωοθήκες.

Στον εγκέφαλο, αμφότεροι ERα και ERβ είναι κατανεμημένοι και εκφράζονται τόσο σε νευρικούς όσο και μη νευρικούς τύπους κυττάρων. Αν και η αλληλεπικαλυπτόμενη έκφραση τους έχει παρατηρηθεί σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου, το μοτίβο κατανομής των υποδοχέων είναι διακριτό όπως επίσης και τα επίπεδα έκφρασης τους. Ο ERα είναι ο πιο άφθονος υποτύπος στον υποθάλαμο και την αμυγδαλή, βασικές περιοχές που εμπλέκονται στο νευροενδοκρινικό σύστημα και βοηθούν στη ρύθμιση του αυτόνομου νευρικού συστήματος και των συναισθηματικών αντιδράσεων. Τα επίπεδα του ERβ είναι υψηλότερα στον ιππόκαμπο, στον ταινιοειδή πυρήνα και στον εγκεφαλικό φλοιό, ενώ είναι χαμηλότερα στον υποθάλαμο. Τέλος και ο GPR30 εκφράζεται σε αρκετές περιοχές του εγκεφάλου όπως: ο ιππόκαμπος, ο φλοιός του υποθαλάμου και η παρεγκεφαλίδα (Cui, Shen, & Li, 2013).



Εικόνα 4: Ιστοειδική κατανομή των υποδοχέων οιστρογόνων (ERs) στο ανθρώπινο σώμα (Warner, Huang, & Gustafsson, 2017).

1.5 Μηχανισμοί δράσης των υποδοχέων οιστρογόνων

Τα οιστρογόνα, ως λιπόφιλα μόρια, μπορούν να εισέλθουν στο κύτταρο και να αλληλεπιδράσουν με τους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς οιστρογόνων ERα και ERβ. Στην περίπτωση αυτή το σύμπλοκο οιστρογόνου-υποδοχέα μεταφέρεται στον πυρήνα και μπορεί είτε να συνδεθεί άμεσα είτε έμμεσα στο DNA. Εναλλακτικά, τα οιστρογόνα μπορούν να ενεργοποιήσουν την ενδοκυτταρική σηματοδότηση μέσω αλληλεπίδρασης με τον GPR30, που ευθύνεται για τις άμεσες αποκρίσεις έναντι των οιστρογόνων (Fuentes & Silveyra, 2019). Παρακάτω ακολουθούν αναλυτικά όλοι οι γνωστοί μηχανισμοί οιστρογονικής σηματοδότησης.

1.5.1 Άμεση γενωμική σηματοδότηση

Η άμεση γενωμική σηματοδότηση είναι γνωστή ως ο κλασικός μηχανισμός δράσης των οιστρογόνων. Σε αυτή τη διαδικασία, οι υποδοχείς οιστρογόνων ERα και ERβ ενεργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες εξαρτώμενοι από τον προσδέτη (Marino, Galluzzo, & Ascenzi, 2006). Μετά τη δέσμευση της οιστραδιόλης (E2) στον ERα ή στον ERβ, λαμβάνει χώρα μια αναδιαμόρφωση στη στεροδιάταξη του υποδοχέα προκαλώντας τον διμερισμό του (Le Dily et al., 2019). Το σύμπλοκο αυτό μετατοπίζεται στη συνέχεια στον πυρήνα, όπου συνδέεται στην χρωματίνη σε ειδικές αλληλουχίες απόκρισης στα οιστρογόνα (EREs), ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής. Πιο συγκεκριμένα οι περιοχές αυτές εντοπίζονται κοντά στον ενισχυτή, μέσα ή κοντά στον υποκινητή και/ ή στο 3’ αμετάφραστο άκρο του γονιδίου στόχου (Klinge, 2001). Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο γονιδίωμα ανθρώπου και ποντικού εντόπισαν πάνω από 70.000 EREs. Τέλος τα στοιχεία απόκρισης οιστρογόνων έχουν την ικανότητα να προκαλούν αλλοστερικές αλλαγές στη δομή του υποδοχέα, με αποτέλεσμα να στρατολογούνται διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες, συμβάλλοντας έτσι στην ποικιλία της οιστρογονικής σηματοδότησης (Hall & Korach, 2002; Yasar et al., 2017).

1.5.2 Έμμεση γενωμική σηματοδότηση

Υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις γονιδίων που δεν περιέχουν EREs στην περιοχή του υποκινητή τους αλλά μπορούν και ελέγχονται από την οιστραδιόλη, χωρίς την άμεση δέσμευση των υποδοχέων οιστρογόνων στο DNA. Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες αναφορές, εκτιμάται ότι ένα ποσοστό 35% των γονιδίων που αποτελούν στόχο των οιστρογόνων έχουν έλλειψη αλληλουχιών τύπου ERE (Vrtacnik, Ostanek, Mencej-Bedrac, & Marc, 2014). Αυτός ο μηχανισμός δράσης είναι γνωστός με τον όρο έμμεση γενωμική σηματοδότηση και βασίζεται στην ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης από τους υποδοχείς οιστρογόνων οι οποίοι όμως δεν συνδέονται άμεσα στο DNA. Το σύμπλοκο οιστρογόνου-υποδοχέα ενεργεί μέσω αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και στοιχεία απόκρισης αυτών στο DNA (Aranda & Pascual, 2001). Με τον παραπάνω τρόπο δράσης οι υποδοχείς οιστρογόνων ρυθμίζουν την ενεργοποίηση ή την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου στόχου. Ένας από τους σημαντικότερους μεσολαβητές της έμμεσης γενωμικής σηματοδότησης είναι η πρωτεΐνη Sp-1. Η δέσμευση αυτού του μεταγραφικού παράγοντα σε περιοχές των υποκινητών των γονιδίων στόχων που είναι πλούσιες σε GC ενισχύεται από την παρουσία των υποδοχέων οιστρογόνων (Bajic et al., 2003; O'Lone et αϊ., 2004). Δυο χαρακτηριστικά παραδείγματα γονιδίων που ελέγχονται από το συγκεκριμένο μηχανισμό του Sp-1 είναι: ο υποδοχέας λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) και ο υποδοχέας προγεστερόνης B (Li et al., 2001; O' Lone et al., 2004). Κάτι παρόμοιο συμβαίνει και με τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1 ο οποίος συμμετέχει σε πολύ σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες όπως: ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική διαφοροποίηση και η απόπτωση. Η δομή του AP-1 αποτελείται από ετεροδιμερές που σχηματίζεται με πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια c-Fos, c-Jun και ATF (Piu et al., 2001). Μερικά παραδείγματα γονιδίων που ελέγχονται από τον AP-1 μέσω του ERα είναι ο αυξητικός παράγοντας-1 της ινσουλίνης (IGF1), η κολλαγενάση και η κυκλίνη D1 (Vrtacnik et al., 2014).

Ένα πολύ ενδιαφέρον χαρακτηριστικό είναι οι αντίθετες δράσεις που παρουσιάζουν ο ERα με τον ERβ όσον αφορά τη σηματοδότηση. Ανάλογα με τον προσδέτη και τα στοιχεία απόκρισης στις περιοχές AP-1, η 17β-οιστραδιόλη (E2) ενεργοποιεί την AP-1-εξαρτώμενη μεταγραφή μέσω του ERα ενώ μέσω του ERβ αναστέλλεται αυτός ο μηχανισμός (Paech et al., 1997). Παρομοίως, η σύνδεση της E2 στον ERα επάγει την μεταγραφή όταν συνδέεται με Sp-1 περιοχές πλούσιες σε GC στον υποκινητή των γονιδίων στόχων αλλά όχι όταν δεσμεύεται με τον ERβ. Η ρύθμιση της κυκλίνης D1 εξαρτάται από αυτή την ανταγωνιστική δράση των ERα και ERβ (Marino et al., 2006). Η ποικιλομορφία στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας σε διαφορετικά κύτταρα από τους δύο υποδοχείς οιστρογόνων, αλλά ταυτόχρονα και οι αλληλεπιδράσεις τους με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μπορούν να εξηγήσουν την ιστοειδική δράση των οιστρογόνων.

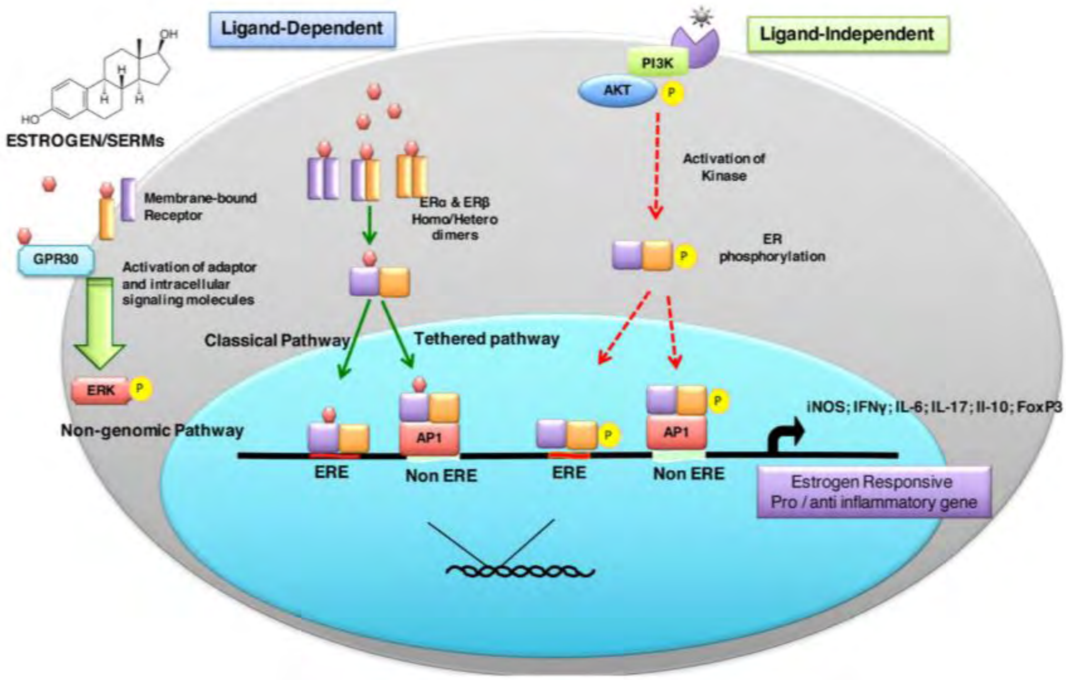
1.5.3 Μη γενωμική σηματοδότηση

Είναι γνωστό πως οι αποκρίσεις από τα οιστρογόνα δεν ακολουθούν πάντα την κλασσική γενωμική δράση. Η εκδήλωση υπερβολικά γρήγορων βιολογικών διεργασιών οδήγησαν στην ανάπτυξη της υπόθεσης πως τα οιστρογόνα θα μπορούσαν να δρούν μέσω μηχανισμών που δεν απαιτούν την άμεση γονιδιακή μεταγραφή. Με την ανακάλυψη του υποδοχέα GPR30 η υπόθεση αυτή απέκτησε ακόμη μεγαλύτερη βάση. Οι μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων συχνά περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση μηχανισμών μεταγωγής σήματος με την παραγωγή ενδοκυτταρικών δεύτερων αγγελιοφόρων, όπως το cAMP και την ενεργοποίηση καταρρακτών πρωτεϊνικών κινασών. Τα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια έχουν ως αποτέλεσμα έμμεσες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση (Prossnitz & Barton, 2011). Οι καταρράκτες των πρωτεϊνινών κινασών μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες:

- την φωσφολιπάση C (PLC) /πρωτεϊνική κινάση C (PKCs)
- τον καταρράκτη Ras / Raf / MAPK
- την κινάση φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης 3 (PI3K) / καταρράκτη κινάσης Akt
- την οδό σηματοδότησης cAMP / πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA)

Επακόλουθη φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων από τις πρωτεϊνικές κινάσες που αναφέρθηκαν παραπάνω, μπορούν να αλλάξουν τη λειτουργία και την ικανότητα δέσμευσης τους σε γενωμικές αλληλουχίες και να επηρεάσουν την γονιδιακή έκφραση. Μερικά παραδείγματα μεταγραφικών παραγόντων που επηρεάζονται από αυτούς τους μηχανισμούς σηματοδότησης είναι οι: Erk-1, CREB, STAT και το σύμπλοκο NF-κB (Cavalcanti, Lucas, Lazari, & Porto, 2015).

Ένα άλλο ενδιαφέρον γεγονός είναι ότι και οι 2 υποδοχείς οιστρογόνων ERα και ERβ, είναι στόχοι για φωσφορυλίωση από πρωτεϊνικές κινάσες συμπεριλαμβανομένων των MAPKs. Αυτό, υποδεικνύει ότι οι μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων ίσως ενέχουν στοιχεία για την αυτο-ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχέων τους (ERs). Τόσο ο συνδεδεμένος με τη πλασματική μεμβράνη υποδοχέας οιστρογόνων GPR30, όσο και μερικές ισομορφές των ERα και ERβ έχουν συσχετισθεί με τη μη γενωμική σηματοδότηση (Almey et al., 2012).



Εικόνα 5: Μηχανισμοί οιστρογονικής σηματοδότησης. Διακρίνονται: αριστερά στην εικόνα η μη γενωμική σηματοδότηση που πραγματοποιείται μέσω του μεμβρανικού υποδοχέα GPR30. Ακολουθεί η άμεση και έμμεση γενωμική σηματοδότηση, όπου ο προσδέτης (E2) συνδέεται στους ERs. Το σύμπλοκο μεταφέρεται στον πυρήνα και συνδέεται είτε σε ειδικές αλληλουχίες EREs είτε σε στοιχεία απόκρισης άλλων μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. AP-1). Τέλος, στα δεξιά της εικόνας παρατηρούμε την ανεξάρτηρη από τον προσδέτη οιστρογονική σηματοδότηση (Khan & Ansar Ahmed, 2015).

1.6 Υποδοχέας οιστρογόνων βήτα (ERβ) και καρκίνος

Ο υποδοχέας οιστρογόνων βήτα (ERβ) όπως συζητήθηκε και παραπάνω φαίνεται να είναι ευρέως κατανεμημένος στον ανθρώπινο οργανισμό. Η αλήθεια είναι πως από την ανακάλυψή του και μετά έχει αυξηθεί κατακόρυφα το ενδιαφέρον για την δράση του καθώς η ύπαρξή του υποδεικνύει ότι η οιστρογονική σηματοδότηση εμπλέκεται σε περισσότερα σηματοδοτικά μονοπάτια και κατ’ επέκταση σε περισσότερες φυσιολογικές διεργασίες. Μέχρι σήμερα φαίνεται να εμπλέκεται σε πολλές παθολογικές και μη καταστάσεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν περιπτώσεις όπου ο ERβ φαίνεται να έχει προστατευτική δράση. Παρακάτω ακολουθούν μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα που ενισχύουν την τωρινή επικρατέστερη υπόθεση.

- ***Καρκίνος του μαστού***: Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο απειλητική νεοπλασματική ασθένεια στις γυναίκες αντιπροσωπεύοντας το 25% όλων των μορφών καρκίνου στις γυναίκες παγκοσμίως (διαγιγνώσκονται περίπου 1,7 εκατομμύρια ετησίως), Το 70% των καρκίνων του μαστού είναι θετικοί ως προς την έκφραση του ERα. Μάλιστα ο συγκεκριμένος υποδοχέας φαίνεται να προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αρά και κατ’ επέκταση τον καρκίνο. Κάτι αντίθετο παρατηρείται από τον ERβ, του οποίου η έκφραση όταν επάγεται στην κυτταρική σειρά MCF-7 (ERα positive) προκαλεί μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ως απόκριση στην οιστραδιόλη (Omoto et al., 2015). Επιπλέον, έχει βρεθεί πως στις περιπτώσεις καρκίνου του μαστού το γονίδιο του ERβ είναι μεθυλιωμένο. Το γεγονός αυτό σημαίνει πως καταστέλλεται η έκφραση του, με μηχανισμό παρόμοιο με αυτόν που συμβαίνει και στα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες που φαίνεται ο ERβ να έχει τα ίδια επίπεδα έκφρασης με τον ERα. Επομένως γίνεται αντιληπτό πως απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος του (Zhao, Dahlman-Wright, & Gustafsson, 2008).

