

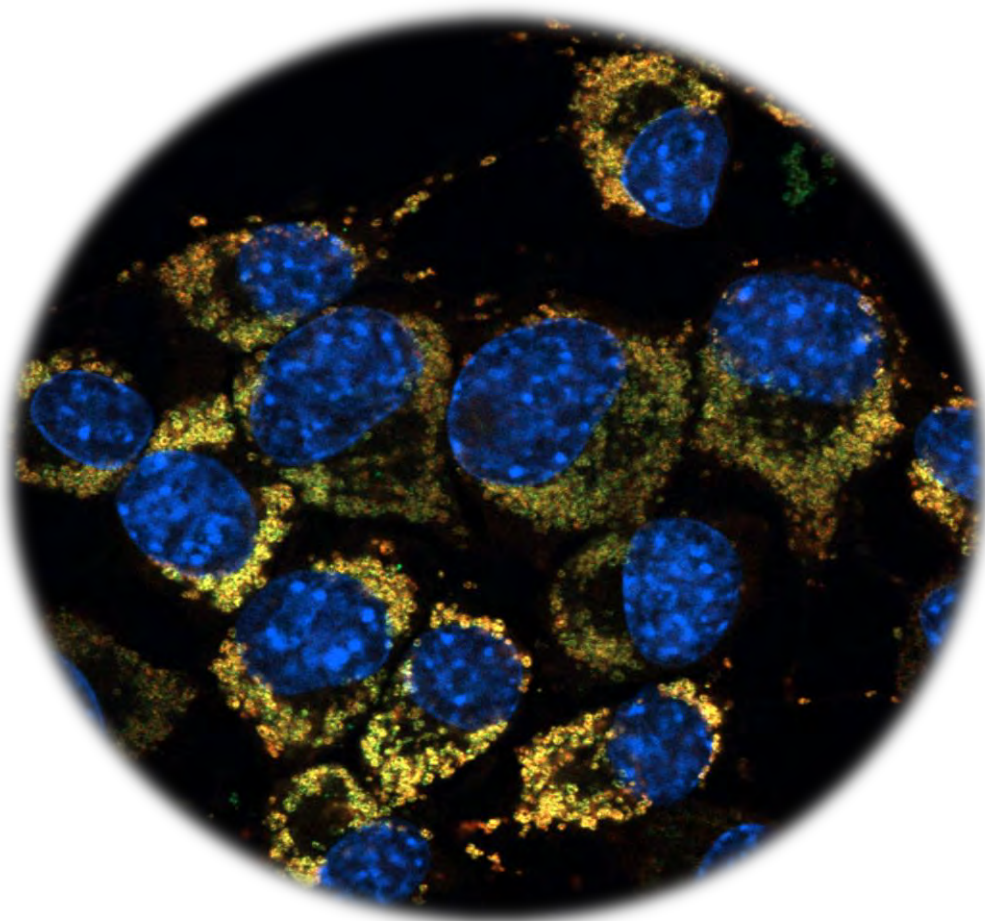


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας



ΙΩΑΝΝΗΣ ΤΣΙΑΛΤΑΣ

Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΒΗΤΑ ΩΣ ΑΜΕΣΟΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ
ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ



2023

«Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΒΗΤΑ
ΩΣ ΑΜΕΣΟΣ ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ»

«ESTROGEN RECEPTOR BETA AS DIRECT REGULATOR OF MITOCHONDRIAL
FUNCTION»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Άννα-Μαρία Ψαρρά (επιβλέπουσα)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Λεωνίδας

Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δήμητρα Μήτσιου

Ερευνήτρια Β', Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Άννα-Μαρία Ψαρρά (επιβλέπουσα)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δημήτριος Λεωνίδας

Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δήμητρα Μήτσιου

Ερευνήτρια Β', Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Θεοδώρα Χολή-Παπαδοπούλου

Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Κωνσταντίνος Δήμας

Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Νικόλαος Μπαλατσός

Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παναγιώτης Πολίτης

Ερευνητής Β', Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Ιωάννης Τσιάλτας

«Ο υποδοχέας οιστρογόνων βήτα ως άμεσος
ρυθμιστής της μιτοχονδριακής λειτουργίας»

«Estrogen receptor beta as direct
regulator of mitochondrial function»

ΙΩΑΝΝΗΣ ΤΣΙΑΛΤΑΣ

2023

«Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΒΗΤΑ ΩΣ ΑΜΕΣΟΣ
ΡΥΘΜΙΣΤΗΣ ΤΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 13

Συνολικός αριθμός σελίδων: 172

Αριθμός Πινάκων: 8

Αριθμός Εικόνων: 52

Αριθμός Παραρτημάτων: 4

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 261

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

(σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά με σύστημα κριτών)

Δημοσιεύσεις στο επιστημονικό πεδίο της διδακτορικής διατριβής

- **Tsialtas I**, et al. (2023) The role of the mitochondrial estrogen receptor beta in mitochondrial transcription. (under submission)
- **Tsialtas I**, Georgantopoulos A, et al. (2021) Anti-Apoptotic and Antioxidant Activities of the Mitochondrial Estrogen Receptor Beta in N2A Neuroblastoma Cells. *Int J Mol Sci* 22.
- **Tsialtas I**, Gorgogietas VA, et al. (2020) Neurotoxic effects of aluminum are associated with its interference with estrogen receptors signaling. *Neurotoxicology*.

Δημοσιεύσεις σε συναφή επιστημονικά πεδία

- Mathomes RT, Koulas SM, **Tsialtas I**, et al. (2023) Combined in silico docking, enzyme kinetics, X-ray crystallography and glioblastoma cellular studies of baicalein acting as a glycogen phosphorylase inhibitor. (under submission)
- Kalousi FD, Pollastro F, Karra AG, **Tsialtas I**, et al. (2023) Regulation of cellular metabolism and anti-inflammatory activities of Mastiha fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. chia. (under revision)
- Karra AG, **Tsialtas I**, et al. (2023) The role of the mitochondrial glucocorticoid receptor in tumorigenesis. *Int J Mol Sci*.
- Kalousi FD, Pollastro F, Christodoulou EC, Karra AG, **Tsialtas I**, et al. (2022) Apoptotic, Anti-Inflammatory Activities and Interference with the Glucocorticoid Receptor Signaling of Fractions from *Pistacia lentiscus* L. var. chia Leaves. *Plants (Basel)* 11.
- Alexopoulos S, Gkouskou A, Stravodimos G, Tsagkarakou AS, **Tsialtas I**, et al. (2022) The druggability of the ATP binding site of glycogen phosphorylase kinase probed by coumarin analogues. *Current Research in Chemical Biology* 2: 100022.
- Tsagkarakou AS, Chasapi SA, Koulas SM, **Tsialtas I**, et al. (2021) Structure activity relationship of the binding of p-coumaroyl glucose to glycogen phosphorylase and its effect on hepatic cell metabolic pathways. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports* 3: 100011.
- Karra AG, Tziortziou M, Kylindri P, Georgatza D, Gorgogietas VA, Makiou A, Krokida A, **Tsialtas I**, et al. (2020) Boswellic acids and their derivatives as potent regulators of glucocorticoid receptor actions. *Arch Biochem Biophys* 695: 108656.
- Drakou CE, Gardeli C, **Tsialtas I**, et al. (2020) Affinity Crystallography Reveals Binding of Pomegranate Juice Anthocyanins at the Inhibitor Site of Glycogen Phosphorylase: The Contribution of a Sugar Moiety to Potency and Its Implications to the Binding Mode. *J Agric Food Chem* 68: 10191-10199.