- ***Καρκίνος του προστάτη*:** Καθώς ο προστάτης αποτελεί έναν ιστό που συναντάνται στους άνδρες, ο υποδοχέας ανδρογόνων (AR) θεωρείται ως κύριος υποδοχέας για την ανάπτυξή του. Ωστόσο, τα οιστρογόνα διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο και σε αυτή την περίπτωση καθώς έχει σημειωθεί πως χορήγηση της E2 καταστέλλει τα επίπεδα της τεστοστερόνης σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (PCa), μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης. Όσον αφορά τον ERβ, είναι ο κύριος υποδοχέας που εκφράζεται στο φυσιολογικό ιστό αλλά σε περιπτώσεις καρκίνου δεν συναντάται σχεδόν καθόλου. Έτσι λοιπόν σε καρκινικά μοντέλα η υπερέκφραση του ERβ φάνηκε να μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Omoto & Iwase, 2015). Τέλος, ποντίκια τα οποία ήταν knock out ως προς τον ERβ εμφάνισαν σημάδια υπερπλασίας του προστάτη σε διάστημα 5 μόνο μηνών (Zhao, Dahlman-Wright, & Gustafsson, 2008).

- ***Καρκίνος του παχέος εντέρου*:** Ο ERβ είναι ο κύριος υποδοχέας που εκφράζεται στο παχύ έντερο, υποδεικνύοντας πως η οιστρογονική σηματοδότηση πραγματοποιείται κυρίως μέσω αυτού. Ακόμη, φαίνεται να συνδέεται με αντιφλεγμονώδεις αντιδράσεις στο συγκεκριμένο ιστό. Σε περιπτώσεις καρκίνου, ο ERβ δρα ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας καθώς σε $ER\beta^{-/-}$ ποντικούς παρατηρήθηκε νεοπλασία. Επιπροσθέτως, σε μελέτες όπου υπήρξε καταστολή της οιστρογονικής σηματοδότησης μέσω σίγησης του ERβ, υπήρξε ραγδαία αύξηση του καρκίνου (Saleiro et al., 2012). Αντίθετα, κάτι τέτοιο δεν προέκυψε από την σίγηση του ERα. Κλείνοντας, ο ERβ χρησιμοποιείται ως ένας μοριακός δείκτης για την πρόγνωση έναντι του καρκίνου του παχέος εντέρου, καθώς μειωμένη έκφρασή του έως και απουσία του σχετίζεται με όγκους μεγάλης κλίμακας (Konstantinopoulos et al., 2003; Rudolph et al., 2012).

1.7 Υποδοχέας οιστρογόνων β (ERβ) και νευροπροστασία

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) βρίσκονται στον εγκέφαλο και είναι ευεργετικοί με πολλούς τρόπους. Έχει αποδειχθεί πως τα οιστρογόνα βοηθούν στην ανάπτυξη νευρώνων και δενδριτικών αξόνων, ιδιαίτερα στην περιοχή του υποθαλάμου. Η δράση αυτή επάγεται από τον νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF), τον παράγοντα TGF-β στον υποθάλαμο, τους υποδοχείς του NGF στους αισθητήριους νευρώνες και εν τέλει τον ινσουλινόμορφο αυξητικό παράγοντα (IGF) και τον υποδοχέα του στον υποθάλαμο (Heldring et al., 2007). Ωστόσο, η δράση των οιστρογόνων δεν φαινεται να σχετίζεται μόνο με τη διαδικασία ανάπτυξης των νευρώνων, αλλά και με τη νευροπροστασία. Πιο συγκεκριμένα: στον παρακοιλιακό πυρήνα (PVN), ο ERβ προστατεύει από την υπέρταση που προκαλείται από την αλδοστερόνη / άλας σε θηλυκούς αρουραίους, παρεμποδίζοντας τις επαγόμενες, από υποδοχείς αλατοκορτικοειδών, αυξήσεις σε ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) Ένα ακόμη πλεονέκτημα που παρουσιάζει ο ERβ στο νευρικό σύστημα είναι η επίδραση του στη φλεγμονή των νεύρων. Η νευροφλεγμονή είναι η βασική αιτία πρόκλησης: σκλήρυνσης κατά πλάκας, νόσου Parkinson, Alzheimer, διπολικής διαταραχής και αυτισμού . Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς βλάβης στους υγιείς νευρώνες είναι η έντονη δραστηριότητα που παρουσιάζουν τα μικρογλοία. Το μικρογλοιακά κύτταρα είναι εξειδικευμένα ανοσοκύτταρα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ) που εντοπίζουν και εξουδετερώνουν νοσούντα κύτταρα και ξένους εισβολείς, εκκρίνοντας ισχυρές κυτοκίνες. Σε αυτή τη διαδικασία, τα γειτονικά υγιή κύτταρα μπορεί να υποστούν βλάβη. Μόνο ο ERβ εκφράζεται στα μικρογλοία και οι επιλεκτικοί ERβ προσδέτες μπορούν να αποτρέψουν την μικρογλοιακή ενεργοποίηση και την έκκριση κυτοκινών. Η αντιφλεγμονώδης δράση του ERβ δεν περιορίζεται στα μικρογλοία, καθώς εκφράζεται και στα Τ-λεμφοκύτταρα. Τέλος, μια δράση που κέντρισε και το δικό μας ενδιαφέρον είναι πως τα οιστρογόνα φαίνεται να μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και / ή Bcl-xL στο ΚΝΣ. Επιπλέον, τα οιστρογόνα μπορούν να μειώσουν την έκφραση του προ-αποπτωτικού Bad ή Nip-2, που είναι αρνητικός ρυθμιστής του Bcl-2, ένα μόριο το οποίο μελετήσαμε και εμείς κάτω από συνθήκες αποπτωτικών παραγόντων (H_2O_2) (Chen, Cammarata, Baines, & Yager, 2009; Heldring et al., 2007).

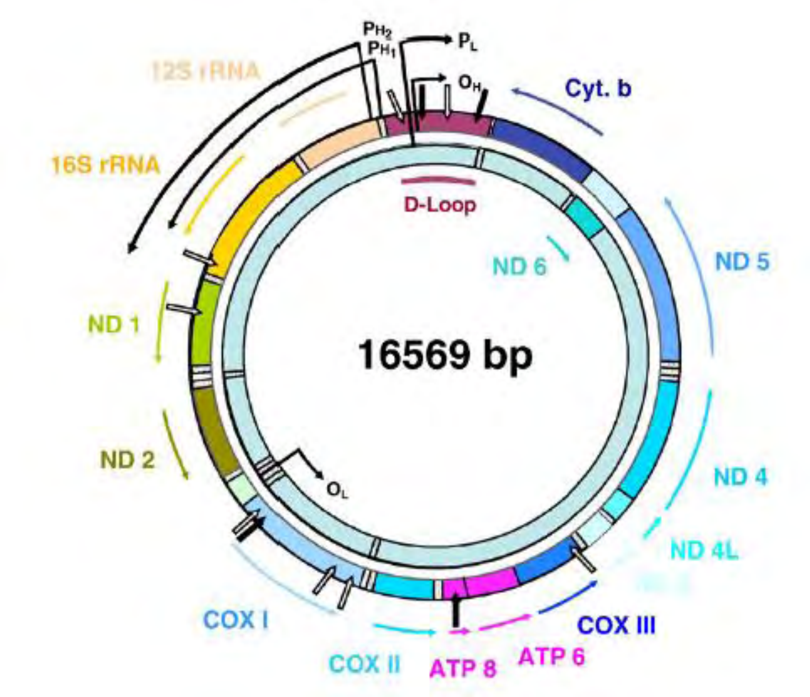
1.8 Μιτοχόνδρια και οιστρογόνα

Σύμφωνα με πολλές μελέτες που διεξάγονται τα τελευταία χρόνια για την επίδραση των οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια, φαίνεται πως η E2 συμμετέχει στην αύξηση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) και στην αναστολή της απόπτωσης μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων (ERs). Μάλιστα, ο ERβ εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια παρουσία ή απουσία προσδέτη και μπορεί να επηρεάσει τη μιτοχονδριακή βιογένεση και την αντι-αποπτωτική σηματοδότηση. Ωστόσο, ο λειτουργικός ρόλος του μιτοχονδριακού ERβ στην ογκογένεση παραμένει ασαφής (Liao et al., 2015) Η μιτοχονδριακή κατανομή του ERβ έχει ταυτοποιηθεί σε αρκετούς τύπους κυττάρων όπως: της μήτρας, των ωοθηκών, των καρδιομυοκυττάρων αλλά και στις κυτταρικές σειρές MCF-7, HepG2, SaOS-2 και SH-SY5Y (Psarra & Sekeris, 2008). Την τελευταία κυτταρική σειρά χρησιμοποιήσαμε και εμείς στην παρούσα διπλωματική εργασία.

1.9 Μιτοχονδριακή δομή και λειτουργίες

Το μιτοχόνδριο είναι ένα εξαιρετικά εξειδικευμένο οργανίδιο, που υπάρχει σχεδόν σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και κυρίως είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της ενέργειας του κυττάρου μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Επιπρόσθετα, τα μιτοχόνδρια είναι κύριοι πρωταγωνιστές στην σηματοδότηση του ασβεστίου, στη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού, στη σύνθεση της αίμης και στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Για να επιτελεστούν σωστά οι παραπάνω διαδικασίες απαιτείται η εύρυθμη συνεργασία μεταξύ δυο γονιδιωμάτων: του μιτοχονδριακού (mtDNA) και του πυρηνικού (nDNA) (Chinnery & Hudson, 2013). Το μιτοχονδριακό (mtDNA) των θηλαστικών είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο που αποτελείται περίπου από 16 kb (16.569 βάσεις στον άνθρωπο). Χαρακτηριστικό γνώρισμα των 2 κλώνων του είναι ότι έχουν ασύμμετρη κατανομή πουρινών και πυριμιδινών δημιουργώντας 2 «αλυσίδες», τη βαριά (Heavy, H) και την ελαφριά (Light, L). Ο προμότορας (PL) είναι αυτός από τον οποίο μεταγράφεται η ελαφριά αλυσίδα, ενώ αντίστοιχα ο κλώνος H μεταγράφεται από δύο γειτονικούς υποκινητές

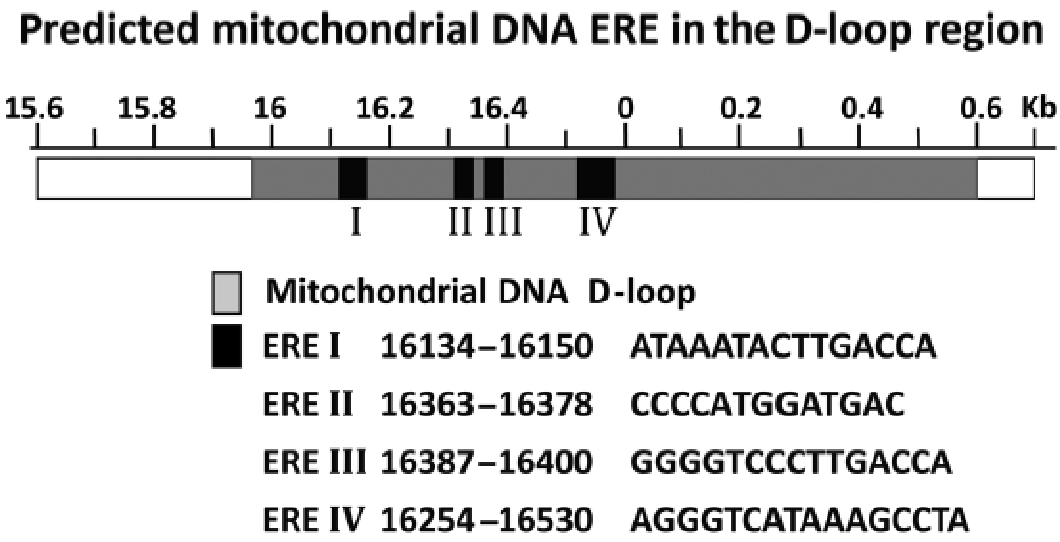
(PH1 και PH2). Το mtDNA περιέχει μόνο μία ρυθμιστική μη κωδική περιοχή, γνωστή ως βρόχος D (D-loop) που υποδηλώνει ότι η μεταγραφή ρυθμίζεται κυριώς από αυτή. Από τους PH2 και PL παράγονται μακρά, πολυκιστρονικά προϊόντα, απελευθερώνοντας ώριμα mRNAs και tRNAs. Από την άλλη μεριά η μεταγραφή από τον PH1 παράγει ένα σύντομο μόριο που περιέχει τα δύο rRNAs. Στο MtDNA υπάρχουν 37 γονίδια, 28 από αυτά εντοπίζονται στον H-κλώνο και 9 στον L-κλώνο. Δεκατρία από τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για βασικές υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας (MRC). Τέλος, από τα εναπομείνατα γονίδια τα 22 κωδικοποιούν μιτοχονδριακά μόρια tRNA, ένα rRNA 16S (μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα) και ένα rRNA 12S (μικρή ριβοσωμική υπομονάδα). Ιδιαίτερα σημαντικό γνώρισμα των μιτοχονδρίων είναι ότι μπορούν να φέρουν πολλαπλά αντίγραφα του γενετικού τους υλικού, ενώ ανάλογα με τις ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου ο αριθμός τους ποικίλει (Psarra & Sekeris, 2008). Τα μιτοχόνδρια εμφανίζουν μια σχετική αυτονομία καθώς φέρουν το δικό τους γενετικό υλικό και μπορούν να αντιγράφονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο. Η μεταγραφή του mtDNA είναι «προκαρυωτική» και παλιότερα θεωρούνταν πως περιλαμβάνει ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που περιέχει τη μιτοχονδριακη πολυμεράση του RNA (POLRMT) και δύο μεταγραφικούς παράγοντες TFB1M και TFB2M. Αργότερα όμως βρέθηκε πως η μεταγραφή του RNA ρυθμίζεται από το μιτοχονδριακό παράγοντα μεταγραφής Α (TFAM). Βέβαια στο σημείο αυτό να τονίσουμε πως όλοι οι μεταγραφικοί παράγοντες που δρουν στο μιτοχονδριακό περιβάλλον κωδικοποιούνται από τον πυρήνα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι είναι απαραίτητη η συνεργασία πυρήνα-μιτοχονδρίου για την εύρυθμη λειτουργία του τελευταίου.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του mtDNA. Διακρίνονται οι 2 κλώνοι και τα γονίδια που κάθε ένας από αυτούς κωδικοποιεί. Πολλές από τις πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου, που του είναι απαραίτητες, παράγονται από το γονιδίωμα του, ωστόσο η εύρυθμη συνεργασία του με τον πυρήνα είναι απαραίτητη (Psarra & Sekeris, 2008).

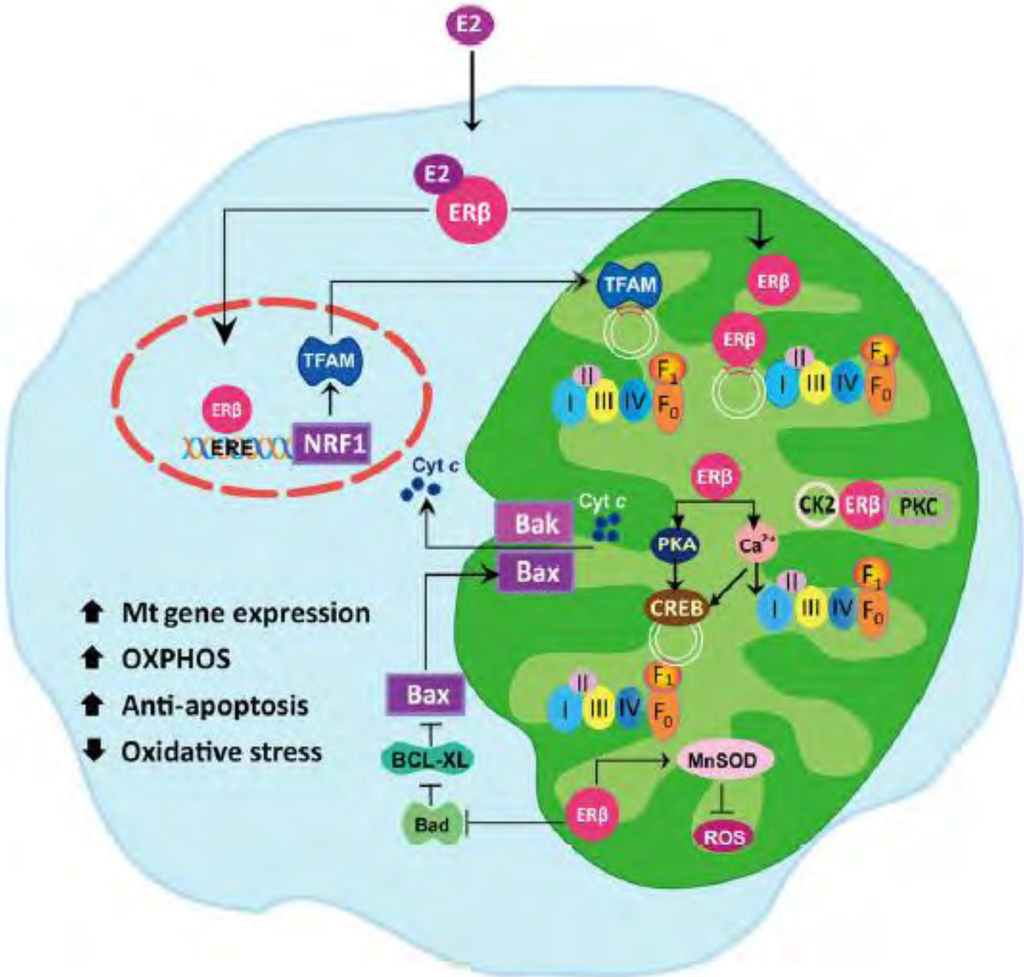
1.10 Μιτοχονδριακές δράσεις του υποδοχέα οιστρογόνων β (ERβ)

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο mtERβ μπορεί να αυξήσει την μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενη μεταγραφή των υπομονάδων I, III και IV της κυτοχρωμικής οξειδάσης, μέσω σύνδεσης στα στοιχεία απόκρισης των οιστρογόνων (EREs) στην περιοχή της D-loop του mtDNA. Ακόμα, ο mtERβ μπορεί να ασκήσει τις μιτοχονδριακές του δράσεις μέσω σύνδεσης σε στοιχεία απόκρισης για τον μεταγραφικό παράγοντα CREB (CREs). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ mtERβ και mtDNA υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα μπορούν να ρυθμίσουν είτε άμεσα είτε έμμεσα την μιτοχονδριακή μεταγραφή (Psarra & Sekeris, 2008 ; Liao et al., 2015)



Εικόνα 7: Οι προβλεπόμενες αλληλουχίες που μοιάζουν με στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (EREs) στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Υπάρχουν τέσσερες προβλεπόμενες αλληλουχίες που όλες βρίσκονται στη ρυθμιστική περιοχή της D-loop (Psarra & Sekeris, 2008 ; Liao et al., 2015).

Ο mtERβ φαίνεται επίσης να συμμετέχει και στην αντι-αποπτωτική σηματοδότηση. Αυτό πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bad, με αποτέλεσμα την καταστολή της Bax και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C σε έναν εξαρτώμενο από τον προσδέτη ή ανεξάρτητο τρόπο (Liang et al., 2015). Επιπλέον, έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά με πυρηνικούς στόχους, συμπεριλαμβανομένου του πυρηνικού αναπνευστικού παράγοντα-1 (NRF-1) και του μιτοχονδριακού παράγοντα μεταγραφής Α (TFAM) (Klinge, 2008).



Εικόνα 8: Ο πιθανός ρόλος του mtERβ στο μιτοχονδριακό περιβάλλον. Η ρύθμιση της OXPHOS πραγματοποιείται άμεσα μέσω σύνδεσης σε μιτοχονδριακά EREs, έμμεσα από την ενεργοποίηση του NRF1 ή τη φωσφορυλίωση του CREB. Τα αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα του mtERβ μεσολαβούνται από την αναστολή της Bad. Ακόμα, η αλληλεπίδραση του με τη μιτοχονδριακή καζεϊνική κινάση-2 (CK2) και φωσφοκινάση C (PKC) συνεισφέρουν στη μιτοχονδριακή βιογένεση. Τέλος, αυξάνει τη δράση της (MnSOD) μειώνοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) (Psarra & Sekeris, 2008 ; Liao et al., 2015).

1.11 Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας

Σύμφωνα λοιπόν με την πρόσφατη βιβλιογραφία και τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στον ERβ, φαίνεται να συμμετέχει σε διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο μιτοχονδριακό περιβάλλον. Αυτές οι δράσεις του, κέντρισαν το δικό μας ενδιαφέρον και έτσι στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας στόχος μας ήταν να διερευνηθεί:

A. η συμμετοχή του μιτοχονδριακού υποδοχέα οιστρογόνων β (mtERβ) στη μιτοχονδριακή μεταγραφή.
B. ο ρόλος του στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι νευροβλαστωματικές κυτταρικές σειρές SH-SY5Y (ανθρώπινα κύτταρα) και Neuro-2a (κύτταρα ποντικού). Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί πως στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του συναδέλφου κ. Γιάννη Τσιάλτα κατασκευάστηκε η κυτταρική σειρά Neuro-2a που υπερεκφράζει την βήτα ισομορφή του υποδοχέα οιστρογόνων (ERβ) με μιτοχονδριακή στόχευση, σε χιμαιρικό αναγνωστικό πλαίσιο με το γονίδιο αναφοράς GFP, που κωδικοποιεί για την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (*N2A mtGFPERβ*). Επιπλέον, κατασκευάστηκε και σταθερά διαμολυσμένη κυτταρική σειρά Neuro-2a με τα κύτταρα της να υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη GFP με μιτοχονδριακή στόχευση τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα μάρτυρες (*N2A mtGFP*). Για την επίτευξη των στόχων μας, χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) σε μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενα γονίδια, παρουσία και απουσία αναστολέων πυρηνικής μεταγραφής και της ανασοαποτύπωσης κατά Western (Western Blot Analysis) για τον έλεγχο της δράσης αποπτωτικών παραγόντων όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Οργανολογία

- Φωτόμετρο (Spectronic® 20 GENESYSTM)
- Φυγόκεντρος (Entrofriger- BLII/ PSSelecta®)
- Φυγόκεντρος (Helme Z36HK)
- Αυτόματος πιπεταδόρος (HTC Lab solution)
- Μηχάνημα Real Time PCR (Stratagene Mx 3005p).
- Μηχάνημα Real Time PCR (Applied Biosystems)
- Ζυγοί (Kern EN & Kern 440-47N)
- Συσκευή ηλεκτροφόρισης (Biorad mini-PROTEAN® tetra cell)
- Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς, transfer (Biorad mini-trans Blot)

- Sonicator (Helscher Ultrasound Technologies, model UP400S)
- Incubator (New Brunswick Galaxy 170S)
- Quick spin (Nippon Genetics Europe GmbH)
- Vortex (Bio Vortex V1)
- Πιπέτες – Air displacement pipettes όγκων 0,1-2 μl, 2-20 μl, 20-200 μl, 100-1.000 μl
- Μηχάνημα εμφάνισης gel και W.B (FluoChemE/ ProteinSimple)
- Nanodrop (Thermofisher)
- Laminar Flow Hood (Tel Star AV-30/70)
- Υδατόλουτρο (P-Selecta)
- Θερμοκυκλοποιητής (Biorad)
- Ανάστροφο Μικροσκόπιο (A. Kruss Optronic Germany)
- Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Newbauer)
- Heat blocker (Kisker)
- PCR hood (UVC/T-AR)

2.2 Υλικά

2.2.1 Χημικά

Αντιδραστήριο	**Εταιρεία**
Βιοαιθανόλη	Kalochem
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	Sigma
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco
L-glutamin	Gibco
Trypsin-EDTA 5% 10x	Gibco
Αντιβιοτικά θρεπτικού μέσου πενικιλλίνη-στρεπταμυκίνη	Gibco
17-β οιστραδιόλη (E2)	Sigma
Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)	Merck
α-αμανιτίνη	Sigma
Αιθάνολη	Sigma

Πίνακας 1: Χημικά στο χώρο των κυτταροκαλλιεργειών

Αντιδραστήριο	Εταιρεία	Αντιδραστήριο	Εταιρεία
Αιθανόλη	Sigma	Tween-20	Sigma
APS	Sigma	β-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel-de Haën
Acrylamide/Bis acrylamide 40 %	Bio-Rad	TEMED	Applichem
SDS 10%	Sigma	Lysis Buffer 5x	Promega
Triton-X 100	Applichem	EDTA	Serva
Tris	Serva	Skimmed milk powder	Regilait
Pageruler TM Prestained Protein Ladder	ThermoScientific Fermentas	Μεθανόλη	Sigma
Ισοπροπανόλη	Sigma	Bradford protein assay	Biorad
Μείγμα αναστολέων πρωτεασών	Roche	Fixer	Fuji Medical
Glycine	Serva	Developer	Fuji Medical
ECL A-B	Santa-Cruz	PMSF	Serva
Trizol	Sigma	RQ1 RNase Free, DNA 10x Reaction Buffer	Promega
Χλωροφόρμιο	Sigma	RQ1 RNase-Free DNase	Promega
Random Hexamers	Invitrogen	RQ1 DNase Stop Solution Buffer	Promega
dNTPs	Invitrogen	RNase out (40u/μl)	Invitrogen
5x FS Buffer	Promega	SuperScript II RT	Promega
DTT	Sigma	NaCl	Sigma
SYBER Green Mix	Applied Biosystems	KCL	Merck
Glycine	Serva	Na_2HPO_4	Merck
Acetic acid	SDS		

Πίνακας 2: Τα χημικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στο χώρο του εργαστηρίου

2.2.2 Αναλώσιμα

- ✓ Σιφώνια των 2, 5, 10 & 25 ml (Sarstedt)
- ✓ Γυάλινες πιπέτες Pasteur (Kimble)
- ✓ Ρύγχοι-tips (0.2-10 μL, 20-200 μL και 100- 1000 μL) (Sarstedt)
- ✓ Βαθμονομημένοι σωλήνες (falcons) (15 mL, 50 mL) (Sarstedt)
- ✓ Φλάσκες για καλλιέργεια κυττάρων, επιφάνειας 25 cm^2 και 75 cm^2 (Sarstedt).
- ✓ Σωληνάρια για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (cryovials ή cryotubes) (Sarstedt)
- ✓ Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,25μm: Amersham™ Protran™
- ✓ Πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorfs (1.5 mL, 2.0 mL) (Sarstedt)
- ✓ Διηθητικά χαρτιά Whatman (Sigma)
- ✓ Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας με 6x wells (Sarstedt)
- ✓ Φωτογραφικά φιλμ ανίχνευσης σήματος σε western blot (Fuji Medical)
- ✓ 48 & 96 qPCR well plates (BioRad)
- ✓ PCR tubes 0.2 ml (Sarstedt)

2.2.3 Διαλύματα

Διάλυμα	**Σύσταση**	**Διάλυμα**	**Σύσταση**
Lysis Buffer	20 mM Tris pH 7.5, 0.5 % Triton X-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA. Πριν τη χρήση του γίνεται προσθήκη 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF και μείγματος αναστολέων πρωτεασών στην απαιτούμενη συγκέντρωση.	**Διάλυμα Bradford**	Αραίωση του διαλύματος Stock που είναι 5x, σε τελική συγκέντρωση 1x. Η αναλογία δείγματος ως προς το διάλυμα της Bradford είναι 1/1000.
PMSF 200mM	Πραγματοποιείται προσθήκη PMFS με αραίωση 10 % σε	**Temed**	Απευθείας χρήση του. Διατήρηση στους 4°C.

	ισοπροπανόλη. Δημιουργία aliquots των 200 μl και φύλαξη στους – 20^{o}C		
Υπερθειικό αμμώνιο (APS)	Διάλυμα συγκέντρωσης 10% w/v. Διαλύτης είναι ddH_2O και φύλαξη στους -20^{o}C.	**DTT 1M**	Για τελικό όγκο 10 ml, διαλύονται 1,54 g DTT 1M σε ddH_2O. Ακολουθεί ανάδευση με μαγνητάκι,δημιουργία aliquots του 1 ml και φύλαξη στους – 20^{o} C.
Running Buffer 10x	Διατηρείται σε RT και για την παρασκευή του χρειάζεται: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% v/v SDS διαλυμένα σε ddH_2O.	**Transfer Buffer 10x**	10 % Running Buffer 10x, 20 % MeOH και 0.05 % SDS. Συμπλήρωση μέχρι τον τελικό όγκο με dH2O. Αποθήκευση στους 4 °C.
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10x (PBS)	Απαιτεί: 91 mM Na_2HPO_4, 17 mM NaH_2PO_4 και 1500 mM NaCl και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.	**Sample Buffer 4x**	1 M Tris pH 6.8, 10 % γλυκερόλη, 10 % SDS, 5 % β-μερκαπτοαιθανόλη, 1 % μπλε της βρωμοφαινόλης. Αποθήκευση στους -20 °C
Παρασκευή διαλυμάτων για εμφάνιση σήματος WB	Χρήση δύο εμπορικών σκευασμάτων της Fuji Medical. Το 1^{o} είναι διάλυμα	**Tris-HCl 1.5M pH 8.8**	Διάλυση κατάλληλης ποσότητας Tris σε dH_2O. Ρύθμιση pH στο 8.8 με προσθήκη HCl 12 N.

	ανάπτυξης σήματος (***Developer solution***) και το 2^{o} διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (***Fixer solution).*** Παρασκευή των κατάλληλων ποσοτήτων από το εκάστοτε διάλυμα.		Αποθήκευση στους 4 °C
Ρυθμιστικό διάλυμα TBS x10	0,2 M Tris base, 1,5 M NaCl Το pH κυμαίνεται μεταξύ 7,2-7,4. Ρυθμίζεται με πυκνό HCl,		

Πίνακας 3: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.2.4 Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιεργειών

1. DMEM low glucose 1.5g/mol with phenol red [+] L-glutamate, [-] pyruvate
2. DMEM low glucose 1.5g/mol without phenol red [+] L-glutamate, [-] pyruvate

Επιπλέον, για την παραγωγή πλήρες θρεπτικού μέσου για την καλλιέργεια των κυτταρικών μας σειρών απαιτείται προσθήκη: 10% FBS, 1% L-Gln, 1%P/S.

2.2.5 Αντισώματα

Πρωτογενές αντίσωμα έναντι	**Εταιρεία**	**Δευτερογενές αντίσωμα έναντι**	**Εταιρεία**
β-actin	Sigma	Mouse IgG-HRP	Pierce Antibodies
Casp-3	Cell Signaling	Rabbit igG-HRP	Pierce Antibodies
Bcl-2	Santa-Cruz		
Casp-9	Cell Signaling		

Πινακας 4: Τα αντισώματα που χρησιμοποιήσαμε έναντι των μορίων στόχων μας.

2.2.6 Εξειδικευμένοι εκκινητές για ενίσχυση μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων

Εκκινητές	Forward	Reverse
ND I	atggccaacctcctactcctcatt	ttatggcgtcagcgaagggttgta
ND II	ccatctttgcaggcacactcatca	attatggatgcggttgcttgcgtg
ND III	gccctacaaacaactaacctgcca	ataggccagacttagggctaggat
ND IV	agctccatctgcctacgacaaaca	taagcccgtgggcgattatgagaa
ND IV L	tatcgctcacacctcatatcctccct	aggcggcaaagactagtatggcaa
ND V	cacagcagccattcaagcaatcc	acctaattgggctgatttgcctgc
ND VI	ataggatcctcccgaatcaaccct	aggattggtgctgtgggtgaaaga
COX I	accctagaccaaacctacgccaaa	taggccgagaaagtgttgtgggaa
COX II	acagatgcaattcccggacgtcta	ggcatgaaactgtggtttgctcca
COX III	tcacttccactccataacgctcct	gtgttacatcgcgccatcattggt
ATP6	acattactgcaggccacctactca	acgtaggcttggattaaggcgaca
ATP8	accgtatggcccaccataattacc	tttatgggctttggtgagggaggt
Cyt b	agtcccaccctcacacgattcttt	agtaagccgagggcgtctttgatt
12 S rRNA	aaactgctcgccagaacactacga	tgagcaagaggtggtgaggttgat
16 S rRNA	taccctcactgtcaacccaacaca	ttaaacatgtgtcactgggcaggc
COX IV	agaaagtcgagttgtatcgcatt	gataacgagcgcggtgaaac
β-actin	ggagcaatgatcttgatctt	ccttcctgggcatggagtcct

Πίνακας 5: Χρήση εξειδικευμένων εκκινητών για την ενίσχυση μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων στα SH-SY5Y.

Εκκινητές	Forward	Reverse
12 S rRNA	CTTGCCTAGCCACACCCCCA	AATCGTATGACCGCGGTGGC
ATP 6	AATTACAGGCTTCCGACACAAAC	TGGAATTAGTGAAATTGGAGTTCCT
Cyt b	TTATCGCGGCCCTAGCAA	TAATCCTGTTGGGTTGTTTGATCC
ND I	CCCCTTCGACCTGACAGAAG	GGGCCGGCTGCGTATT
ND II	TCGTCACACAAGCAACAGCC	GAAGTGGAATGGGGCGAGGC
ND IV	CGCCTACTCCTCAGTTAGCCACA	ACGGCTGTGGATCCGTTCGT
COX I	GAAGAGACAGTGTTTCATGTGGTGT	TCCTGGGCCTTTCAGGAATA
COX II	ACCTGGTGAACTACGACTGCT	TTAGTCGGCCTGGGATGGCA
COX IV	CCATGTCACGATGCTGTCTG	CTCCCAAATCAGAACGAGCG
β-actin	TGTGACGTTGACATCCGTAA	GCTAGGAGCCAGAGCAGTAA

Πίνακας 6: Χρήση εξειδικευμένων εκκινητών για την ενίσχυση μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων στα N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ.