- Karra AG, Konstantinou M, Tzortziou M, **Tsialtas I**, et al. (2018) Potential Dissociative Glucocorticoid Receptor Activity for Protopanaxadiol and Protopanaxatriol. *Int J Mol Sci* 20.
- Gorgogietas VA, **Tsialtas I**, et al. (2018) Potential interference of aluminum chlorohydrate with estrogen receptor signaling in breast cancer cells. *J Mol Biochem* 7: 1-13.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια και επιβλέπουσα της διδακτορικής μου διατριβής Άννα-Μαρία Ψαρρά, για την ευκαιρία που μου έδωσε και την τιμή που μου έκανε να ενταχθώ στην ερευνητική της ομάδα και να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο έρευνας. Κάποια από τα γεγονότα που εκτίμησα και συνεχίζω να εκτιμώ βαθύτατα είναι ότι απ' τις πρώτες κιόλας μέρες της συνεργασίας μας, αντιμετώπισε με μεγάλο σεβασμό τις ανησυχίες που εξέφρασα, τόσο σε αμιγώς ερευνητικά όσο και σε πιο πρακτικά θέματα, δημιουργώντας ένα θετικό περιβάλλον εργασίας, στο οποίο μου έδωσε ελευθερίες και ταυτόχρονα με παρότρυνε να αναλάβω αρκετές ευθύνες. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με τη διαρκή στήριξη και καθοδήγησή της, διαδραμάτισαν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη μου στον ερευνητικό τομέα. Την ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου για τα εφόδια που απέκτησα όλα αυτά τα χρόνια δουλεύοντας δίπλα της. Ελπίζω να αντεπεξήλθα στις προσδοκίες της.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης στην Ερευνήτρια Β' Δήμητρα Μήτσιου, αρχικά για το ότι δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου και έπειτα για τις συμβουλές που μου έδωσε και τους προβληματισμούς που μοιράστηκε μαζί μου, κατά την ετήσια επικοινωνία μας στα πλαίσια της παράδοσης των αναφορών προόδου μου. Ακολούθως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Δήμα για την άψογη συνεργασία μας κατά τη διεξαγωγή των in vivo πειραμάτων καρκινογένεσης, καθώς και για τη συμμετοχή του στην επταμελή εξεταστική επιτροπή της διδακτορικής μου διατριβής. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Θεοδώρα Χολή-Παπαδοπούλου και τον Επίκουρο Καθηγητή Νικόλαο Μπαλατσό για την τιμή που μου έκαναν να δεχτούν να συμμετέχουν, ως μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, σε αυτό το τόσο σημαντικό για εμένα εγχείρημα. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ερευνητή Β' Παναγιώτη Πολίτη, για τη συμμετοχή του στην επταμελή εξεταστική επιτροπή, για τη φιλοξενία στο εργαστήριό του στο ΙΙΒΕΑΑ καθώς και για την άριστη συνεργασία μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, και ιδιαίτερα την Επίκουρο Καθηγήτρια Βασιλική Σκαμνάκη, για την όμορφη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή Δημήτριο Λεωνίδα, για τις παρατηρήσεις του, τις συμβουλές του, την άμεση ανταπόκριση σε ό,τι χρειάστηκα όλα αυτά τα χρόνια, και για τη γενικότερη συμβολή του ως διευθυντής του εργαστηρίου και μέλος

της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, στην ομαλή ολοκλήρωση των διδακτορικών μου σπουδών.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, και συγκεκριμένα τους Φωτεινή Καλούση, Ραφαηλία Μπέτα, Θύμιο Κυριάκη, Διονύση Αντωνόπουλο, Όλγα Παπαϊωάννου, Γιώργο Στραβοδήμο, Ζωή Αρσενοπούλου, Χριστίνα Δράκου και Νατάσα Καντσάδη, για τη συνεργασία μας, για το όμορφο περιβάλλον που δημιουργήσαμε και για όλα όσα μοιραστήκαμε αυτά τα χρόνια. Αναπόφευκτα, οφείλω να ξεχωρίσω και να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους Θεοδώρα Σολοβού, Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο, Αναστασία Τσαγκαράκου, Αλέξανδρο Μπελαβίλα-Τροβά, Κατερίνα Καρρά, Συμεών Κούλα και Σέφη Αλεξόπουλο, για τις όμορφες έως απολαυστικές στιγμές που μοιραστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια, εντός και εκτός εργαστηρίου, αλλά και για την παρουσία και την υποστήριξή τους σε όλες τις δύσκολες στιγμές. Ήμουν πολύ τυχερός που τους είχα συνοδοιπόρους σε αυτό το ταξίδι.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες τα άτομα που διαδραμάτισαν σημαντικότατο ρόλο καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής και έχω τη χαρά και τιμή να μοιράζομαι μαζί τους την εκτός εργαστηρίου ζωή μου, τους φίλους μου Χρήστο Λιοτύρη, Μαρία Χριστοφίδου, Χρήστο Μήτρο, Γιώργο Πίσσα, Χρήστο Τσικρίκα, Φάνη Δάμτσια, Νάντια Τσόγκα, Γιώργο Σύρρο, Θάνο Λιοτύρη, καθώς και τα αδέρφια μου Ειρήνη, Θεόφιλο και Γιώργο. Τους ευχαριστώ για την ανιδιοτελή υποστήριξη και φροντίδα, αλλά και την υπομονή που δείξαν, ειδικότερα κατά τη συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής. Δεν υπάρχουν λέξεις για να ευχαριστήσω δύο ιδιαίτερα άτομα στη ζωή μου, τον Αχιλλέα Αναγνώστου και το Νίκο Τσουγένη, «Είστε πάντα εδώ ακόμη και όταν δεν σας καλώ. Είμαι ευγνώμων.»

Καθώς το μακρύ ταξίδι των σπουδών μου φτάνει σιγά σιγά στο τέλος του, θα εκμεταλλευτώ την ευκαιρία που μου δίνει το παρόν μέσο για να εκφράσω την αγάπη και ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Βασιλική και Βασίλη, αλλά και στις γιαγιάδες μου, Σταυρούλα και Χάιδω. Η καθημερινή στήριξή τους και η εμπιστοσύνη που μου δείξαν όλα αυτά τα χρόνια και μου δείχνουνε ακόμη και σήμερα, με βοηθά να αντλώ συνεχώς δύναμη στην προσπάθεια να πετύχω τους στόχους μου.

Τέλος, ευχαριστώ την Εθνική Ερευνητική Υποδομή στη Συνθετική Βιολογία «OMIC-Engine» για τη θέση που μου παρείχε στο δυναμικό της κατά την έναρξη των διδακτορικών μου

σπουδών και το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) για τη υποτροφία που μου χορήγησε στη συνέχεια για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα οιστρογόνα αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της λειτουργίας του νευρικού συστήματος, ασκώντας αντιοξειδωτικές, αντιαποπτωτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Οι δράσεις αυτές των οιστρογόνων επιτελούνται μέσω πυρηνικών και μεμβρανικών ERs (Estrogen Receptors, ERs), αλλά και ανεξαρτήτως ERs. Τελευταία αναδεικνύεται και η νευροπροστατευτική δράση των μιτοχονδριακών ERs, και κυρίως του μιτοχονδριακού ERβ (mitochondrial ERβ, mtERβ). Ο ακριβής μηχανισμός δράσης του mtERβ στο συγκεκριμένο οργανίδιο δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και αποτελεί αντικείμενο μελέτης αρκετών ερευνητικών ομάδων. Συνοψολογίζοντας το σημαντικό ρόλο των μιτοχονδρίων στη διατήρηση της βιωσιμότητας και της εύρυθμης λειτουργίας των νευρώνων αναδεικνύεται η σημαντικότητα του χαρακτηρισμού του ρόλου και των μηχανισμών άμεσης δράσης του mtERβ σε νευρικά κύτταρα. Με βάση τα προαναφερθέντα στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η άμεση δράση του mtERβ σε μια πληθώρα μιτοχονδριακών διεργασιών, όπως η μιτοχονδριακή μεταγραφή, η παραγωγή ενέργειας, η αντιοξειδωτική άμυνα και η σχετιζόμενη με το μιτοχόνδριο απόπτωση, καθώς και οι επιπτώσεις των επαγόμενων από τον mtERβ δράσεων στην καρκινογένεση, στην κυτταρική διαφοροποίηση, και στην άμυνα έναντι νευροτοξικών παραγόντων. Για την επίτευξη των στόχων της παρούσας διδακτορικής διατριβής κατασκευάστηκε κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού Neuro-2a (N2A) που υπερεκφράζει τον ERβ υπό μορφή χιμαιρικής πρωτεΐνης με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green fluorescent protein, GFP) με μιτοχονδριακή στόχευση (N2AmtGFPERβ), καθώς και κυτταρική σειρά αναφοράς, που υπερεκφράζει σταθερά την πρωτεΐνη mtGFP (N2AmtGFP). Οι κυτταρικές αυτές σειρές, μεταξύ άλλων, χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή in vivo πειραμάτων καρκινογένεσης σε μύες (xenograft mouse model). Επιπρόσθετα, σε μια πληθώρα πειραματικών διαδικασιών, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ανθρώπου SH-SY5Y καθώς εμφανίζει, σε σύγκριση με αντίστοιχες κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος, αυξημένα ενδογενή πρωτεϊνικά επίπεδα και μιτοχονδριακή εντόπιση του ERβ. Στις προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές (N2AmtGFP, N2AmtGFPERβ και SH-SY5Y) πραγματοποιήθηκαν μελέτες που περιλάμβαναν αρχικά καλλιέργεια κυττάρων παρουσία και απουσία ειδικού αναστολέα πυρηνικής μεταγραφής, παρουσία και απουσία παραγόντων διαφοροποίησης και επαγωγής νευροτοξικότητας, και στη συνέχεια εφαρμογή διαφόρων μεθόδων όπως PCR πραγματικού χρόνου, μικροσκοπία

φθορισμού, ανοσοφθορισμό και ανοσοαποτύπωση κατά Western με χρήση ειδικών αντισωμάτων, μέτρηση των επιπέδων ATP και δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας MTT.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής αναδεικνύουν την άμεση εμπλοκή του mtERβ στην ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και της παραγωγής ATP μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας – οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), δεδομένου ότι παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, παρουσία αναστολέα πυρηνικής μεταγραφής και παρουσία ή απουσία οιστραδιόλης (17β-estradiol, E2), και αύξηση των επιπέδων της μιτοχονδριακής ATP τόσο σε κύτταρα SHSY-5Y, όσο και σε κύτταρα N2AmtGFPERβ. Επιπλέον μελετήθηκε ο ρόλος του υποδοχέα στη ρύθμιση μηχανισμών διαφοροποίησης νευρικών κυττάρων, χρησιμοποιώντας μοντέλο ανάπτυξης κυττάρων σε συνθήκες διαφοροποίησης, όπου παρατηρήθηκε η διαφοροποίηση των κυττάρων που υπερεκφράζουν τον mtERβ, όπως υποδεικνύει η παρατηρούμενη αύξηση του μήκους των νευρώνων και των πρωτεϊνικών επιπέδων του δείκτη διαφοροποίησης βIII τουμπουλίνη (βIII-tubulin, Tuj-1) στη συνθήκη αυτή, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς. Επίσης, η αυξημένη αντιαποπτωτική και αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων N2A, που υπερεκφράζουν τον mtERβ, σε συνθήκες επαγωγής απόπτωσης και οξειδωτικού στρες, αποδεικνύουν την άμεση εμπλοκή του mtERβ στη ρύθμιση της απόπτωσης και του οξειδωτικού στρες, επαληθεύοντας έτσι την νευροπροστατευτική δράση του υποδοχέα.

Οι δράσεις και οι επιπτώσεις των δράσεων αυτών του mtERβ επαληθεύτηκαν και διερευνήθηκαν περαιτέρω πραγματοποιώντας in vivo πειράματα καρκινογένεσης σε μύες. Κατά τη διεξαγωγή των μελετών αυτών επαληθεύτηκε η άμεση δράση του υποδοχέα στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, η οποία οδηγεί στην αυξημένη σύνθεση υπομονάδων OXPHOS και κατ' επέκταση στην ενίσχυση της παραγωγής ενέργειας μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας – OXPHOS. Επίσης διαπιστώθηκε ότι οι προαναφερθείσες δράσεις του mtERβ συντελούν στην αναστολή της καρκινογένεσης, μέσω άμεσης ή έμμεσης ρύθμισης και άλλων βιοχημικών μηχανισμών όπως του κυτταρικού ενεργειακού μεταβολισμού, της μιτοφαγίας και του κυτταρικού κύκλου, αναστρέφοντας έτσι τάσεις για μεταβολικό επαναπρογραμματισμό που έχουν παρατηρηθεί στο φαινόμενο Warburg.

Τέλος, η μελέτη τόσο της πιθανής οιστρογονικής δράσης του αργιλίου (Aluminum, Al) όσο και της εμπλοκής αυτής στην εκδήλωση της νευροτοξικότητας του αργιλίου, ανέδειξε την επαγόμενη από το Al μείωση των επιπέδων του ERβ. Η δράση αυτή πιθανώς να οφείλεται

στην παρατηρούμενη εμπλοκή των ιόντων Al στην κατάσταση φωσφορυλίωσης του ERα στο αμινοξύ S118, που οδηγεί σε αναστολή της πρωτεολυτικής του αποικοδόμησης και συνεπώς σε αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων, τα οποία επάγουν με τη σειρά τους, όπως γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία, τη μείωση των επιπέδων του ERβ και κατά συνέπεια τη μείωση της νευροπροστατευτικής του δράσης. Επίσης η νευροτοξική δράση του Al θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρατηρούμενη από το Al αύξηση της μιτοχονδριακής εντόπισης του ERβ, η οποία πιθανόν να οδηγεί σε υπερλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας – OXPHOS, αυξημένη παραγωγή ROS και επαγωγή απόπτωσης.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής υποστηρίζουν την άμεση δράση του mtERβ στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας τόσο σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές συνθήκες αναδεικνύοντας τον ως έναν εν δυνάμει φαρμακευτικό στόχο για τη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας σε σχετιζόμενες με μιτοχόνδρια παθήσεις όπως καρκινογένεση και νευροεκφυλιστικές νόσοι.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1.1. Οιστρογόνα	4
1.1.1. Γενικές πληροφορίες	4
1.1.2. Βιοσύνθεση οιστρογόνων	5
1.1.3. Μεταβολισμός οιστρογόνων	7
1.1.4. Βιολογική δράση οιστρογόνων	8
1.2. Υποδοχείς Οιστρογόνων	9
1.2.1. Γενικές πληροφορίες	9
1.2.2. Δομή - Ισομορφές	9
1.2.3. Μηχανισμός Δράσης	12
1.2.3.1. Γενικές πληροφορίες	12
1.2.3.2. Άμεσες γενωμικές δράσεις	13
1.2.3.3. Έμμεσες γενωμικές δράσεις	13
1.2.3.4. Άμεσες μη γενωμικές δράσεις	15
1.2.3.5. Δράσεις απουσία προσδέτη	16
1.2.3.6. Σύγκλιση γενωμικής και μη δράσης	16
1.2.3.7. Συνρρυθμιστές των υποδοχέων οιστρογόνων και μεταγραφικός έλεγχος	17
1.3. Συμμετοχή των υποδοχέων οιστρογόνων σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις	17
1.3.1. Γενικές πληροφορίες	17
1.3.2. Υποδοχείς οιστρογόνων και νευρικό σύστημα	18
1.3.3. Υποδοχείς οιστρογόνων και καρκίνος	22
1.4. Μιτοχόνδριο και υποδοχείς οιστρογόνων	29
1.4.1. Γενικές πληροφορίες	29
1.4.2. Μιτοχονδριακός εντοπισμός των υποδοχέων οιστρογόνων	30
1.4.3. Είσοδος του ERβ στο μιτοχόνδριο	30
1.5. Μιτοχονδριακή μεταγραφή	33
1.5.1. Μιτοχονδριακό γονιδίωμα	33
1.5.2. Μιτοχονδριακή μεταγραφή και ρύθμιση της βιοσύνθεσης των OXPHOS από τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών	34
1.5.3. Μιτοχονδριακή μεταγραφή και ρύθμιση της βιοσύνθεσης των OXPHOS από τους υποδοχείς οιστρογόνων	36
1.6. Δράσεις μιτοχονδριακού ERβ (mtERβ)	38
1.7. Μεταλλοοιστρογόνα	41
1.7.1. Γενικές πληροφορίες	41
1.7.2. Αργίλιο και άλατα αργιλίου	41
1.8. Σκοπός	43
1.9. Συνοπτική περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού	43
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	46
2.1. Όργανα	46
2.2. Αναλώσιμα	47
2.3. Χημικά – Διαλύματα	47
2.4. Αντισώματα	51
2.5. Κυτταρικές σειρές	52

2.6.	Καλλιέργεια κυττάρων	52
2.7.	Διαφοροποίηση κυττάρων σε νευρικά	53
2.8.	Κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών	54
2.9.	Ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western	55
2.10.	Μικροσκοπία Φθορισμού – Ανοσοφθορισμός	57
2.11.	Αξιολόγηση της παραγωγής ROS και του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης	59
2.12.	Δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας MTT	60
2.13.	PCR πραγματικού χρόνου (Real time PCR)	60
2.14.	Μιτοχονδριακή κλασμάτωση	62
2.15.	Μέτρηση επιπέδων της ATP	63
2.16.	In vivo πειράματα καρκινογένεσης σε μύες	64
2.16.1.	Εμβολιασμός μυών με τις σταθερές κυτταρικές σειρές N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ και με την κυτταρική σειρά N2A wt	64
2.16.2.	Αφαίρεση όγκων και απομόνωση μιτοχονδριακών κλασμάτων	64
2.16.3.	Βιοχημική ανάλυση των παραγόμενων όγκων	65
2.17.	Στατιστική επεξεργασία	65
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	66
3.1.	Διερεύνηση της εμπλοκής του μιτοχονδριακού ERβ (mtERβ) σε διάφορες μιτοχονδριακές διεργασίες	66
3.1.1.	Επιλογή και χαρακτηρισμός των αποικιών των σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ	66
3.1.2.	Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στην έκφραση μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS	72
3.1.3.	Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στα μιτοχονδριακά επίπεδα της ATP	77
3.1.4.	Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στην κυτταρική διαφοροποίηση	78
3.1.5.	Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στην επαγόμενη από τη σταυροσπορίνη απόπτωση	83
3.1.6.	Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ απόπτωση	85
3.1.7.	Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στην επαγόμενη από το H ₂ O ₂ διατάραξη της μιτοχονδριακής λειτουργίας	88
3.2.	Διερεύνηση του ρόλου του mtERβ στην καρκινογένεση	90
3.2.1.	In vivo πειράματα καρκινογένεσης σε μύες (xenograft mouse model)	90
3.2.2.	Διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου ο mtERβ αναστέλλει την καρκινογένεση	92
3.2.2.1.	Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την καρκινογένεση	93
3.2.2.2.	Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενζύμων της μεταβολικής οδού του κύκλου του κιτρικού οξέος κατά την καρκινογένεση	94
3.2.2.3.	Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στα πρωτεϊνικά επίπεδα κομβικών μορίων ελέγχου του μεταβολισμού κατά την καρκινογένεση	95
3.2.2.4.	Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της AMPK στο αμινοξύ Thr 172 κατά την καρκινογένεση	97
3.2.2.5.	Αξιολόγηση της εμπλοκής του mtERβ σε αποπτωτικούς μηχανισμούς κατά την καρκινογένεση	98
3.2.2.6.	Αξιολόγηση της εμπλοκής του mtERβ στην αυτοφαγία κατά την καρκινογένεση	99
3.2.2.7.	Αξιολόγηση της εμπλοκής του mtERβ στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου κατά την καρκινογένεση	101
3.3.	Διερεύνηση της εμπλοκής του αργιλίου στην οιστρογονική σηματοδότηση σε νευρικά κύτταρα	102