2.3 Κυτταρικές σειρές

Για την μελέτη της επίδρασης του mtERβ στη μιτοχονδριακή μεταγραφή και στην απόπτωση, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω κυτταρικές σειρές:

Κυτταρική Σειρά	Χαρακτηριστικά
SH-SY5Y	Είναι επιθηλιακά κύτταρα από το μυελό των οστών του *Homo sapiens, human* και εμπλέκονται στο νευροβλάστωμα.
Neuro-2a (N2A)	Παρομοίως με τα SH-SY5Y είναι νευροβλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τον οργανισμό *Mus musculus,* κοινώς το ποντίκι.

Πίνακας 7: Παραπάνω παρουσιάζονται συνοπτικά βασικές πληροφορίες για αυτές τις κυτταρικές σειρές, από την ιστοσελίδα http://www.lgcstandards-atcc.org".

2.4 Τεχνικές κυτταροκαλλιεργειών

2.4.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα διατριβή ήταν οι SH-SY5Y και Neuro-2a (N2A). Αμφότερες καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει 1g/L Glucose, 10% FBS, 1% L-Gln και 1%P/S. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στους 37°C και σε 5% CO_2. Ωστόσο, στην περίπτωση μελέτης της επίδρασης ουσιών όπως: 17β-οιστραδιόλη, α-αμανιτίνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM low glucose 1.5g/mol without phenol red [+] L-glutamate, [-] pyruvate. Αντίστοιχα γίνεται η προσθήκη 10% FBS-cis (charcoal inactivated, επεξεργασία με ενεργό άνθρακα) ώστε να μην περιέχει τα ορμονικά μηνύματα καθώς εμείς μελετούμε επίδραση ορμονών. Επιπλέον, με τη χρήση του θρεπτικού μέσου αυτού επιτυγχάνεται «συγχρονισμός» του κυτταρικού κύκλου.

2.4.2 Θρυψινοποίηση κυττάρων

Η διαδικασία αυτή αποσκοπεί στη μείωση του κορεσμού, σε περιπτώσεις πολλών και μεγάλων συσσωματωμάτων (είναι ανεπιθύμητα) αλλά και πριν από τους περισσότερους πειραματικούς χειρισμούς. Η κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα πέρασμα γνωστό και ως *passage.* Η θρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που έχει την ικανότητα να διασπά τις πεπτιδικές αλυσίδες κυρίως στο καρβοξυλικό άκρο των αμινοξέων λυσίνη ή αργινίνη στις πρωτεΐνες που συγκρατούν τα κύτταρα στην επιφάνεια καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα: αφαιρείται το θρεπτικό από τη φλάσκα και λαμβάνει χώρα η προσθήκη θρυψίνης. Μετά το πέρας 1-2 λεπτών (ανάλογα τον κυτταρικό τύπο) πραγματοποιείται μικροσκοπικός έλεγχος για την επίδραση της θρυψίνης. Ιδανικά όλα τα κύτταρα είναι μεμονωμένα ή με τη μορφή μικρών συσσωματωμάτων. Αξιοσημείωτος είναι ο χρόνος έκθεσης των κυττάρων στη θρυψίνη, γιατί η παρατεταμένη πρωτεόλυση μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροτοξικότητα. Έπειτα για να τερματιστεί η δράση της προσθέτουμε θρεπτικό μέσο σε ποσότητα 4 φορές μεγαλύτερη του όγκου της θρυψίνης που χρησιμοποιήσαμε. Μεταφέρουμε όλο το περιεχόμενο της φλάσκας σε falcon και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, σε 1000rpm και θερμοκρασία δωματίου (20-25°C). Το επόμενο βήμα είναι η απομάκρυνση του υπερκειμένου και η επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος (κύτταρα) σε θρεπτικό μέσο για να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω τα κύτταρα ή να επανατοποθετηθούν στη φλάσκα για επανακαλλιέργεια.

2.4.3 Στρώσιμο κυττάρων

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μας ήταν απαιτούμενη η καλλιέργεια της επιθυμητής ποσότητας των κυτταρικών σειρών σε 6 well plates. Για να γίνει αυτό πρώτα πρέπει να μετρήσουμε με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια. Για το μέτρημα ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία: Μετά την θρυψινοποίηση και την πολύ καλή διαλυτοποίηση των κυττάρων, 10μl μεταφέρονται σε καλυπτρίδα στο αιμοκυτταρόμετρο neubauer. Με τη βοήθεια του μικροσκοπίου βρίσκουμε τον αριθμό των κυττάρων που περιέχονται σε αυτά τα 10μl και έπειτα ακολουθεί η αναγωγή στο 1ml. Στη συνέχεια μεταφέρεται ο τελικός όγκος που περιέχει τον επιθυμητό αριθμό των κυττάρων σε falcon το οποίο φυγοκεντρείται σε 1000rpm για 5 λεπτά στους 25^{o}C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα (κύτταρα) διαλυτοποιούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM που περιέχει 10% cis-FBS (charcoal inactivated serum, 1% L-γλουταμίνη και without phenol red. Τέλος, μετά την ισοκατανομή των κυττάρων εντός των πηγαδιών, πραγματοποιείται μικροσκοπικός έλεγχος και μεταφορά τους στο κλίβανο για επώαση.

2.4.4 Προσθήκη ουσιών

A. **Για τον έλεγχο της επίδρασης του mtERβ στη μιτοχονδριακή μεταγραφή στις κυτταρικές σειρές N2A mtGFP, N2A mtGFPERβ και SH-SY5Y χορηγήθηκαν οι εξής ουσίες:**

- **α-αμανιτίνη**: σε τελική συγκέντρωση 10μg/ml και είναι διαλυμένη σε H_2O.
- **17β-οιστραδιόλη (E2):** η τελική της συγκέντρωση είναι 10^{-9}M και είναι διαλυμένη σε αιθανόλη 100%

B. **Για τον ρόλο του mtERβ στην απόπτωση, στα N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ:**

- **Υπεροξείδιο του υδρογόνου:** είναι διαλυμένο σε H_2O και η τελική του συγκέντρωση στα κύτταρα είναι 1mM και 100μM.
- **17β-οιστραδιόλη (E2):** η τελική της συγκέντρωση είναι 10^{-9}M.

Προς αποφυγή λανθασμένης αξιολόγησης των αποτελεσμάτων, λόγω της πιθανής επίδρασης του διαλύτη, προστέθηκε στα κύτταρα μάρτυρες σε όλες τις συνθήκες η κατάλληλη ποσότητα της αιθανόλης και του νερού αντίστοιχα.

2.5 Τεχνικές εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών

2.5.1 Συλλογή κυττάρων (Harvest)

Η συλλογή των κυττάρων μετά την επώαση με ουσίες είναι γνωστή και με τον όρο harvest. Στην περίπτωσή μας σε κάθε well πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και στη συνέχεια πλύση με το ρυθμιστικό διάλυμα PBSx1 σε θερμοκρασία 4^{o}C. Στη συνέχεια με το scraper συλλέγουμε τα κύτταρα σε eppendorfs, που βρίσκονται σε πάγο. Το επόμενο βήμα είναι η φυγοκέντρηση για 5min σε 1500rpm στους 4^{o}C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα (κύτταρα) είτε φυλάσσεται στους -80^{o}C είτε χρησιμοποιείται για περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες.

2.5.2 Κυτταρική λύση

Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με 2 τρόπους:

1. ***Lysis Buffer:*** Περιέχει επιπλέον 1M DTT, 200mM PMSF και κοκτέιλ πρωτεασών (Roche). Η ποσότητα του εξαρτάται από τον όγκο του ιζήματος (κύτταρα). Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 20-25 λεπτά.
2. ***Sonication (λύση με υπερήχους):*** αποτελεί έναν πιο βίαιο τρόπο λύσης των κυττάρων που στοχεύει κυρίως στον κατακερματισμό του DNA. Ο χρόνος επώασης στους υπερήχους και οι επαναλήψεις έκθεσης του δείγματος σε αυτούς, ποικίλει ανάλογα την κυτταρική σειρά. Εμείς εκθέσαμε τα δείγματά μας για 1” στους υπερήχους για 4 φορές. Κάθε κύκλος απέχει από τον επόμενο 45”.

2.5.3 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών μέσω της μεθόδου Bradford

Η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο γεγονός πως η χρωστική *Coomassie Brilliant Blue G-250* έχει την ικανότητα να προσδένεται με τις πρωτεΐνες σε κατάλοιπα λυσίνης και σε όξινες συνθήκες να μετατρέπεται από καφέ-κόκκινη σε μπλε. Τη μεταβολή αυτή στην απορρόφηση μπορούμε να την μετρήσουμε στα 595nm. Ειδικότερα, το αντιδραστήριο που έχουμε στη διάθεσή μας πρέπει να γίνει από 5x σε 1x. Στη συνέχεια προστίθεται στα δείγματα σε αναλογία 1/1000. Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση και επώαση σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου, για πάνω από 20 λεπτά. Σημαντική σημείωση, πως στο δείγμα του τυφλού χρησιμοποιούμε το lysis buffer. Μετά τη μέτρηση ποσοτικοποιούμε την ολική πρωτεΐνη με τη βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλης BSA που έχουμε κατασκευάσει.

2.5.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελεί τον πιο κοινό τύπο ηλεκτροφόρησης. Χαρακτηριστικό της γνώρισμα είναι η παρουσία του δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS), το οποίο μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και τους προσδίδει αρνητικό φορτίο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες της πηκτής να κινούνται προς το θετικό πόλο και κατά τη διάρκεια της μετακίνησης τους να διαχωρίζονται με βάσει το μοριακό τους βάρος. Όσο μικρότερο είναι το μέγεθός τους τόσο πιο γρήγορα μετακινούνται προς το θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο, ενώ το αντίθετο ισχύει για τις πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους. Τέλος, να προσθέσουμε πως όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου στην πηκτή, τόσο καλύτερα επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των χαμηλομοριακών πρωτεϊνών. Αντίστοιχα, όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωσή του, τόσο καλύτερα διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους. Όσον αφορά το πιο τεχνικό κομμάτι ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- ***Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου:*** Παρασκευάζονται 2 ειδών πηκτώματα, ένα με χαμηλή συγκέντρωση ακρυλαμιδίου (συμπύκνωσης) και ένα με υψηλή περιεκτικότητα (διαχωρισμού). Οι πρωτεΐνες τοποθετούνται αρχικά στο πήκτωμα συμπύκνωσης και στη συνέχεια περνούν και διαχωρίζονται με βάσει το μοριακό τους μέγεθος στο πήκτωμα διαχωρισμού. Για το πήκτωμα συμπύκνωσης χρειαζόμαστε Tris-HCl 0,125 M και pH 6,8, SDS 0,1% (w/v) και ακρυλαμίδιο 4% (w/v). Το πήκτωμα διαχωρισμού αποτελείται από 0,375 M Tris-HCl με pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS και 10 ή 12 % (w/v) ακρυλαμίδιο. Τέλος, απαραίτητη για τον πολυμερισμό των πηκτωμάτων είναι η προσθήκη APS 1% (w/v) και TEMED 0,04% (v/v) που δρά ως καταλύτη πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου.
- ***Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση:*** Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση αποτελούνται από: α) κυτταρικό εκχύλισμα που αντιστοιχεί σε 50mg ολικής πρωτεΐνης, που υπολογίσθηκε με την μέθοδο Bradford, β) Tris-HCl pH 7,5 και γ) Sample buffer 4x. Με τη χρήση του Tris-HCl τα δείγματα μας έχουν όλα τον ίδιο όγκο, έτσι ώστε να «ισοφορτωθούν» στις διαδρομές της ηλεκτροφόρησης. Τα «έτοιμα» προς ηλεκτροφόρηση δείγματα τοποθετούνται στο heat block και θερμαίνονται στους 95 ^oC για 5 λεπτά. Η

κίνηση αυτή αποσκοπεί στην κατάργηση ομοιπολικών αλληλεπιδράσεων και της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών.

- ***Ηλεκτροφόρηση:*** Λαμβάνει χώρα υπό σταθερή ένταση ηλεκτρικού ρεύματος στα 0,02 A και σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών που περιέχει SDS 0,1 % (w/v) (Running buffer 1x). Στο σημείο αυτό να τονίσουμε πως γίνεται προσθήκη μείγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (protein marker), που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες μοριακών μεγεθών

2.5.5 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Η ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western, είναι μία αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιολογία με στόχο την ανίχνευση πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών αυτών. Πιο αναλυτικά:

- ***Μεταφορά πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης:*** Οι πρωτεΐνες, μετά από το διαχωρισμό τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, εξισορροπούνται σε διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer buffer). Το Transfer buffer περιέχει SDS που αυξάνει την ικανότητα μεταφοράς και μεθανόλη που αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Ομοίως με πριν, οι πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο και μετακινούνται μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο προς το θετικό πόλο. Για την μεταφορά των πρωτεϊνων χρειαζόμαστε ακόμα διηθητικά χαρτιά Whatman σε μέγεθος λίγο μεγαλύτερο από αυτό του πηκτώματος, τα οποία επίσης εμβαπτίζονται στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς μαζί με δύο σφουγγαράκια προκαθορισμένου και ίδιου μεγέθους. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με τη μέθοδο «sandwich» υπό σταθερή διαβίβαση ρεύματος έντασης 0,35 A για 70 λεπτά στους 4 °C. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης η μεμβράνη επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TBSTx1, σημειώνεται ο marker, ενώ μπορεί στο σημείο αυτό να αποθηκευτεί στους -20^{o}C.
- ***Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων (Blocking):*** Ο αποκλεισμός των μη ειδικών θέσεων στη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης επιτυγχάνεται με την επώαση σε διάλυμα TBSTx1 το οποίο περιέχει 10% w/v άπαχο αποξηραμένο γάλα (3%-5% non-fat dry milk, NFDM), υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η διαδικασία αυτή μειώνει τις πιθανότητες σύνδεσης του

αντισώματος σε μη ειδικές θέσεις και την πιθανή λήψη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

- ***Ανοσοενζυμική ανίχνευση πρωτεϊνών:*** Μετά το πέρας του blocking πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με το αντίσωμα έναντι τις πρωτεΐνης στόχου. Το αντίσωμα είναι διαλυμένο στην επιθυμητή συγκέντρωση σε διάλυμα TBSTx1 που περιέχει 2% w/v γάλα ή BSA. Η επώαση της μεμβράνης με το αντίσωμα πραγματοποιείται overnight (~16h). Στη συνέχεια η μεμβράνη υπόκεινται σε πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα TBSTx1 για την απομάκρυνση της περίσσειας του 1^{ου} αντισώματος. Ακολουθεί επώαση για 1 ώρα με δευτερογενές αντίσωμα που 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 TBSTx1 με 2% w/v άπαχο αποξηραμένο γάλα και με αραίωση 1/50.000. Με την αφαίρεση του 2^{ου} αντισώματος πραγματοποιούνται εκ νέου πλύσεις για την απομάκρυνση των πιθανών μη ειδικών θέσεων.
- ***Ανίχνευση σήματος:*** Η ανίχνευση του σήματος για δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με την HRP βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Με τον όρο χημειοφωταύγεια αναφερόμαστε στην εκπομπή φωτός ως αποτέλεσμα της έκλουσης ενέργειας από ένα διεγερμένο υπόστρωμα. Πιο συγκεκριμένα για την αποτύπωση του σήματος χρησιμοποιούμε το σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence), το οποίο εφαρμόζεται στην μεμβράνη σε αναλογία 1 προς 1 για τα αντιδραστήρια ECLA και ECLB. Με την προσθήκη του μείγματος αυτού η μεμβράνη επωάζεται για 3 λεπτά σε σκοτάδι και σε RT. Στη συνέχεια περνάμε στο σκοτεινό θάλαμο (dark room) για την αποτύπωση του σήματος σε φωτοευαίσθητα X-ray φιλμ. Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ εξαρτάται από πολλούς παράγοντες με κυρίαρχο την ευαισθησία του πρωτογενούς αντισώματος. Στη συνέχεια, το φιλμ τοποθετείται σε διάλυμα εμφάνισης (Developer). Ξεπλένεται με νερό και μεταφέρεται σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fiixer) για 1 λεπτό. Τέλος ξεπλένεται πάλι με το νερό και αφήνεται να στεγνώσει.