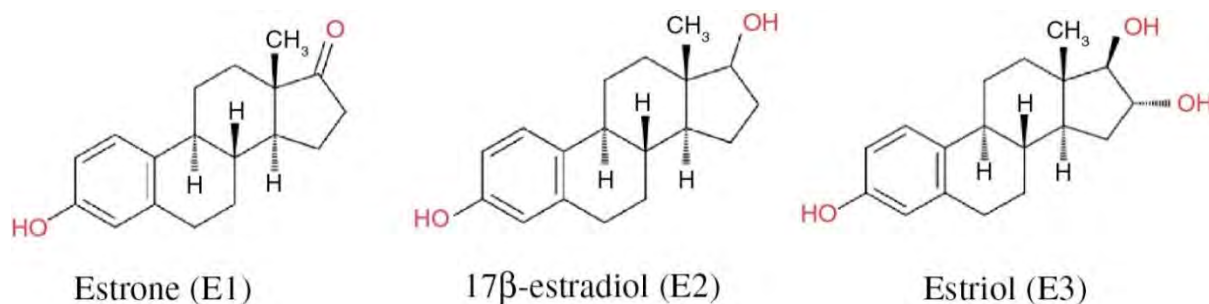
3.3.1.	Αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ERs (ERα και ERβ) σε κύτταρα SH-SY5Y	103
3.3.2.	Αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στην κατάσταση φωσφορυλίωσης του ERα στο αμινοξύ Ser 118 σε κύτταρα SH-SY5Y	104
3.3.3.	Αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y	105
3.3.4.	Αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στην υποκυτταρική εντόπιση του ERβ σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y	107
3.3.5.	Αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στην παραγωγή ROS καθώς και στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y	109
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	112

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Οιστρογόνα

1.1.1. Γενικές πληροφορίες

Τα οιστρογόνα αποτελούν μια ομάδα γυναικείων ορμονών που περιλαμβάνει την οιστρόνη, την οιστραδιόλη (17β-estradiol, E2), την οιστριόλη και την οιστρετρόλη. Είναι οργανικές ενώσεις και ανήκουν στις στεροειδείς ορμόνες και ειδικότερα στις φυλετικές ορμόνες μαζί με τα ανδρογόνα και τα προγεσταγόνα. Και τα τέσσερα οιστρογόνα εμφανίζουν παρόμοια χημική δομή, η οποία περιλαμβάνει 17 δεσμούς άνθρακα-άνθρακα που είναι διατεταγμένοι ως τέσσερις συντηγμένοι δακτύλιοι (τρεις δακτύλιοι κυκλοεξανίου και ένας δακτύλιος κυκλοπεντανίου) (Holinka, Diczfalusy et al. 2008, Nazari and Suja 2016, Santoro, Worsley et al. 2016). Οι χημικές δομές των κύριων ενδογενών οιστρογόνων απεικονίζονται στην Εικόνα 1.



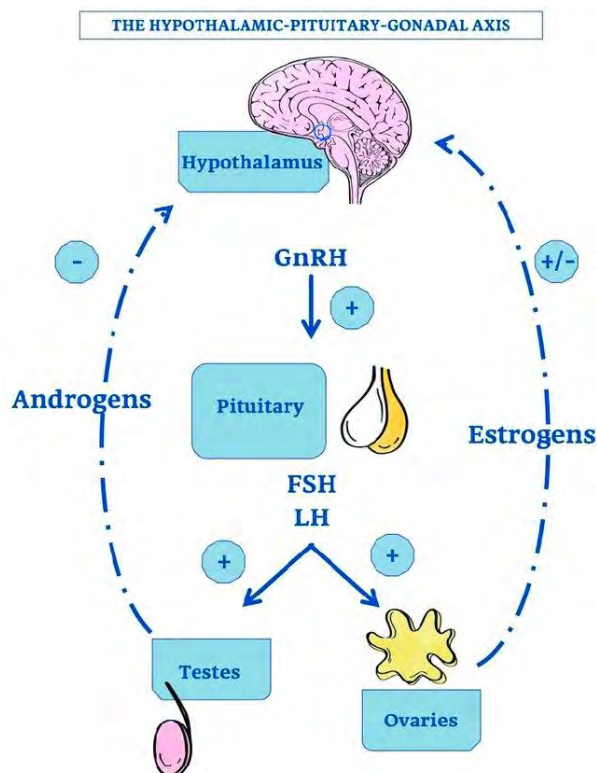
Εικόνα 1: Χημικές δομές κύριων ενδογενών οιστρογόνων (Nazari and Suja 2016).

Ο όρος οιστρογόνο προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις οίστρος (σεξουαλική επιθυμία, πνευματική και ψυχική διέγερση) και γένος (<γεννώ) (Nazari and Suja 2016) υποδηλώνοντας την ικανότητα της ορμόνης να γεννά οίστρο. Κύρια δράση των οιστρογόνων είναι η ρύθμιση του αναπαραγωγικού συστήματος των γυναικών. Ανακαλύφθηκαν στις αρχές του 1900, όταν διαπιστώθηκε ότι ύστερα από εμβολιασμό μυών με υγρό από ωοθυλάκια χοίρων προκλήθηκαν αλλαγές στον κόλπο, στη μήτρα, στον μαστικό αδένα αλλά και στη σεξουαλική δραστηριότητα των μυών (Allen and Doisy 1983). Συνηθίζεται η λέξη οιστρογόνο να αναφέρεται στην οιστραδιόλη, λόγω του ότι αποτελεί το κυρίαρχο οιστρογόνο που κυκλοφορεί στο σώμα κατά τη διάρκεια των αναπαραγωγικών ετών ενός θηλυκού ατόμου. Όσον αφορά τα υπόλοιπα οιστρογόνα, η οιστρόνη βρίσκεται συνήθως σε υψηλά επίπεδα κατά την εμμηνόπαυση, η οιστριόλη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Nazari and Suja 2016) και η οιστρετρόλη, το λιγότερο μελετημένο οιστρογόνο, συντίθεται αποκλειστικά από

το εμβρυϊκό ήπαρ και φτάνει στη μητρική κυκλοφορία μέσω του πλακούντα (Holinka, Diczfalusy et al. 2008).

1.1.2. Βιοσύνθεση οιστρογόνων

Η βιοσύνθεση και η έκκριση των φυλετικών στεροειδών ορμονών υπόκειται σε έλεγχο από τον άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – γονάδες (hypothalamic – pituitary – gonadal axis), όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 2. Η εκλυτική ορμόνη της γοναδοτροπίνης (Gonadotropin - Releasing Hormone, GnRH,) συντίθεται στον υποθάλαμο και διεγείρει την έκκριση των γοναδοτροπινών από την υπόφυση. Οι γοναδοτροπίνες, δηλαδή η θυλακιοτρόπος ορμόνη (Follicle - Stimulating Hormone, FSH) και η ωχρινοτρόπος ορμόνη (Luteinizing Hormone, LH), ρυθμίζουν στη συνέχεια τη σύνθεση των φυλετικών στεροειδών ορμονών από τις γονάδες, δηλαδή τις ωθήκες και τους όρχεις (Rezzani, Franco et al. 2020).

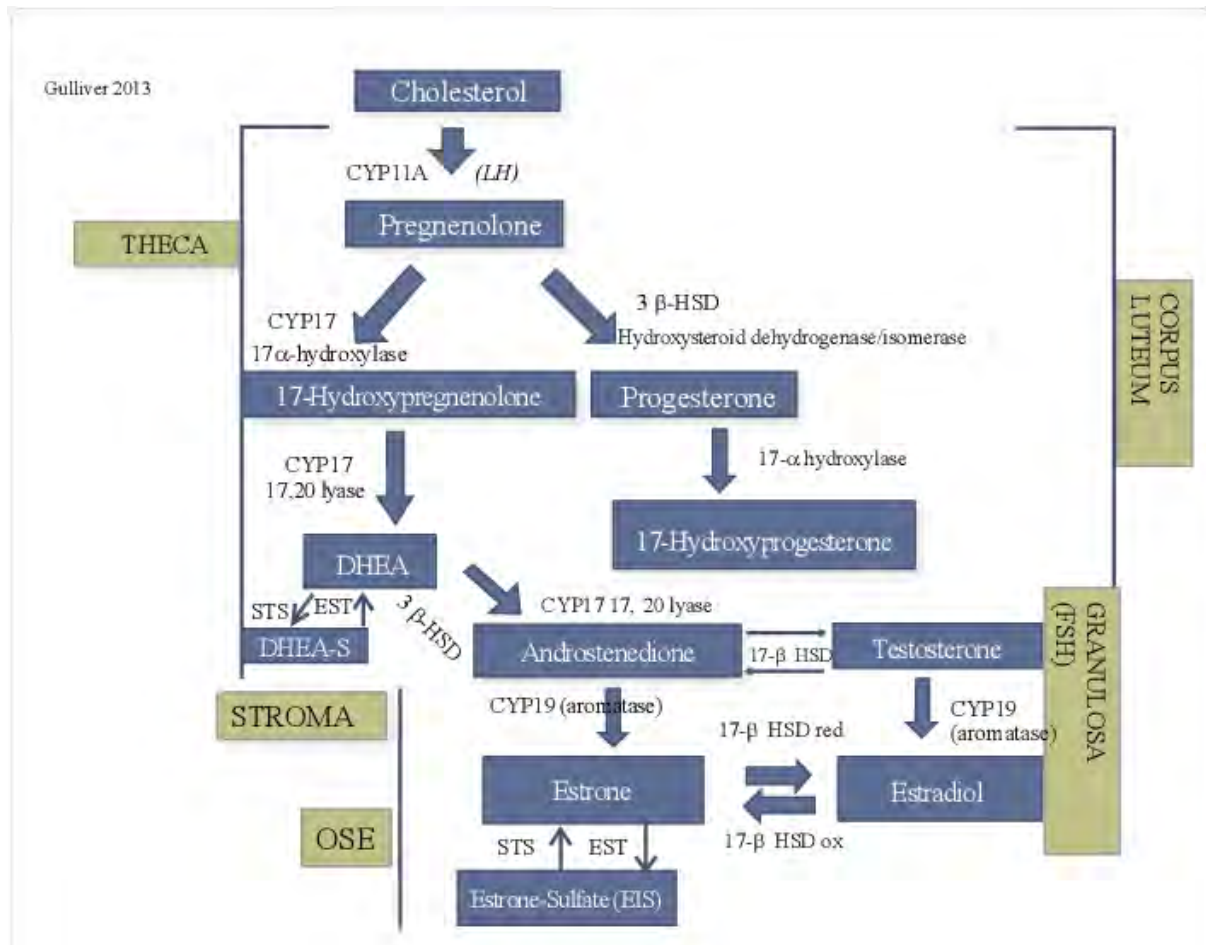


Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – γονάδες. Η GnRH εκκρίνεται από τον υποθάλαμο και διεγείρει την έκκριση των ορμονών LH και FSH από την υπόφυση, οι οποίες με τη σειρά τους διεγείρουν τη σύνθεση και έκκριση των ανδρογόνων και των οιστρογόνων από τις γονάδες. Τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα ελέγχουν τη λειτουργία του υποθαλάμου δημιουργώντας ένα σύστημα αρνητικής αλλά και θετικής επανατροφοδότησης (Rezzani, Franco et al. 2020). GnRH, gonadotropin-releasing hormone; LH, luteinizing hormone; FSH, follicle-stimulating hormone.

Η πρόδρομος ουσία για τη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών είναι η χοληστερόλη και συγκεκριμένα η λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (Low - Density Lipoprotein, LDL) (Miller 2017). Μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται στεροειδογένεση, η LDL μετατρέπεται σε στεροειδείς ορμόνες με 21 άτομα άνθρακα (pregnanes, progestogens), με 19 άτομα άνθρακα (androstanes) και με 18 άτομα άνθρακα (estranses) στις γονάδες, στο λιπώδη ιστό και στο φλοιό των επινεφριδίων. Τα οιστρογόνα αποτελούνται συνολικά από 18 άνθρακες και είναι γνωστά και ως C18 στεροειδή (Gruber, Tschugguel et al. 2002, Zhou and Li 2015, Miller 2017).

Στην Εικόνα 3 απεικονίζονται τα μονοπάτια βιοσύνθεσης των στεροειδών ορμονών που λαμβάνουν χώρα στην ωοθήκη. Η διαδικασία βιοσύνθεσης των οιστρογόνων πραγματοποιείται στο ωοθυλάκιο των ωοθηκών, το οποίο αποτελείται από κοκκιώδη κύτταρα, ωκύτταρο, βασικό έλασμα και κύτταρα θήκης. Υπεύθυνες ορμόνες για τη βιοσύνθεση τους αποτελούν, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι LH και FSH. Αρχικά η LH επάγει τη σύνθεση ανδρογόνων στα κύτταρα θήκης με τη σύνθεση ανδροστενδιόνης από χοληστερόλη. Η ανδροστενδιόνη με τη σειρά της περνά το βασικό έλασμα και εισέρχεται στα κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης, όπου μετατρέπεται, κατ' ευθείαν ή μέσω τεστοστερόνης, στα οιστρογόνα οιστρόνη και οιστραδιόλη. Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα ονομάζεται αρωματάση και η διαδικασία αρωματοποίηση. Επίσης η FSH διεγείρει τα κοκκιώδη κύτταρα, έχοντας ως επακόλουθο την αρωματοποίηση των ανδρογόνων σε οιστρογόνα (Fitzpatrick and Richards 1991, Shoham and Schachter 1996, Gulliver 2013). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η αρωματοποίηση της τεστοστερόνης σε οιστρογόνα, μπορεί να πραγματοποιηθεί και στους περιφερειακούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των λιπωδών κυττάρων και των οστών (Evan R. Simpson, Colin Clyne et al. 2002). Τέλος, η οιστρόνη, η οποία παράγεται με αρωματοποίηση της ανδροστενδιόνης σε εξωαδενικούς ιστούς, μπορεί επίσης να μετασχηματιστεί σε E2, από το ένζυμο 17β-υδροξυστεροειδής αφυδρογονάση (17β - Hydroxysteroid dehydrogenase, 17β - HSD), στους περιφερειακούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του λιπώδους ιστού και του μαστού, του αγγειακού ενδοθηλίου, των λείων μυϊκών κυττάρων, του εγκεφαλικού ιστού και των οστικών κυττάρων (Bulun, Zeitoun et al. 1999, Simpson 2003). Τα αρσενικά άτομα παράγουν επίσης οιστρογόνα, με τη δράση της αρωματάσης, σε κύτταρα της αναπαραγωγικής οδού, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων Sertoli, των κυττάρων Leydig και των ώριμων σπερματοκυττάρων. Συνοψίζοντας, το μεγαλύτερο ποσοστό των οιστρογόνων παράγεται στις

ωοθήκες, αλλά δύναται να παραχθούν, σε μικρές ποσότητες, και από το ήπαρ, το πάγκρεας, τα επινεφρίδια και το λιπώδη ιστό (Barakat, Oakley et al. 2016).



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών βιοσύνθεσης των στεροειδών ορμονών στην ωοθήκη καθώς και των βασικών ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτά. Συνοπτικά, η LH είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση ανδροστενδιόνης από χοληστερόλη στα κύτταρα θήκης. Η ανδροστενδιόνη, αφού περάσει το βασικό έλασμα, εισέρχεται στα κοκκιώδη κύτταρα της ωοθήκης και μετατρέπεται σε οιστρόνη και οιστραδιόλη, είτε απευθείας είτε μέσω τεστοστερόνης. Παράλληλα, η FSH διεγείρει τα κοκκιώδη κύτταρα επάγοντας την αρωματοποίηση των ανδρογόνων σε οιστρογόνα (Gulliver 2013). LH, luteinizing hormone; FSH, follicle-stimulating hormone.

1.1.3. Μεταβολισμός οιστρογόνων

Φυσιολογικά η μεταβολική μετατροπή των οιστρογόνων επιτρέπει την απέκκρισή τους από το σώμα μέσω των ούρων, των κοπράνων ή/και της χολής. Στα κύτταρα στόχους, υπάρχουν διαφορετικές οδοί ικανές να μεταβολίζουν την E2 και την οιστρόνη. Κατά κύρια βάση οι αντιδράσεις που μεσολαβούν για το μεταβολισμό τους καταλύονται από μέλη της οικογένειας ενζύμων του κυτοχρώματος P450 (όπως τα CYP1A1, CYP1B1 και CYP1A2). Λόγω της υψηλής έκφρασης αυτών των ενζύμων στο ήπαρ μεγάλο ποσοστό του μεταβολισμού των οιστρογόνων πραγματοποιείται σε αυτόν τον ιστό. Ωστόσο, το CYP1B1 εκφράζεται και σε άλλους ιστούς, για παράδειγμα στο μαστικό αδέν, στον εγκέφαλο, στη μήτρα και στην

υπόφυση, όπου μπορούν επίσης να μεταβολιστούν η E2 και η οιστρόνη (Tsuchiya, Nakajima et al. 2005, Samavat and Kurzer 2015).