2.5.6 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του RNA είναι μια διαδικασία που απαιτεί λεπτούς χειρισμούς και στείρες συνθήκες καθώς η παραμικρή επιμόλυνση μπορεί να αλλοιώσει το τελικό μας αποτέλεσμα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στις κυτταρικές σειρές SH-SY5Y και Neuro-2a ύστερα από την προσθήκη της α-αμανιτίνης και η απομόνωση του βασίστηκε στο παρακάτω πρωτόκολλο με κάποιοες μικρές τροποποιήσεις (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/trizol_reagent.pdf) Πιο αναλυτικά:

- Πλύση των κυττάρων με PBSx1 σε RT
- Προσθήκη Trizol 4^{o}C και επώαση για 5 λεπτά σε RT. Συλλογή των κυττάρων σε eppendorfs,
- Προσθήκη χλωροφόρμιο ($CHCl_3$) 4^{o}C, καλή ανάμειξη και επώαση για 3 λεπτά σε RT. Το χλωροφόρμιο είναι οργανικός διαλύτης και συνδέεται με το RNA, ενώ το Trizol σαν φαινολικός δακτύλιος έχει την τάση να συνδέεται με πρωτεΐνες και λιπίδια.
- Φυγοκέντρηση σε 11.000 rpm για 15 λεπτά στους 4^{o}C.
- Μεταφορά του υπερκειμένου (RNA-χλωροφόρμιο) σε νέα eppendorfs.
- Προσθήκη ισοπροπανόλης (προπανόλη-2), καλή ανάμειξη και επωαση για 7.5 λεπτά σε RT.
- Φυγοκέντρηση σε 11.000 rpm για 10 λεπτά στους 4^{o}C.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου (ισοπροπανόλη) και ήπια διαλυτοποίηση του ιζήματος με αιθανόλη 80% από 4^{o}C.
- Φυγοκέντρηση σε 8.000rpm για 5 λεπτά στους 4^{o}C.
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου (αιθανόλη) και air dry για 10 λεπτά σε RT. Το RNA που βρίσκεται σαν ως ίζημα.
- Ήπια διαλυτοποίηση του RNA με 15μl ddH_2O από 4^{o}C.

Στο σημείο αυτό κρατήσαμε μια μικρή ποσότητα (2μl) από το ολικό RNA για ποσοτικοποίηση και το υπόλοιπο το αποθηκεύσαμε στους -80^{o}C.

2.5.7 Ποσοτικοποίηση ολικού RNA και πέψη του DNA

Βάσει του πρωτοκόλλου που είχαμε στη διάθεσή μας, θεωρούμε ποσότητα **2000ng RNA/μl** ως αρκετή για τη για τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Έτσι ξεκινήσαμε με την ποσοτικοποίηση του RNA και στη συνέχεια φτιάξαμε τα δείγματα μας για την πέψη του DNA που πιθανώς είχαμε απομονώσει. Η πέψη πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του πρωτοκόλλου της Promera (https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/rq1-rnase-free-dnase-protocol.pdf?la=en). Πιο συγκεκριμένα, σε τελικό όγκο 10μl για κάθε δείγμα μας, περιέχονται οι εξής ποσότητες:

- ✓ 1μl RQ1 RNase Free, DNase 10x Reaction Buffer
- ✓ 2μl RQ1 RNase- Free DNase (τα μl πάνε αναλογικά με τα ng του RNA)
- ✓ x μl RNA (όπου x= RNA με συγκέντρωση 2000ng/μl)

Στη συνέχεια για την πέψη του DNA ακολουθήσαμε την εξής διαδικασία:

1. Επώαση των δειγμάτων μας στους 37^{o}C για 30 λεπτά
2. Προσθήκη 1μl RQ1 stop solution buffer, τερματισμόςι της πέψης
3. Επώαση στους 65^{o}C για 10 λεπτά, για να τερματιστεί η δράση της DNase

2.5.8 Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription)

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι μια διαδικασία κατά την οποία μπορεί να συντεθεί συμπληρωματικό DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας ως καλούπι το RNA. Πραγματοποιείται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase ,RT) το οποίο ανακαλύφθηκε το 1970 σε RNA ιούς και συγκεκριμένα ρετροϊούς. Η ανακάλυψη αυτού του ενζύμου οδήγησε στη συμπλήρωση του κεντρικού δόγματος της βιολογίας στη μορφή που έχει σήμερα. Επιπλέον, έδωσε νέες δυνατότητες στη μοριακή βιολογία και στη γενετική μηχανική. Εκμεταλλευόμενοι αυτή τη διαδικασία πραγματοποιήσαμε αντίστροφη μεταγραφή από το ολικό RNA που είχαμε απομονώσει με την βοήθεια του πρωτοκόλλου (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/superscriptII_pps.pdf):

- Επώαση του RNA μας στους 95^{o}C για 5 λεπτά
- Προσθήκη: 1μl random hexamers

1μl dNTPs (10mM)

1μl ddH_2O

- Επώαση των δειγμάτων μας στους 65°C για 5 λεπτά και μετά άμεση μεταφορά τους σε πάγο. Ακολουθεί quick spin.
- Προσθήκη: 4μl 5x FS Buffer

  2μl 0.1M DTT

  1μl RNase out (40u/μl)

  1μl αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II RT
- Τελευταίο στάδιο είναι ένα πρόγραμμα στον θερμοκυκλοποιητή που αποτελείται από: 42°C για 50 λεπτά

  70°C για 15 λεπτά

Μετά το πέρας του τελευταίου σταδίου έχουμε στη διάθεσή μας το cDNA.

2.5.9 PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Τόσο το cDNA όσο και το RNA αποτέλεσαν υποστρώματα για την μέθοδο της Real Time PCR. Στις πειραματικές μας μελέτες χρησιμοποιήσαμε το kit της Applied Biosystems SYBR Select Master Mix. Αυτό περιέχει μείγμα της AmpliTaq πολυμεράσης του DNA (UP), της χρωστικής SYBR Green ER, των dNTPS, του ενζύμου UDG (Uracil-N-Glycosylase) και τέλος ρυθμιστικών διαλυμάτων. Κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο 20μl και αποτελούνταν από:

Αντιδραστήρια	**Συγκέντρωση**
SYBR Green Master Mix	1x (10μl)
Εκκινητής 1	10μM (0,5μl)
Εκκινητής 2	10μM (0,5 μl)
cDNA	(0,5μl)
ddH_2O	εως τον τελικό όγκο

Πίνακας 8: Αντιδραστήρια και ποσότητες για Real Time PCR

Το θερμικό προφίλ που ακολουθήσαμε για να ενισχύσουμε τα επιθυμητά γονίδια στόχους ήταν:

- 52°C για 2 λεπτά
- 95°C για 2 λεπτά
- 35 κύκλους σε 95°C για 15 δευτερόλεπτα και 60°C για 40 δευτερόλεπτα
- τέλος 10 λεπτά στους 60°C.

2.5.10 Επεξεργασία αποτελεσμάτων

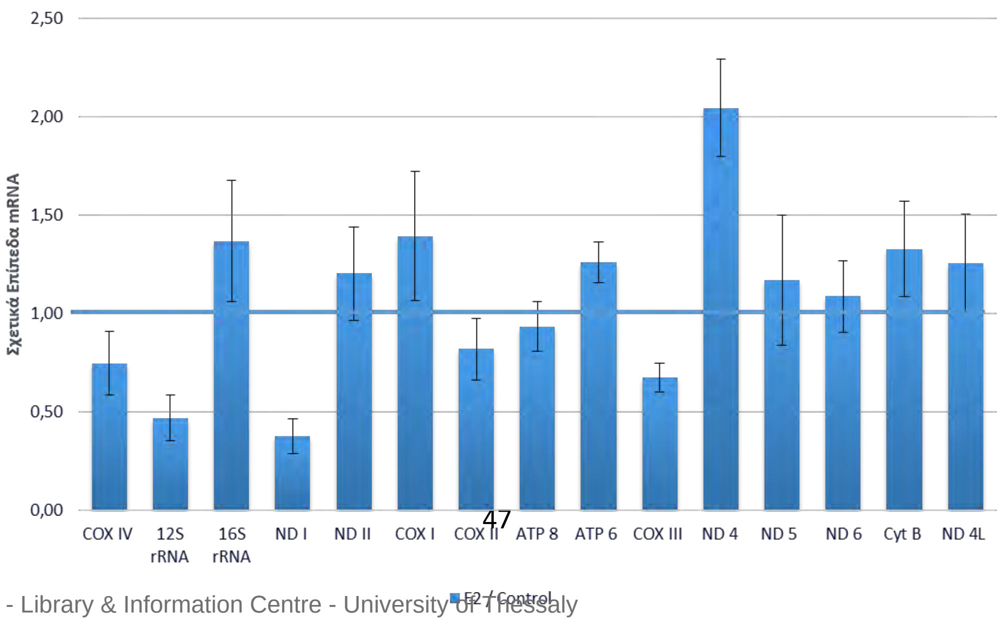
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις πειραματικές διαδικασίες χρειάστηκαν υπολογιστική επεξεργασία. Όσον αφορά τα αποτελέσματα της Real Time PCR, της ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών μέσω της Bradford, της παρασκευής των κατάλληλων δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση και της κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων από τις Western Blot, χρησιμοποιήσαμε το Microsoft Office Excel. Για τα αποτελέσματα από τις Western Blot χρειαστήκαμε το πρόγραμμα Image J για την ποσοτικοποίηση και το Adobe Photoshop CS για την απεικόνιση.

3. Αποτελέσματα

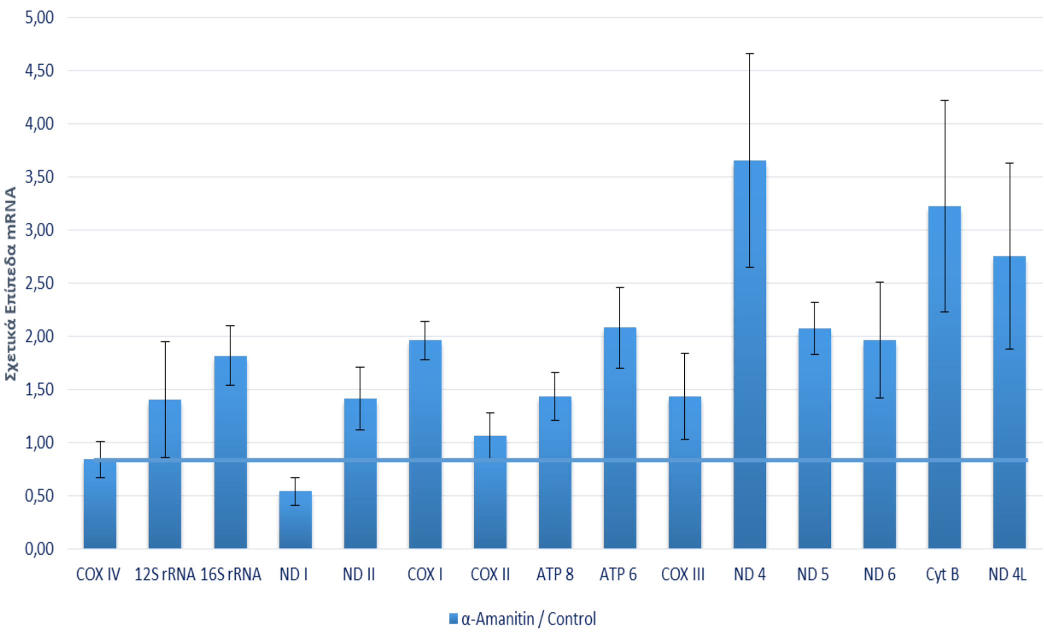
3.1 Έλεγχος της άμεσης επίδρασης της οιστραδιόλης στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής στην κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ανθρώπου, SH-SY5Y

Στην προσπάθεια μας να αποσαφηνίσουμε το ρόλο του mtERβ και ιδιαίτερα την άμεση δράση της E2 στη μιτοχονδριακή μεταγραφή, κύτταρα SH-SY5Y, επωάστηκαν με E2 10^{-9}M ή/και με αναστολέα πυρηνικής μεταγραφής α-αμανιτίνη (10 μg/ml) για 1 και 6 ώρες αντίστοιχα. Μετά τη συλλογή των κυττάρων προχωρήσαμε σε απομόνωση RNA, αντίστροφη μεταγραφή και τέλος PCR πραγματικού χρόνου για την ανίχνευση των επιπέδων mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων στόχων. Σαν μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήσαμε την β-ακτίνη, ενώ ως θετικό μάρτυρα της δράσης της α-αμανιτίνης, χρησιμοποιήσαμε το πυρηνικά κωδικοποιούμενο γονίδιο COXIV.

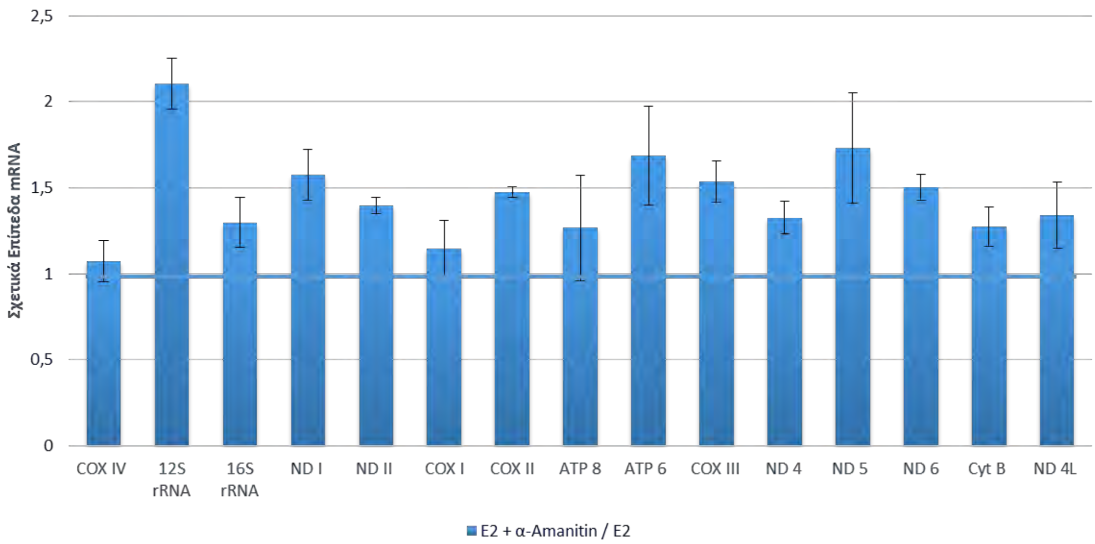
A)



Β)



Γ)

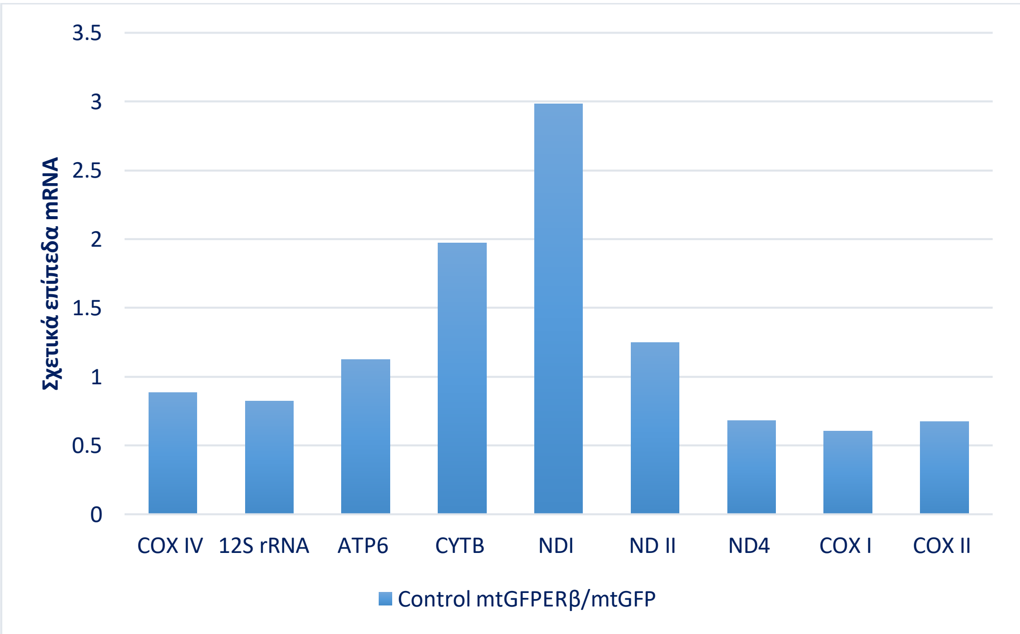


Εικόνα 9: Απεικόνιση του λόγου των σχετικών επιπέδων mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων που προέκυψαν ύστερα από επώαση των κυττάρων SH-SY5Y με Α) Ε2 και Β) α-αμανιτίνη ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA που προέκυψαν από τα κύτταρα μάρτυρες. Γ) Απεικόνιση του λόγου των σχετικών επιπέδων mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων που προέκυψαν ύστερα από επώαση των κυττάρων SH-SY5Y με Ε2 και α-αμανιτίνη ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA που προέκυψαν ύστερα από επώαση των κυττάρων SH-SY5Y με Ε2. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή (n=3) ± SD.

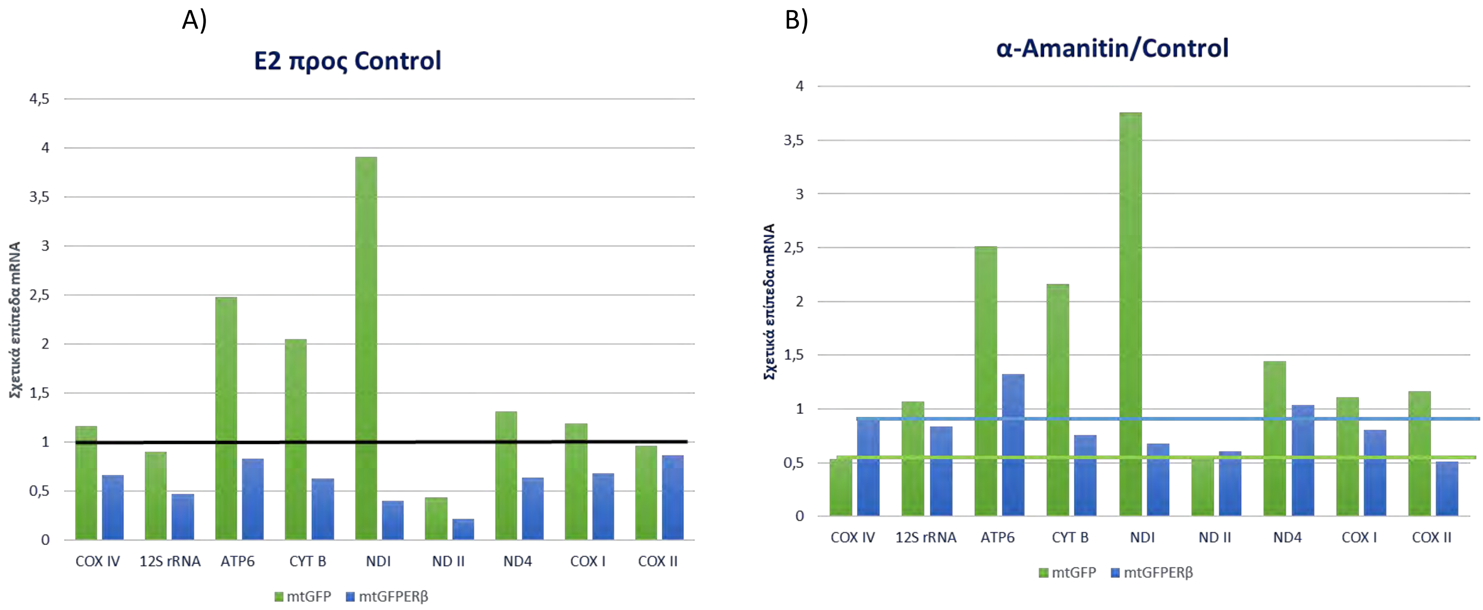
Βάσει των παραπάνω διαγραμμάτων παρατηρούμε μια τάση προς αύξηση των σχετικών επιπέδων mRNA (πλην του 12S, ND I και COX III) των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων στη συνθήκη κατά την οποία τα κύτταρα επωάστηκαν με Ε2 σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (Εικ. 9 Α). Στη συνθήκη κατά την οποία τα κύτταρα επωάστηκαν με α-αμανιτίνη παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων mRNA όλων των γονιδίων στόχων πλην του ND I σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες.(Εικ. 9 Β). Τέλος, παρατηρούμε αύξηση σε όλα τα μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενα γονίδια παρουσία E2 και α-αμανιτίνης όταν αυτά συγκρίνονται με την συνθήκη επώασης των κυττάρων με E2 (Εικ. 9 Γ).

3.2. Έλεγχος της επίδρασης του mtERβ στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής στην σταθερή κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού, N2A mtGFPERβ

Στο σημείο αυτό να τονίσουμε πως ο mtERβ που υπερεκφράζει το σύστημα μας μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο ακόμη και απουσία προσδέτη, λόγω του σήματος μιτοχονδριακής στόχευσης που συμπεριλαμβάνεται στην ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη mtGFPERβ. Τηρώντας ακριβώς τις ίδιες συνθήκες με την *ενότητα 3.1* ελέγξαμε την πιθανή επίδραση του υπερεκφρασμένου mtERβ σε μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενα γονίδια. Όπως και παραπάνω το μόριο κανονικοποίησης μας ήταν η β-ακτίνη ενώ ως θετικός μάρτυρας για τη δράση της α-αμανιτίνης χρησιμοποιήθηκε το πυρηνικά κωδικοποιούμενο γονίδιο COXIV.



Εικόνα 10: Απεικόνιση του λόγου των σχετικών επιπέδων mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων που προέκυψαν από τα ακατέργαστα με ουσίες κύτταρα N2A mtGFPERβ ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA που προέκυψαν από τα ακατέργαστα με ουσίες κύτταρα N2A mtGFP. Οι τιμές που εμφανίζονται στο διάγραμμα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή (n=2).



Εικόνα 11: Απεικόνιση του λόγου των σχετικών επιπέδων mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων που προέκυψαν ύστερα από επώαση των κυττάρων N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ με A) E2 και B) α-αμανιτίνη ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA που προέκυψαν από τα κύτταρα μάρτυρες της κάθε κυτταρικής σειράς. Οι τιμές που εμφανίζονται στα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τημή (n=2)

Πρώτα απ΄ όλα παρατηρούμε ότι τα επίπεδα mRNA των γονιδίων στόχων παρουσιάζουν ομοιότητες ανάμεσα στα ακατέργαστα με ουσίες κύτταρα N2A mtGFPERβ (*Εικόνα 10*) και στα κατεργασμένα είτε με E2 είτε με α-αμανιτίνη κύτταρα N2A mtGFP (*Εικόνα 11*). Στα κύτταρα N2A mtGFPERβ παρουσία E2 εμφανίζονται μειωμένα τα σχετικά επίπεδα mRNA όλων των μιτοχονδριακών γονιδίων. Παρουσία α-αμανιτίνης παρατηρείται αύξηση των επιπέδων mRNA όλων των γονιδίων (πλην του ND II) στα κύτταρα N2A mtGFP και αντίθετα μείωση όλων των γονιδίων στα κύτταρα N2A mtGFPERβ (εκτός του ATP6).

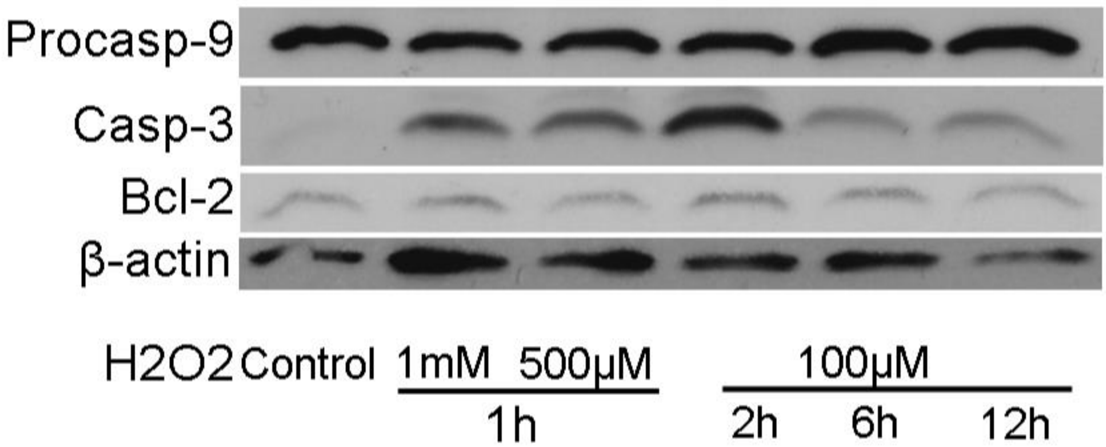
3.3 Συμμετοχή του mtERβ στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο μέσω του μιτοχονδρίου στα N2A mtGFPERβ και N2A mtGFP

Για τον έλεγχο της πιθανής συμμετοχής του mtERβ στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, χρησιμοποιήσαμε τα κύτταρα N2A mtGFPERβ και N2A mtGFP. Τα κύτταρά επωάστηκαν με τον αποπτωτικό παράγοντα υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και στη συνέχεια ελέγχθηκαν συγκριτικά μόρια που συμμετέχουν στη διαδικασία της απόπτωσης μέσω του μιτοχονδρίου. Αρχικά πραγματοποιήθηκε δοκιμαστικό πείραμα προκειμένου να βρούμε τις βέλτιστες συνθήκες για την έναρξη της απόπτωσης.

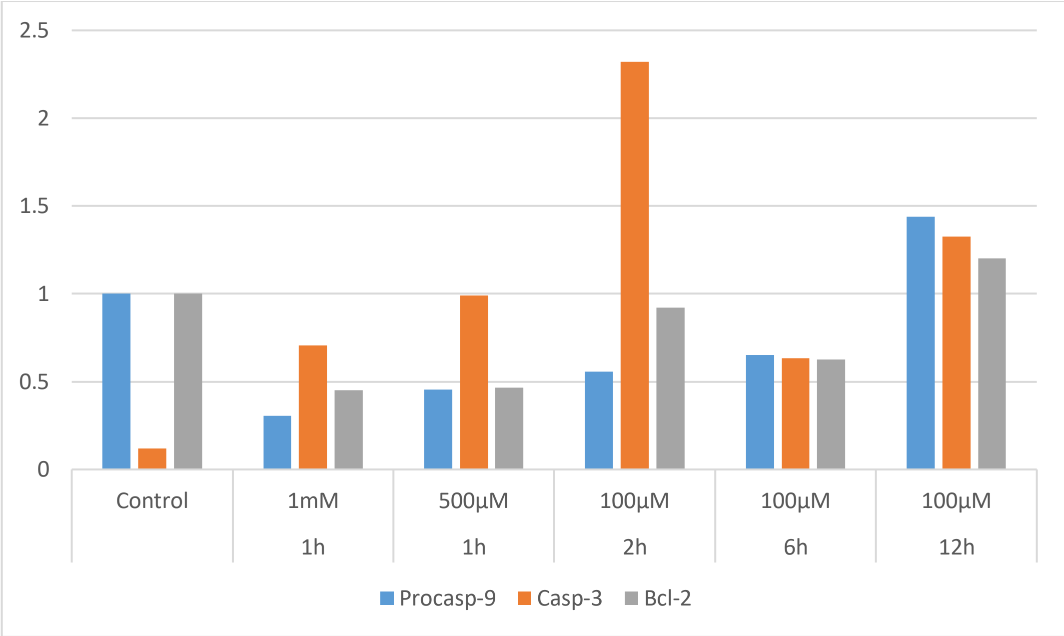
3.3.1 Δοκιμαστικό πείραμα ελέγχου της δράσης του H_2O_2 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης

Ακολουθούν εικόνες και διαγράμματα από τα δοκιμαστικά μας πειράματα προκειμένου να βρούμε τις βέλτιστες συνθήκες, συγκέντρωση και χρόνο επώασης των κυττάρων με H_2O_2. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων για:

- 1 ώρα με 1mM H_2O_2
- 1 ώρα με 500μM H_2O_2
- 2 ώρες με 100μM H_2O_2
- 6 ώρες με 100μM H_2O_2
- 12 ώρες με 100μM H_2O_2



Εικόνα 12: Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα ύστερα από επώαση κυττάρων N2A mtGFP με H_2O_2 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και χρόνους επώασης. Ελέχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που συμμετέχουν στην απόπτωση, όπως προκασπάση 9, κασπάση 3 και Bcl-2.

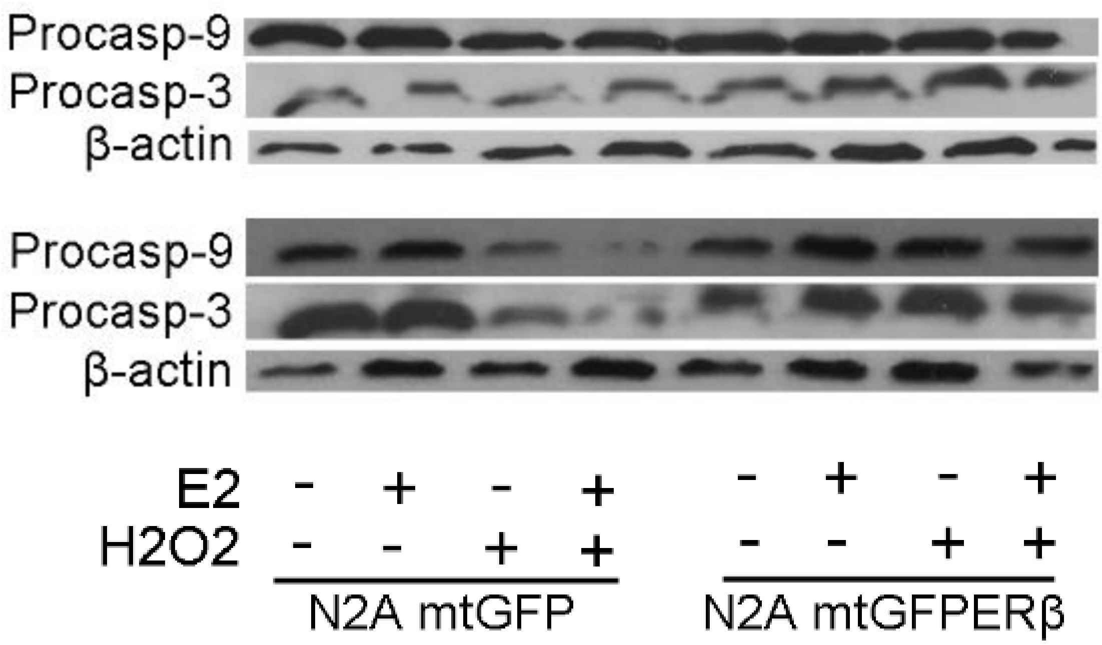


Διάγραμμα 1: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεινικών ζωνών των μορίων Procasp-9 , Casp-3 και Bcl-2 ως προς της β-ακτίνης με τη χρήση του προγράμματος Imaje J.

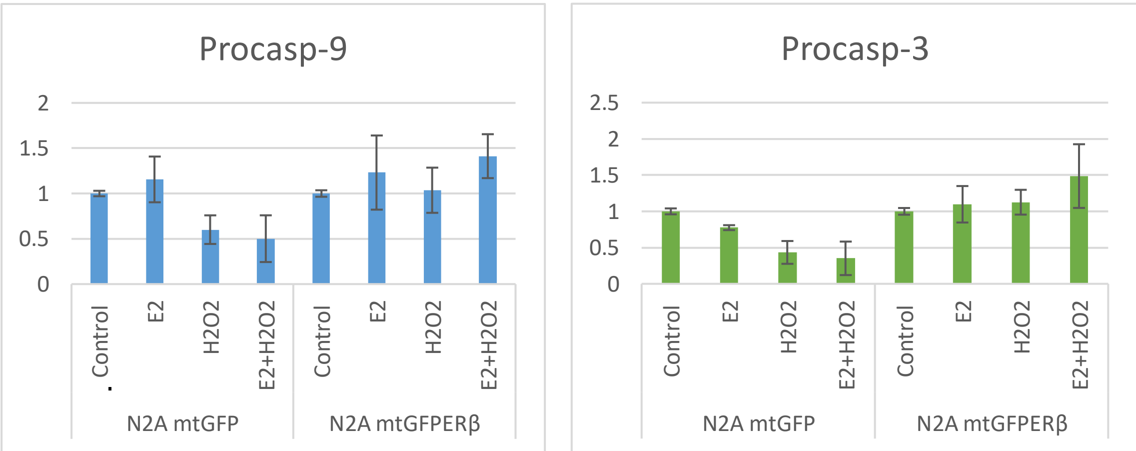
Σύμφωνα με το διάγραμμα 1 παρατηρούμε ότι τα κύτταρα που έχουν επωαστεί με 1mM H_2O_2 για 1 ώρα εμφανίζουν ικανοποιητικά πρωτεινικά επίπεδα των υπο μελέτη μορίων, έχει δηλαδή επαχθεί η απόπτωση χωρίς όμως να μην υπάρχει αναστρεψιμότητα, ιδανικές συνθήκες για τη μελέτη μας.