1.1.4. Βιολογική δράση οιστρογόνων

Τα οιστρογόνα εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών λειτουργιών, που περιλαμβάνει, ανάμεσα σε πολλές άλλες, τη ρύθμιση του εμμηνορροϊκού κύκλου, της αναπαραγωγής και της οστικής πυκνότητας, την ανάπτυξη των γεννητικών οργάνων και του μαστού και τη λειτουργία του εγκεφάλου (Gruber, Tschugguel et al. 2002). Στις γυναίκες, τα οιστρογόνα είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη τόσο των πρωτογενών όσο και των δευτερογενών χαρακτηριστικών φύλου (Gruber, Tschugguel et al. 2002, Simpson, Misso et al. 2005). Επιπλέον, τα οιστρογόνα, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, στους άνδρες είναι απαραίτητα για λειτουργίες όπως η ωρίμανση του σπέρματος, η στυτική λειτουργία και η διατήρηση μιας υγιούς λίμπιντο (Schulster, Bernie et al. 2016). Παρόλο που τα οιστρογόνα παίζουν διαφορετικούς ρόλους στη φυσιολογία των φυσιολογικών ανδρών και γυναικών, σε ορισμένες φυσιολογικές καταστάσεις μπορούν να διαδραματίσουν παρόμοιους ρόλους και στα δύο φύλα (Simpson, Misso et al. 2005).

Οι στεροειδείς ορμόνες, συμπεριλαμβανομένων δηλαδή και των οιστρογόνων, μεταφέρονται στο αίμα δεσμευμένες με ειδικές πρωτεΐνες φορείς όπως η σφαιρίνη δέσμησης ορμόνης φύλου (Sex Hormone-Binding Globulin, SHBG) (Gurte, Pownall et al. 2015) και ως λιπόφιλα μόρια μπορούν μέσω παθητικής διάχυσης να εισέλθουν στον εσωτερικό χώρο των κυττάρων στόχων τους, να δεσμευτούν με εξειδικευμένους υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs) και να επιτελέσουν τις δράσεις τους (Olefsky 2001).

1.2. Υποδοχείς Οιστρογόνων

1.2.1. Γενικές πληροφορίες

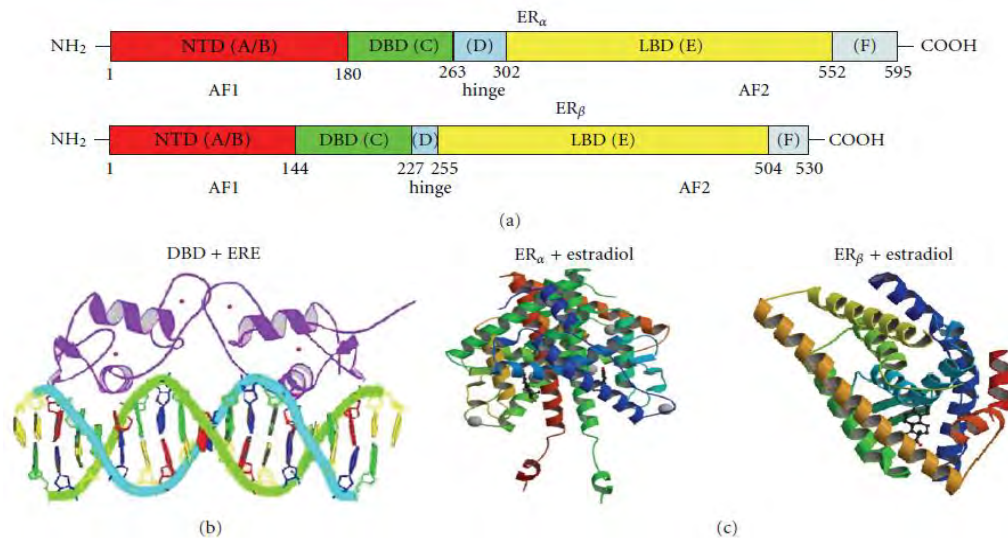
Οι υποδοχείς οιστρογόνων ανήκουν στους πυρηνικούς υποδοχείς και συγκεκριμένα στους υποδοχείς στεροειδών ορμονών. Ο πρώτος υποδοχέας οιστρογόνων «ERα» (Estrogen Receptor alpha, υποδοχέας οιστρογόνων άλφα) ανακαλύφθηκε το 1958 από την ερευνητική ομάδα του Δρ. Elwood Jensen, η οποία αρχικά απέδειξε ότι οι γυναικείοι αναπαραγωγικοί ιστοί ήταν σε θέση να δεσμεύσουν, μέσω πρωτεϊνών, οιστρογόνα από την κυκλοφορία και στη συνέχεια απέδειξε ότι οι δεσμευμένοι με τα οιστρογόνα υποδοχείς ήταν σε θέση να μετατοπιστούν στον πυρήνα των κυττάρων και να επάγουν τη γονιδιακή μεταγραφή (Jensen, Desombre et al. 1967, Jensen, Suzuki et al. 1968). Ο ERα κλωνοποιήθηκε το 1985 χρησιμοποιώντας RNA από την ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF-7 (Green, Walter et al. 1986, Greene, Gilna et al. 1986). Το 1996 ανακαλύφθηκε ο υποδοχέας οιστρογόνων βήτα (Estrogen Receptor beta, ERβ) από το Δρ. Jan-Ake Gustafsson και την ερευνητική του ομάδα, οι οποίοι κλωνοποίησαν μια πρωτεΐνη που εμφάνιζε υψηλό ποσοστό ομολογίας με τον ERα και εκφραζόταν κυρίως στα κοκκίωδη κύτταρα της ωοθήκης και στα εκκριτικά επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη αρουραίων (Kuiper, Enmark et al. 1996). Τελευταίος ανακαλύφθηκε ο συζευγμένος με G πρωτεΐνες υποδοχέας οιστρογόνων 1, «GPER1» (G Protein-coupled Estrogen Receptor 1), ή αλλιώς μεμβρανικός υποδοχέας οιστρογόνων. Ο υποδοχέας αυτός ταξινομήθηκε για πολλά χρόνια ως ορφανός καθώς δεν είχαν ταυτοποιηθεί μόρια που να συνδέονται με υψηλή συγγένεια σε αυτόν (Feng and Gregor 1997). Το 2005 αποδείχτηκε η άμεση δέσμευση του υποδοχέα GPER1 με την οιστραδιόλη σε κύτταρα καρκίνου του μαστού αλλά και σε κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τον υποδοχέα αυτό. Στη συνέχεια μελετήθηκε εκτενώς η άμεση εμπλοκή του στους ενδοκυτταρικούς καταρράκτες σηματοδότησης που ενεργοποιούνται από τα οιστρογόνα (Revankar, Cimino et al. 2005, Molina, Figueroa et al. 2017).

1.2.2. Δομή - Ισομορφές

Οι ERs (ERα και ERβ) αποτελούνται από διάφορες λειτουργικές περιοχές (Εικόνα 4a), οι οποίες εξυπηρετούν συγκεκριμένες λειτουργίες. Οι τρεις κύριες λειτουργικές περιοχές είναι (i) η αμινοτελική περιοχή (N-Terminal Domain, NTD), (ii) η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA-

Binding Domain, DBD) και (iii) η περιοχή δέσμευσης με τον προσδέτη (Ligand-Binding Domain, LBD) (Beato, Herrlich et al. 1995, Kumar, Zakharov et al. 2011). Παρόλο που η NTD εμφανίζει μικρό ποσοστό ομολογίας, οι DBD και LBD είναι πολύ συντηρημένες μεταξύ των δύο κύριων υποδοχέων οιστρογόνων (ERα και ERβ), εμφανίζοντας περισσότερο από 95% και 55% ομολογία, αντίστοιχα (Kuiper, Enmark et al. 1996, Mosselman, Polman et al. 1996, Jia, Dahlman-Wright et al. 2015). Αντίθετα, η δομή του GPER1 δεν εμφανίζει ομοιότητες με τον ERα ή τον ERβ. Ο GPER1, ως ένας τυπικός υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνη, αποτελείται από 7 διαμεμβρανικές α-έλικες, 4 εξωκυτταρικά τμήματα και 4 κυτταροπλασματικά τμήματα και έχει χαμηλή συγγένεια δέσμευσης με την E2 σε σύγκριση με τους άλλους δύο υποδοχείς οιστρογόνων (Prossnitz and Barton 2014).