3.3.2 Έλεγχος του ρόλου του mtERβ στην σπόπτωση ύστερα από επώαση των κυττάρων για 1 ώρα με H_2O_2 1mM

Από την διεξαγωγή του δοκιμαστικού μας πειράματος θεωρήσαμε ενδιαφέρον τα αποτελέσματα που λάβαμε στη συνθήκη επώασης των κυττάρων μας με 1mM H_2O_2 για 1 ώρα. Έτσι πραγματοποιήθηκε πείραμα με τις παραπάνω συνθήκες τόσο στα N2A mtGFP όσο και στα N2A mtGFPERβ κύτταρα. Να τονίσουμε πως σε όλα τα πειράματα η E2 προστέθηκε 8 ώρες πριν την επώαση των κυττάρων με H_2O_2 και ανανεώνονταν κατά την προσθήκη του H_2O_2.



Εικόνα 13: Στη συγκεκριμένη εικόνα παρατηρούμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων που συμμετέχουν στην απόπτωση μέσω του μιτοχονδρίου αλλά και της β-ακτίνης, μέσω της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Η επώαση με 1mM H_2O_2 για 1 ώρα πραγματοποίηθηκε τόσο σε κύτταρα N2A mtGFP όσο και N2A mtGFPERβ.

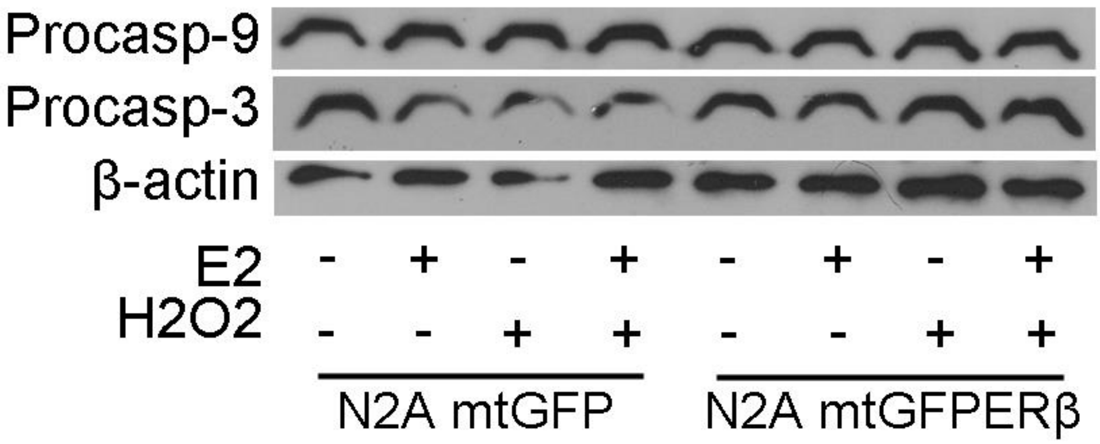


Διάγραμμα 2: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων procasp-9 και procaps-3 ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης. Στην κανονικοποίηση χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα Imaje J.

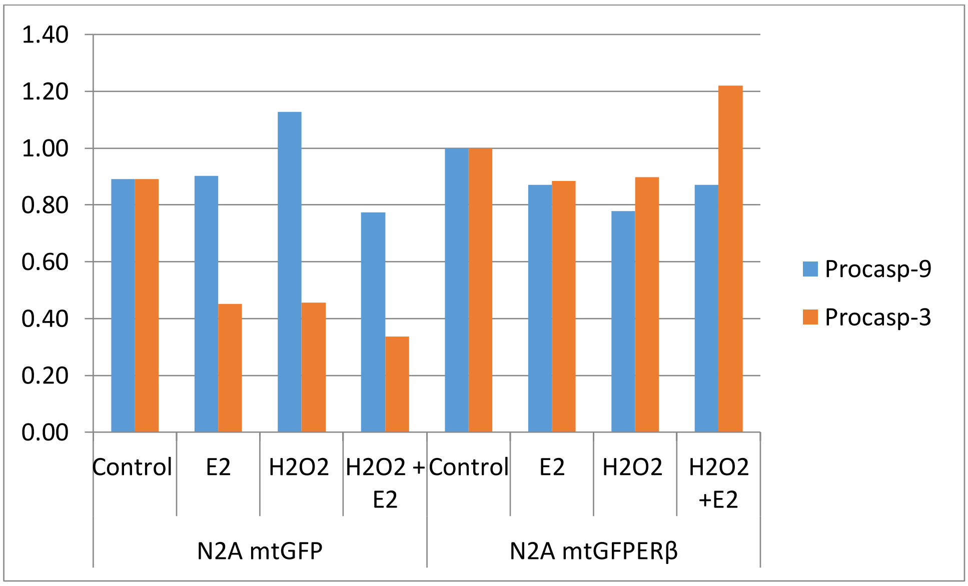
Τα αποτελέσματα μας έδειξαν πως τα κύτταρα N2A mtGFPERβ εποφελούνται από την παρουσία του ERβ στο μιτοχόνδριο σε σύγκριση με τα κύτταρα N2A mtGFP. Πιο συγκεκριμένα στα κύτταρα N2A mtGFPERβ τα επίπεδα των πρωτεϊνικών μορίων procasp-9 και procasp-3 φαίνεται να επηρεάζονται λιγότερο από τη δράση του H_2O_2 , σε σχέση με τα N2A mtGFP, όπου τα επίπεδά τους είναι εμφανώς μειωμένα.

3.3.3 Εκτίμηση του ρόλου του mtERβ στην απόπτωση υπό συνθήκες επώασης των κυττάρων μας για 10 ώρες με H_2O_2 100μΜ

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων procasp-9 και procasp-3 μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη για την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών.



Εικόνα 14: Απεικόνιση πρωτεϊνικών επιπέδων για τα μόρια procasp-9, procasp-3 και β-ακτίνη. Τα κύτταρά μας επωάζονται με H_2O_2 100μΜ για 10 ώρες.



Διάγραμμα 3: Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων procasp-9 και procasp-3 ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης με τη βοήθεια του προγράμματος Imaje J.

Αυτό το οποίο παρατηρούμε από τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος είναι η μείωση των πρωτεΐνικών επιπέδων του μορίου procasp-3 στα κύτταρα N2A mtGFP. Κάτι τέτοιο φαίνεται να πραγματοποιείται σε μικρότερο βαθμό στα κύτταρα N2A mtGFPERβ, ενώ μάλιστα με την προσθήκη της E2, τα μειωμένα επίπεδα της procasp-3 από το H_2O_2 φαίνεται να αυξάνονται.

4. Συζήτηση

Τα οιστρογόνα ανήκουν στην οικογένεια των στεροειδών ορμονών και κατέχουν εξέχοντα ρόλο στην ανάπτυξη και διατήρηση της φυσιολογικής αναπαραγωγικής λειτουργίας. Επιπλέον, τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες ασκούν μια τεράστια ποικιλία βιολογικών δράσεων στο καρδιαγγειακό, μυοσκελετικό, ανοσοποιητικό και κεντρικό νευρικό σύστημα (Fuentes & Silveyra, 2019; Vrtacnik et al., 2014). Το πιο δραστικό οιστρογόνο που παράγεται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η 17β-οιστραδιόλη (E2). Η κυτταρική σηματοδότηση των οιστρογόνων διαμεσολαβείται μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων τους οι οποίοι διακρίνονται: στον υποδοχέα οιστρογόνων α (Estrogen Receptor alpha, ERα), στον υποδοχέα οιστρογόνων β (Estrogen Receptor beta, ERβ) και στον μεμβρανικό υποδοχέα GPR30 (Fuentes & Silveyra, 2019). Τα οιστρογόνα έχουν την ικανότητα να ασκούν τις δράσεις τους μέσω γενωμικών και μη γενωμικών σηματοδοτικών μηχανισμών. Η κατανομή τους στον ανθρώπινο οργανισμό δεν ακολουθεί κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο καθώς υπάρχουν ιστοί όπου κυριαρχεί ένας από τους 2 υποτύπους (π.χ. ERα μαστός, ERβ κόλον) αλλά και ιστοί όπου συνεντοπίζονται και συνεκφράζονται (πχ εγκέφαλος) (Warner et al., 2017). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη δράση των οιστρογόνων προέκυψε μετά την ανακάλυψη του ERβ, ο οποίος μάλιστα φαίνεται να ανταγωνίζεται τον ERα σε παθολογικές καταστάσεις. Μια από τις δράσεις που κέντρισε το δικό μας ενδιαφέρον είναι ο ρόλος του ERβ στο νευρικό σύστημα καθώς υπάρχουν ενδείξεις πως έχει νευροπροστατευτική δράση. Τέλος, οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) εντοπίζονται σε υποκυτταρικά οργανίδια όπως: ο πυρήνας, το κυτταρόπλασμα, οι μεμβράνες και τα μιτοχόνδρια (Heldring et al., 2007).

Όσον αφορά τα μιτοχόνδρια, είναι ζωτικής σημασίας οργανίδια καθώς εμπλέκονται στην παραγωγή ενέργειας του κυττάρου, σε ενδιάμεσα στάδια του μεταβολισμού αλλά και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, δυσλειτουργίες στα μιτοχόνδρια σχετίζονται με νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Golpich et al., 2017). Ένα ακόμη στοιχείο που υποδηλώνει πόσο σημαντικά είναι για το κύτταρο είναι ότι έχουν το δικό τους γονιδίωμα, το οποίο είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση πολλών πρωτεϊνών που χρειάζονται. Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες όπως: (ND I, COX I, ATP 6) συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση ενώ οι υπόλοιπες είναι απαραίτητες για τη σωστή λειτουργία του μιτοχονδρίου (tRNAs) (Psarra & Sekeris, 2008). Βέβαια να τονιστεί πως για την εύρυθμη λειτουργία τους απαιτείται η ομαλή συνεργασία με τον πυρήνα (Liao et al., 2015). Μελέτες τα τελευταία χρόνια εστιάζουν στη δράση του ERβ στα συγκεκριμένα οργανίδια και αυτό γιατί έχει δειχθεί πως παρουσία E2 ο ERβ μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια (Psarra & Sekeris, 2008). Φυσικά το ερώτημα που γεννάται είναι ποια είναι η δράση του στο μιτοχονδριακό περιβάλλον. Οι απόψεις που μέχρι σήμερα επικρατούν είναι πως ρυθμίζει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή, καθώς έχουν ταυτοποιηθεί ειδικές αλληλουχίες απόκρισης στα οιστρογόνα (EREs), και την απόπτωση (Psarra & Sekeris, 2008 ; Chen et al., 2009 ; Liao et al., 2015 ; Simpkins, Yang, Sarkar, & Pearce, 2008).

Στα πλαίσια του ερευνητικού ενδιαφέροντος της ομάδας μας αλλά και της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής προσπαθήσαμε να διευρενήσουμε το ρόλο του mtERβ στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήσαμε κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπου SH-SY5Y, τα οποία εκφράζουν τον ERβ (Psarra & Sekeris, 2008; Zhao et al., 2008). Για τον συγκεκριμένο υποδοχέα έχει δειχθεί πως τόσο παρουσία E2 (Psarra & Sekeris, 2008) όσο και απουσία E2 να μετακινείται στο μιτοχόνδριο (Liao et al., 2015). Επιπλέον στις μελέτες μας χρησιμοποιήσαμε και τις σταθερά μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος ποντικού N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ. Τα κύτταρα N2A mtGFP υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη GFP με μιτοχονδριακή στόχευση και χρησιμοποιήθκαν ως κύτταρα μάρτυρες. Όσον αφορά τα κύτταρα N2A mtGFPERβ υπερεκφράζουν την βήτα ισομορφή του υποδοχέα οιστρογόνων (ERβ) με μιτοχονδριακή στόχευση, σε χιμαιρικό αναγνωστικό πλαίσιο με το γονίδιο αναφοράς GFP, που κωδικοποιεί για την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Να τονίσουμε πως οι δύο προαναφερθείσες σταθερά μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές κατασκευάστηκαν από τον υποψήφιο διδάκτορα της ομάδας μας κ. Γιάννη Τσάλτα. Για να απαντήσουμε όσο το δυνατόν καλύτερα γίνεται στα ερευνητικά ερωτήματα μας μελετήσαμε τον πιθανό ρόλο του mtERβ: α) στη μιτοχονδριακή μεταγραφή και β) στην απόπτωση

Για την επίτευξη του 1^{ου} στόχου μας, που αφορούσε τη συμμετοχή του mtERβ στη μιτοχονδριακή μεταγραφή χρησιμοποιήσαμε τόσο τα κύτταρα SH-SY5Y όσο και τα N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ. Πιο συγκεκριμένα τα κύτταρα αυτά επωάστηκαν για 1 ώρα με E2 και 6 ώρες με α-αμανιτίνη σε συγκεντρώσεις 10^{-9}M και 10 μg/ml αντίστοιχα. Η α-αμανιτίνη είναι ένα πολύ τοξικό κυκλικό οκταπεπτίδιο που βρίσκεται στο γένος των μανιταριών Amanita και προκαλεί αναστολή της πυρηνικής μεταγραφής, αναστέλοντας την πολυμεράση του RNA II (Amit Kumar, 2017), όχι όμως τη μιτοχονδριακή πολυμεράση. Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA και μετατροπή του σε cDNA μέσω της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής. Έπειτα, με εξειδικευμένους εκκινητές ενισχύσαμε μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενα γονίδια με την τεχνική της Real Time PCR (qPCR). Παρακάτω ακολουθούν οι παρατηρήσεις μας ανά κυτταρική σειρά:

- ***SH-SY5Y*:** Κατά τη συνθήκη επώασης των κυττάρων με E2 τα σχετικά επίπεδα των mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμεων γονιδίων τείνουν να αυξηθούν, πιθανότατα λόγω του ότι τα οιστρογόνα επάγουν την έκφραση μιτοχονδριακών γονιδίων και κυρίως αυτών που ανήκουν στην οικογένεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, όπως ND II, COX I και ATP 6 (Psarra & Sekeris, 2008) **.** Κατά τη συνθήκη επώασης των κυττάρων με α-αμανιτίνη τα σχετικά επίπεδα mRNA των γονιδίων στόχων όπως ND II, COX I, ATP 6, ND 4L, ND 4, ND5 και ND6 παρουσιάζουν ακόμη μεγαλύτερη αύξηση. Η αύξηση αυτή θεωρούμε πως οφείλεται στην άμεση ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής καθώς λόγω α-αμανιτίνης η πυρηνική μεταγραφή έχει κατασταλεί, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται από το θετικό μάρτυρά μας, το πυρηνικά κωδικοποιούμενο γονίδιο COX IV. Τέλος, κατά την κανονικοποίηση των επιπέδων mRNA που προέκυψαν από επώαση των κυττάρων με E2 και α-αμανιτίνη σε σύγκριση με τα επίπεδα που προέκυψαν από επώαση των κυττάρων μόνο με E2, παρατηρούμε ότι η αύξηση των σχετικών επιπέδων του mRNA όλων των γονιδίων στόχων διατηρείται, υποδεικνύοντας πως η μιτοχονδριακή μεταγραφή εξαρτάται από την E2.
- ***N2A mtGFP*:** Παρατηρούμε πως στις συνθήκες κατά τις οποίες τα κύτταρα επωάστηκαν με E2 και α-αμανιτίνη τα σχετικά επίπεδα mRNA όλων των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων, πλην του ND II αυξάνονται με παρόμοιο τρόπο. Ακόμη να τονίσουμε πως εμφανίζεται παρόμοιο μοτίβο επιπέδων mRNA στην πλειοψηφία των κοινών γονιδίων που εξετάστηκαν στις 2 κυτταρικές σειρές N2A mtGFP και SH-SY5Y (ATP 6, Cyt B, ND 4). Επομένως όπως και παραπάνω θεωρούμε ότι η E2 αυξάνει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Παρόμοια δράση παρατηρούμε και παρουσία α-αμανιτίνης, εξαιτίας του γεγονότος ότι ο πυρήνας είναι «εκτός παιχνιδιού» και το μιτοχόνδριο προσπαθεί να αντισταθμίσει αυτή την απώλεια (Psarra & Sekeris, 2011).

- ***Στα N2a mtGFPERβ***: Στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον mtERβ προς έκπληξή μας παρατηρήσαμε πως στη συνθήκη επώασης των κυττάρων με E2, η μεταγραφή των εξεταζόμενων γονιδίων μειώνεται και μάλιστα στα περισσότερα από αυτά σε μεγάλο βαθμό, όπως: 12s rRNA, Cyt B, ND I, ND II, ND4 και COX I. Επιπλέον, παρόμοια μείωση στην μεταγραφή αυτών των γονιδίων παρατηρείται και στην συνθήκη της α-αμανιτίνης, σε μικρότερο βαθμό ωστόσο απ' ότι στην E2. Στο σημείο αυτό να τονίσουμε πως ο mtERβ που υπερεκφράζει το σύστημα μας είναι ενεργοποιημένος και μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο ακόμη και απουσία προσδέτη. Έτσι δεν μπορούμε να αποκλείσουμε το γεγονός ότι η E2 στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, συγκέντρωση και χρόνο επώασης να προκαλεί αρνητική ανατροφοδότηση. Τα στοιχεία που αντλούμε από την παρουσία της α-αμανιτίνης στην περίπτωση των mtGFPERβ μας οδηγούν στο ότι η παρουσία της επηρεάζει αρνητικά το μιτοχονδριακό περιβάλλον στο οποίο υπερεκφράζεται ο mtERβ.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ως μελλοντική διερεύνηση, η δοκιμή συγκεντρώσεων E2 σε διάφορους χρόνους επώασης έτσι ώστε να διερευνήσουμε κατά πόσο η συγκέντρωση της οιστραδιόλης επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα.