Ακολουθεί συνοπτική περιγραφή των λειτουργιών των κύριων περιοχών, από τις οποίες αποτελούνται οι ERs, με τη σειρά που απεικονίζονται στην Εικόνα 4a. Αρχικά η NTD (A/B) εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της γονιδιακής μεταγραφής μέσω της λειτουργίας ενεργοποίησης της μεταγραφής 1 (Activation Function 1, AF1), η οποία θα αναλυθεί παρακάτω. Η DBD (C) συμβάλλει στο διμερισμό του υποδοχέα και στη δέσμευσή του, μέσω δύο δακτύλων ψευδαργύρου (ZincFinger), σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στη χρωματίνη (Εικόνα 4b), γνωστές ως στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (Estrogen Response Elements, EREs) (Kumar, Zakharov et al. 2011). Η περιοχή σύνδεσης (hinge region, D) αποτελεί μια εύκαμπτη περιοχή που συνδέει τις περιοχές DBD και LBD και είναι υπεύθυνη κυρίως για την πυρηνική μετατόπιση των ERs αλλά και για τη σύνδεσή τους με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs) (Kuiper, Enmark et al. 1996, Kumar, Zakharov et al. 2011). Στη συνέχεια, η καρβοξυτελική περιοχή, γνωστή και ως LBD (E), αποτελεί την περιοχή δέσμευσης των οιστρογόνων καθώς και διαφόρων συνρρυθμιστών, συνενεργοποιητών και συνκαταστολέων (Kumar, Zakharov et al. 2011). Η "F" περιοχή, που εδράζεται ανάμεσα της LBD και του καρβοξυτελικού άκρου, έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων της οιστρογονικής σηματοδότησης και η δράση της εξαρτάται από τον προσδέτη και το είδος του υποκινητή (Montano, Muller et al. 1995, Koide, Zhao et al. 2007). Τέλος, εντός των περιοχών NTD και LBD, βρίσκονται δύο περιοχές ενεργοποίησης AFs, AF1 και AF2, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας των ERs. Σε αντίθεση με την AF1, η λειτουργία της AF2 εξαρτάται από την παρουσία ορμόνης (Beato 1989, Tora, White et al. 1989, Kumar, Zakharov et al. 2011).

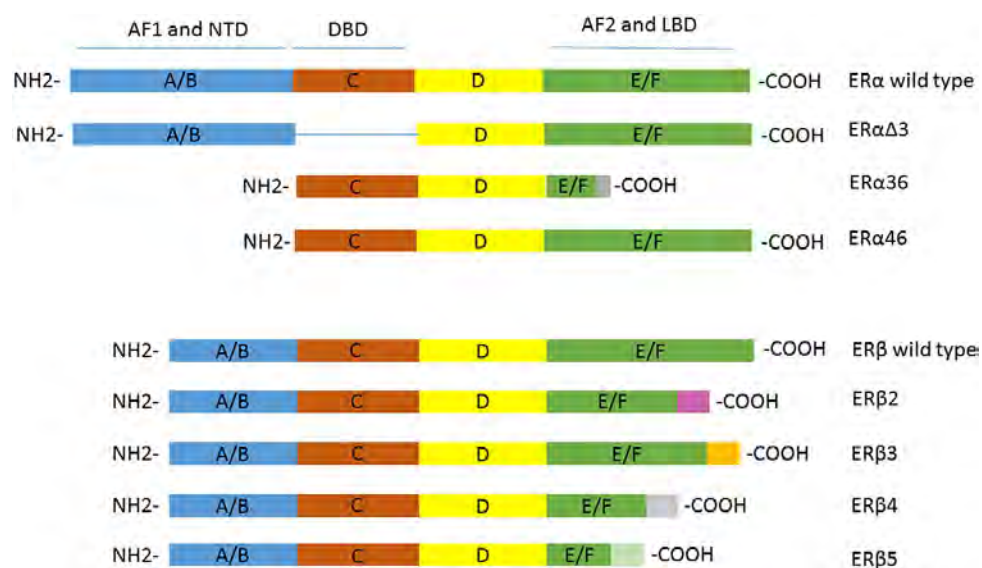


Εικόνα 4: (a) Δομή των δύο κύριων υποτύπων των ERs. Η κάθε περιοχή επισημαίνεται με διαφορετικό χρώμα και από τα αριστερά προς τα δεξιά παρατηρούμε τις εξής περιοχές: (A/B) αμινοτελική περιοχή – NTD, (C) περιοχή πρόσδεσης στο DNA – DBD, (D) περιοχή σύνδεσης – hinge, (E) περιοχή δέσμευσης με τον προσδέτη – LBD και (F) F περιοχή, που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν τη θέση στην αλληλουχία των αμινοξέων που βρίσκεται η κάθε περιοχή. (b) Απεικόνιση της δέσμευσης της DBD περιοχής του ER με τα στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα – ERE που βρίσκονται στο DNA. (c) Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής του ERα (αριστερά) και του ERβ (δεξιά) ύστερα από τη δέσμευσή τους με την οιστραδιόλη (Kumar, Zakharov et al. 2011). ERα, Estrogen receptor alpha; ERβ, Estrogen Receptor beta; NTD, N-Terminal Domain; DBD, DNA-Binding Domain; LBD, Ligand-Binding Domain; ERE, Estrogen Response Elements.

Στον άνθρωπο, ο ERα κωδικοποιείται από το γονίδιο ESR1 (Estrogen Receptor 1), που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6, 6q25.1 (Gosden, Middleton et al. 1986), ο ERβ κωδικοποιείται από το γονίδιο ESR2 (Estrogen Receptor 2), που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14, 14q23.2 (Enmark, Pelto-Huikko et al. 1997) και ο GPER κωδικοποιείται από γονίδιο που εδράζεται στο χρωμόσωμα 7, 7p22.3 (Prossnitz and Barton 2014).

Εκτός από τον πλήρους μήκους ERα (595 αμινοξέα, 66kDa) έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές βραχύτερες ισομορφές (ERα36-36kDa, ERα46-46kDa, ERαΔ3), προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος ή αποτέλεσμα της παρουσίας εναλλακτικών κωδικονίων έναρξης (Εικόνα 5) (Jia, Dahlman-Wright et al. 2015). Ορισμένες από αυτές τις βραχύτερες ισομορφές (ERα36 και ERα46) στερούνται της NTD και επομένως και της περιοχής AF1, αδυνατώντας με αυτόν τον τρόπο να ρυθμίσουν τη μεταγραφή. Αντίθετα, είναι σε θέση να σχηματίσουν ετεροδιμερή με τον πλήρους μήκους ERα και να αναστείλουν την ικανότητά του να ελέγχει τη μεταγραφή. Η βραχύτερη ισομορφή του ERα, ERα-36, στερείται και των δύο περιοχών ενεργοποίησης της μεταγραφής, AF1 και AF2, και έχει αποδειχθεί ότι επάγει σηματοδοτικά μονοπάτια που ξεκινούν από τη μεμβράνη κατά τη δέσμευση του υποδοχέα με την οιστραδιόλη ή την οιστριόλη (Gu, Chen et al. 2014, Jia, Dahlman-Wright et al. 2015). Τέλος η ισομορφή ERαΔ3,

παρόλο που στερείται του εξονίου 3 που κωδικοποιεί την DBD, εμφανίζει κανονικό πυρηνικό εντοπισμό (Jia, Dahlman-Wright et al. 2015). Επιπλέον, από τη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πέντε βραχύτερες ισομορφές για τον ERβ (Εικόνα 5). Η κύρια διαφορά μεταξύ του πλήρους μήκους ERβ (530 αμινοξέα, 59kDa) και των βραχύτερων ισομορφών του είναι στην καρβοξυτελική – LBD περιοχή, καθιστώντας δύσκολη την πρόσδεση των οιστρογόνων σε αυτή (Jia, Dahlman-Wright et al. 2015). Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι ισομορφές του ERβ, που δεν έχουν μεταγραφική δραστηριότητα, μπορούν να σχηματίσουν ετεροδιμερή με τον ERα και να καταστείλουν τη δράση αυτού (Vrtacnik, Ostanek et al. 2014).



Εικόνα 5: Δομές των κύριων ισομορφών των ERs. Από αριστερά προς τα δεξιά απεικονίζονται οι εξής περιοχές: (A/B) αμινοτελική περιοχή – NTD, (C) περιοχή πρόσδεσης στο DNA – DBD, (D) περιοχή σύνδεσης – hinge, (E/F) περιοχή δέσμευσης με τον προσδέτη – LBD μαζί με την F περιοχή (Jia, Dahlman-Wright et al. 2015). ERα, Estrogen Receptor alpha; ERβ, Estrogen Receptor beta; AF, Activation Function; NTD, N-Terminal Domain; DBD, DNA-Binding Domain; LBD, Ligand-Binding Domain.

1.2.3. Μηχανισμός Δράσης

1.2.3.1. Γενικές πληροφορίες

Η αλληλεπίδραση των οιστρογόνων με ERs που εντοπίζονται στο κυτοσόλιο, στον πυρήνα ή σε μεμβρανικά συστατικά του κυττάρου οδηγεί στην ενεργοποίηση μιας πληθώρας σηματοδοτικών μονοπατιών. Μετά την πρόσδεση των οιστρογόνων στους κυτοσολικούς ERα και / ή ERβ, οι οποίοι είναι ανενεργοί και συμπλοκοποιημένοι με HSPs, επάγεται ομο- ή ετεροδιμερισμός αυτών, μετατόπιση του συμπλόκου ορμόνης-υποδοχέα στον πυρήνα, άμεση (1.2.3.2) είτε έμμεση (1.2.3.3) δέσμευση του συμπλόκου στο DNA και τέλος

ενεργοποίηση της γονιδιακής μεταγραφής. Τα οιστρογόνα μπορούν να ενεργοποιήσουν επιπλέον έναν καταρράκτη σηματοδότησης στο κυτταρόπλασμα (1.2.3.4), ύστερα από αλληλεπίδραση με τον GPER ή / και με τους μεμβρανικούς ERα και ERβ. Επιπρόσθετα, οι ERs μπορούν να ενεργοποιηθούν και να επιτελέσουν τις δράσεις τους απουσία προσδέτη (1.2.3.5) (Heldring, Pike et al. 2007, Klinge 2008, Gurte, Pownall et al. 2015, Hewitt and Korach 2018).