Όσον αφορά την επίτευξη του 2^{ου} στόχου μας, που αφορά την διευρεύνηση του ρόλου του mtERβ στην απόπτωση, επωάσαμε τις κυτταρικές σειρές N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ με H_2O_2 ώστε να επαχθεί απόπτωση. Αρχικά ας πούμε δυο λόγια για την ουσία (H_2O_2) που χρησιμοποιήσαμε. Το H_2O_2 χρησιμοποιείται στις μέρες μας ως ένας επαγωγέας της απόπτωσης, με πολύ υψηλά ποσοστά επιτυχίας. Παρουσιάζει ευρεία κυτταροτοξικότητα έναντι σχεδόν όλων των κυτταρικών τύπων. Βέβαια, αυτή η κυτταροτοξικότητα επιτυγχάνεται μέσα σε ένα ευρύ φάσμα δόσεων, καθώς κάθε κυτταρικός τύπος παρουσιάζει διαφορετική ευαισθησία ως προς το H_2O_2 (Xiang, Wan, Guo, & Guo, 2016). Μάλιστα, εμάς μας ενδιαφέρει η απόπτωση μέσω της μιτοχονδριακής οδού (εσωτερικό μονοπάτι) κατά το οποίο: έστω πως υπάρχει ένα σήμα στρες στο κυτταρικό περιβάλλον όπως μια ρήξη στο δίκλωνο DNA. Το σήμα αυτό πυροδοτεί μια σειρά από αντιδράσεις που περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53, η οποία με τη σειρά της προκαλεί αύξηση της παραγωγής προ-αποπτοτικών παραγόντων γνωστοί ως PUMA. Αυτές οι δράσεις έχουν ως άμεση συνέπεια την ενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax/Bak που από το κυτοσόλιο μεταφέρεται στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και μπορεί να σχηματίζει ολιγομερή. Τα ολιγομερή αυτά δημιουργούν πόρους από τους οποίους απελευθερώνεται το κυτόχρωμα C, μέσω των μιτοχονδριακών ανιοντικών καναλιών VDAC. Το κυτόχρωμα C στο κυτοσόλιο συνδέεται στις πρωτεΐνες Apaf-1 και σχηματίζουν μια δομή γνωστή ως αποπτόσωμα. Ο σχηματισμός του αποπτοσώματος στρατολογεί την πρωτεΐνη procasp-9. Η αλληλεπίδρασή τους οδηγεί στην ενεργοποίηση και μετατροπή της procasp-9 σε casp-9. Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες που φέρουν το αμινοξύ κυστεΐνη (Cys) στο ενεργό τους κέντρο και «κόβουν» την πολυπεπτιδική αλυσίδα του υποστρώματός τους, μετά από ένα κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος (Asp). Διακρίνονται σε 2 κατηγορίες: τις εναρκτήριες και τις τελεστικές. Η casp-9 ανήκει στην κατηγορία των εναρκτήριων γιατί είναι αυτή που ενεργοποιείται από το αποπτόσωμα και με τη σειρά της ενεργοποιεί την τελεστική casp-3 μέσω πρωτεόλυσης. Εν κατακλείδι, η casp-3 πρωτεολύει κυτοσολικές και πυρηνικές πρωτεΐνες και συμβάλλει στη λύση ολόκηρου του κυττάρου και στον προγραμματισμένο θάνατό του (Rodrigues et al., 2012) (Wang & Youle, 2009). Επομένως, εμείς εστιάσαμε την προσοχή μας σε μόρια που συμμετέχουν στην απόπτωση μέσω του μιτοχονδρίου και συγκεκριμένα στα μόρια, procasp-9, procasp-3, casp-3 και Bcl-2.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ένα δοκιμαστικό πείραμα προκειμένου να βρούμε τις κατάλληλες συνθήκες απόπτωσης. Στο πείραμα αυτό δοκιμάσαμε διαφορετικές συγκεντρώσεις H_2O_2 και χρόνους επώασης σε κύτταρα N2A mtGFP. Καταλήξαμε σε 2 συνθήκες,1mM H_2O_2 για 1 ώρα και 100μM H_2O_2 για 10 ώρες, κατά τις οποίες επάγεται απόπτωση αλλά σε τέτοιο βαθμό ώστε να μπορούμε να μελετήσουμε τη δράση του ERβ. Με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western ελέγξαμε πρωτεινικά επίπεδα μορίων που εμπλέκονται στην απόπτωση σε ολικά εκχυλίσματα κυττάρων N2A mtGFP και N2A mtGFPERβ. Αυτό που παρατηρήσαμε και στις δύο συνθήκες είναι πως κατά την επώαση των κυττάρων με H_2O_2 τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων procasp-9 και procasp-3 μειώνονται στα κύτταρα N2A mtGFP σε αντίθεση με τα κύτταρα N2A mtGFPERβ που αυξάνονται. Μάλιστα κατά τη συνθήκη επώασης των κυττάρων με E2 και H_2O_2 φαίνεται η E2 να αυξάνει την επαγόμενη από H_2O_2 μείωση των επιπέδων της procasp-3 στα κύτταρα N2A mtGFPERβ. Συμπερασματικά, τόσο κατά την επώαση των κυττάρων με μεγάλη συγκέντρωση H_2O_2 για μικρό χρονικό διάστημα όσο και κατά την επώαση με μικρή συγκέντρωση H_2O_2 για μεγάλο χρονικό διάστημα, ο mtERβ φαίνεται να έχει αντι-αποπτωτική δράση. Οι αντι-αποπτωτικές δράσεις του mtERβ έχουν αναφερθεί ξανά μέσω αλληλεπίδρασης του με την πρωτεΐνη Bad και μάλιστα με τρόπο ανεξάρτητο από την παρουσία προσδέτη (Liang et al., 2015). Επιπλέον, οι αντι-αποπτωτικές δράσεις των οιστρογόνων έχουν παρατηρηθεί και στην συσσώρευση ελευθέρων ριζών οξυγόνου και μάλιστα φαίνεται να μειώνουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια (Wang & Youle, 2009). Τέλος, με παροδική διαμόλυνση κυττάρων με πλασμίδια που φέρουν το γοδίνιο που κωδικοποιεί τον ERβ φαίνεται να επιτυγχάνεται μείωση της απόπτωσης καθώς τα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων όπως casp-9, casp-3, bcl-2 και Bad παραμένουν μειωμένα (Zhou et al., 2018).

Ανακεφαλαιώνοντας λοιπόν, πέραν του ότι έχουν ταυτοποιηθεί ειδικές αλληλουχίες απόκρισης για τα οιστρογόνα (Liao et al., 2015) στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, ο mtERβ φαίνεται να συμμετέχει στη μιτοχονδριακή μεταγραφή μέσω αύξησης των επιπέδων έκφρασης μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων (Chen et al., 2009). Η συμμετοχή του στη μιτοχονδριακή μεταγραφή, ως ένα βαθμό φαίνεται και από τη δική μας μελέτη, ενώ σε συνθήκες επώασης με E2 10^{-9}M για 1 ώρα εμφανίζονται «συμπτώματα» αρνητικής ανατροφοδότησης. Βέβαια, να τονίσουμε ξανά πως στο σύστημά μας ο ERβ είναι ενεργοποιημένος, δηλαδή εκφράζεται και μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο ακόμη και απουσία προσδέτη. Η μιτοχονδριακή μεταγραφή είναι μια διαδικασία ιδαίτερα γρήγορη, δύσκολη, απαιτητική καθώς χρειάζεται την εύρυθμη συνεργασία με τον πυρήνα και ακόμα είναι εύκολα αντιστρεπτή καθώς επηρεάζεται άμεσα από πολλά ορμονικά και μη μηνύματα. Οι μελέτες μας για την μιτοχονδριακή μεταγραφή μέσω του ERβ μόλις έχουν ξεκινήσει και απαιτούνται δοκιμές και συνεχής έλεγχος πολλών διαφορετικών παραμέτρων, για την πλήρη κατανόηση του μηχανισμού δράσης και την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων ως προς το ρόλο και την οιστρογονοεξαρτώμενη δράση του mtERβ. Όσον αφορά τις μελέτες μας πάνω στις αντι-αποπτωτικές δράσεις του συγκεκριμένου υποδοχέα φαίνονται ενθαρρυντικές καθώς παρατηρούνται, ύστερα από κατεργασία με H_2O_2, αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων procasp 9 και 3 σε κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ERβ σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες. Φυσικά, απαιτείται έλεγχος περισσότερων μορίων που συμμετέχουν στην απόπτωση και παράλληλα περισσότερες βιολογικές και πειραματικές επαναλήψεις.

5. Βιβλιογραφία

Almey, A., Filardo, E. J., Milner, T. A., & Brake, W. G. (2012). Estrogen receptors are found in glia and at extranuclear neuronal sites in the dorsal striatum of female rats: evidence for cholinergic but not dopaminergic colocalization. *Endocrinology, 153*(11), 5373-5383. doi:10.1210/en.2012-1458

Amit Kumar, J. W., R.James, Christie Nazzareno Dimasi, Changshou Gao. (2017). *Chapter Twelve - Antibody-Drug Conjugates* (Vol. 50): Maurizio Botta.

Aranda, A., & Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev, 81*(3), 1269-1304. doi:10.1152/physrev.2001.81.3.1269

Cavalcanti, F. N., Lucas, T. F., Lazari, M. F., & Porto, C. S. (2015). Estrogen receptor ESR1 mediates activation of ERK1/2, CREB, and ELK1 in the corpus of the epididymis. *J Mol Endocrinol, 54*(3), 339-349. doi:10.1530/JME-15-0086

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. *Biochim Biophys Acta, 1793*(10), 1540-1570. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.06.001

Chinnery, P. F., & Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. *Br Med Bull, 106*, 135-159. doi:10.1093/bmb/ldt017

Cui, J., Shen, Y., & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med, 19*(3), 197-209. doi:10.1016/j.molmed.2012.12.007

Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol, 116*, 135-170. doi:10.1016/bs.apcsb.2019.01.001

Gargiulo, J. S. R. B. A. (2019). *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology* (8 ed.): Elsevier.

Golpich, M., Amini, E., Mohamed, Z., Azman Ali, R., Mohamed Ibrahim, N., & Ahmadiani, A. (2017). Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neurosci Ther, 23*(1), 5-22. doi:10.1111/cns.12655

Gupte, A. A., Pownall, H. J., & Hamilton, D. J. (2015). Estrogen: an emerging regulator of insulin action and mitochondrial function. *J Diabetes Res, 2015*, 916585. doi:10.1155/2015/916585

Hall, J. M., & Korach, K. S. (2002). Analysis of the molecular mechanisms of human estrogen receptors alpha and beta reveals differential specificity in target promoter regulation by xenoestrogens. *J Biol Chem, 277*(46), 44455-44461. doi:10.1074/jbc.M200849200

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., . . . Gustafsson, J. A. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev, 87*(3), 905-931. doi:10.1152/physrev.00026.2006

Jensen, E. V. (1968). Estrogen receptor: ambiguities in the use of this term. *Science, 159*(3820), 1261.

Jensen, E. V., Desombre, E. R., Hurst, D. J., Kawashima, T., & Jungblut, P. W. (1967). Estrogen-receptor interactions in target tissues. *Arch Anat Microsc Morphol Exp, 56*(3), 547-569.

Khan, D., & Ansar Ahmed, S. (2015). The Immune System Is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases. *Front Immunol, 6*, 635. doi:10.3389/fimmu.2015.00635

Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res, 29*(14), 2905-2919. doi:10.1093/nar/29.14.2905

Klinge, C. M. (2008). Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *J Cell Biochem, 105*(6), 1342-1351. doi:10.1002/jcb.21936

Konstantinopoulos, P. A., Kominea, A., Vandoros, G., Sykiotis, G. P., Andricopoulos, P., Varakis, I., . . . Papavassiliou, A. G. (2003). Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer, 39*(9), 1251-1258.

Kuiper, G. G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A, 93*(12), 5925-5930. doi:10.1073/pnas.93.12.5925

Le Dily, F., Vidal, E., Cuartero, Y., Quilez, J., Nacht, A. S., Vicent, G. P., . . . Beato, M. (2019). Hormone-control regions mediate steroid receptor-dependent genome organization. *Genome Res, 29*(1), 29-39. doi:10.1101/gr.243824.118

Liang, J., Xie, Q., Li, P., Zhong, X., & Chen, Y. (2015). Mitochondrial estrogen receptor beta inhibits cell apoptosis via interaction with Bad in a ligand-independent manner. *Mol Cell Biochem, 401*(1-2), 71-86. doi:10.1007/s11010-014-2293-y

Liao, T. L., Tzeng, C. R., Yu, C. L., Wang, Y. P., & Kao, S. H. (2015). Estrogen receptor-beta in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis. *Ann N Y Acad Sci, 1350*, 52-60. doi:10.1111/nyas.12872

Marino, M., Galluzzo, P., & Ascenzi, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics, 7*(8), 497-508.

Omoto, Y., & Iwase, H. (2015). Clinical significance of estrogen receptor beta in breast and prostate cancer from biological aspects. *Cancer Sci, 106*(4), 337-343. doi:10.1111/cas.12613

Paech, K., Webb, P., Kuiper, G. G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P. J., & Scanlan, T. S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science, 277*(5331), 1508-1510. doi:10.1126/science.277.5331.1508

Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2011). The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol, 7*(12), 715-726. doi:10.1038/nrendo.2011.122

Psarra, A. M., & Sekeris, C. E. (2008). Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta, 1783*(1), 1-11. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.10.021

Psarra, A. M., & Sekeris, C. E. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta, 1813*(10), 1814-1821. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.05.014

Rodrigues, V., Cordeiro-da-Silva, A., Laforge, M., Ouaissi, A., Silvestre, R., & Estaquier, J. (2012). Modulation of mammalian apoptotic pathways by intracellular protozoan parasites. *Cell Microbiol, 14*(3), 325-333. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01737.x

Rudolph, A., Toth, C., Hoffmeister, M., Roth, W., Herpel, E., Jansen, L., . . . Chang-Claude, J. (2012). Expression of oestrogen receptor beta and prognosis of colorectal cancer. *Br J Cancer, 107*(5), 831-839. doi:10.1038/bjc.2012.323

Saleiro, D., Murillo, G., Benya, R. V., Bissonnette, M., Hart, J., & Mehta, R. G. (2012). Estrogen receptor-beta protects against colitis-associated neoplasia in mice. *Int J Cancer, 131*(11), 2553-2561. doi:10.1002/ijc.27578

Sever, R., & Glass, C. K. (2013). Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol, 5*(3), a016709. doi:10.1101/cshperspect.a016709

Simpkins, J. W., Yang, S. H., Sarkar, S. N., & Pearce, V. (2008). Estrogen actions on mitochondria--physiological and pathological implications. *Mol Cell Endocrinol, 290*(1-2), 51-59. doi:10.1016/j.mce.2008.04.013

Vrtacnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrac, S., & Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochem Med (Zagreb), 24*(3), 329-342. doi:10.11613/BM.2014.035

Wang, C., & Youle, R. J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet, 43*, 95-118. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134850

Warner, M., Huang, B., & Gustafsson, J. A. (2017). Estrogen Receptor beta as a Pharmaceutical Target. *Trends Pharmacol Sci, 38*(1), 92-99. doi:10.1016/j.tips.2016.10.006

Xiang, J., Wan, C., Guo, R., & Guo, D. (2016). Is Hydrogen Peroxide a Suitable Apoptosis Inducer for All Cell Types? *Biomed Res Int, 2016*, 7343965. doi:10.1155/2016/7343965

Yasar, P., Ayaz, G., User, S. D., Gupur, G., & Muyan, M. (2017). Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol, 16*(1), 4-20. doi:10.1002/rmb2.12006

Zhao, C., Dahlman-Wright, K., & Gustafsson, J. A. (2008). Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal, 6*, e003. doi:10.1621/nrs.06003

Zhou, C., Yu, C., Guo, L., Wang, X., Li, H., Cao, Q., & Li, F. (2018). In Vivo Study of the Effects of ERbeta on Apoptosis and Proliferation of Hormone-Independent Prostate Cancer Cell Lines PC-3M. *Biomed Res Int, 2018*, 1439712. doi:10.1155/2018/1439712