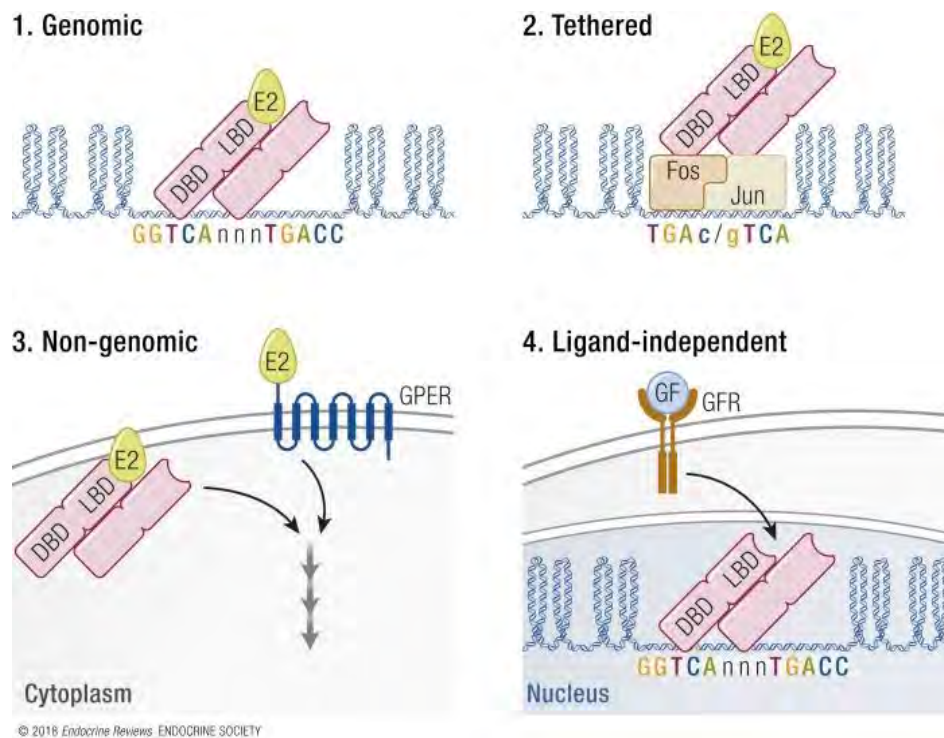
1.2.3.2. Άμεσες γενωμικές δράσεις

Οι δράσεις αυτές αποτελούν τον πιο κοινό μηχανισμό της οιστρογονικής σηματοδότησης. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αφού το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα μετατοπιστεί στον πυρήνα, δεσμεύεται άμεσα στη χρωματίνη και συγκεκριμένα σε ERE αλληλουχίες ενεργοποιώντας τη γονιδιακή μεταγραφή (Εικόνα 6.1) (Gurte, Pownall et al. 2015). Τα EREs αποτελούνται από ανάστροφες επαναλήψεις της αλληλουχίας 15 bp: 5'-AGGTCA_nnnnTGACCT-3' (n= οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο) (Schwabe, Charman et al. 1993, Klinge 2008, Kumar, Zakharov et al. 2011) και βρίσκονται κοντά στον υποκινητή είτε στον ενισχυτή του εκάστοτε γονιδίου στόχου της οιστρογονικής σηματοδότησης. Οι αλληλουχίες EREs παίζουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο, καθώς οι διαφορές στην κάθε αλληλουχία ERE καθορίζουν πρώτον τη διαφορετική συγγένεια σύνδεσης που εμφανίζει ο κάθε υπότυπος του ER με αυτή και δεύτερον τη στρατολόγηση διαφόρων συνενεργοποιητών και άλλων μεταγραφικών παραγόντων (Heldring, Pike et al. 2007, Kumar, Zakharov et al. 2011, Yasar, Ayaz et al. 2017).

1.2.3.3. Έμμεσες γενωμικές δράσεις

Από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι, παρόλο που τα EREs έχουν ταυτοποιηθεί σε αρκετές ρυθμιστικές περιοχές και σε αρκετούς υποκινητές γονιδίων, περισσότερο από το 33% των ανθρώπινων γονιδίων, που υπόκεινται ρύθμιση από τους υποδοχείς οιστρογόνων, δεν περιέχουν τις αλληλουχίες αυτές. Η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων αυτών γίνεται μέσω της «έμμεσης γενωμικής σηματοδότησης», η οποία περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση των ERs με μια πληθώρα άλλων μεταγραφικών παραγόντων και στοιχείων απόκρισης (Εικόνα 6.2) (O'Lone, Frith et al. 2004, Marino, Galluzzo et al. 2006).

Σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στην έμμεση γενωμική δράση των οιστρογόνων αποτελεί η διεγερτική πρωτεΐνη-1 (Stimulating Protein-1, SP-1), η οποία δεσμεύεται σε πλούσιες σε GC θέσεις υποκινητών και η δέσμευση αυτή ενισχύεται παρουσία των ERs. Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων, που η έκφρασή τους ρυθμίζεται από τον παραπάνω μηχανισμό, είναι τα γονίδια που κωδικοποιούν τον υποδοχέα της LDL και τον υποδοχέα-1α του ρετινοϊκού οξέος (Sun, Porter et al. 1998, Li, Briggs et al. 2001).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών της οιστρογονικής σηματοδότησης. Τα οιστρογόνα και οι υποδοχείς οιστρογόνων επιτελούν, μέσω μια πληθώρας μηχανισμών τις δράσεις τους, που ταξινομούνται στις εξής: άμεσες **(1)** και έμμεσες **(2)** γενωμικές δράσεις, στις οποίες οι ERs που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, αφού προσδεθούν με τα οιστρογόνα ή με κάποιον άλλο αγωνιστή τους, εισέρχονται ως ομο- ή ετεροδιμερή στον πυρήνα και δεσμεύονται στο DNA, είτε άμεσα σε αλληλουχίες EREs είτε έμμεσα μέσω των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 ή SP-1. Στόχος των δύο παραπάνω δράσεων είναι η ρύθμιση της γονιδιακής μεταγραφής. Άμεσες μη γενωμικές δράσεις **(3)**, στις οποίες τα οιστρογόνα δεσμεύονται με τους ERs της πλασματικής μεμβράνης και ενεργοποιούν έναν καταρράκτη σηματοδότησης που μπορεί να καταλήξει στη μεταγραφή των γονιδίων στόχων της οιστρογονικής σηματοδότησης, αλληλεπιδρώντας ή μη με τα παραπάνω μονοπάτια σηματοδότησης (1 και 2). Τέλος, δράσεις απουσία προσδέτη **(4)**, όπου οι ERs μπορούν να ενεργοποιηθούν και να επιτελέσουν τις δράσεις τους μέσω φωσφορυλίωσής τους από μια πληθώρα ρυθμιστικών μορίων, συμπεριλαμβανομένων των PKA, PKC, EGF, IGF1, TGFβ (Hewitt and Korach 2018). GF, Growth Factor; GFR, Growth Factor Receptor; DBD, LBD, Ligand-Binding Domain; DNA-Binding Domain.

Άλλος σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας, με τον οποίο οι πυρηνικοί ERs μπορούν να αλληλεπιδράσουν ώστε να ρυθμίσουν τη γονιδιακή μεταγραφή, αποτελεί η ενεργοποιός πρωτεΐνη-1 (Activator Protein-1, AP-1), μέσω της οποίας οι ERs ρυθμίζουν βασικές διεργασίες των κυττάρων όπως είναι η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση. Η δομή της AP-1 αποτελεί ετεροδιμερή που σχηματίζονται από πρωτεΐνες των ενεργοποιητικών μεταγραφικών παραγόντων (Activating Transcription Factors, ATFs) και / ή των οικογενειών c-Fos, c-Jun (Piu, Aronheim et al. 2001, Marino, Galluzzo et al. 2006). Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων γονιδίων, η έκφραση των οποίων επάγεται από τον ERα μέσω του παραπάνω μηχανισμού, είναι τα γονίδια της κυκλίνης D1, του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα-1 (Insulin-like Growth Factor-1, IGF1), του υποδοχέα του IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor, IGF1R), και άλλα (Marino, Galluzzo et al. 2006).

Μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας αποκάλυψαν επίσης ότι η σηματοδότηση των ERs (ERα και ERβ) διαφέρει και εξαρτάται από την ορμόνη-προσδέτη και τα στοιχεία απόκρισης που υπάρχουν στις θέσεις SP-1 ή AP-1. Μέσω των παραπάνω μηχανισμών και ανάλογα με τον υπότυπο του ER και τους μεταγραφικούς παράγοντες που βρίσκονται στο εκάστοτε κύτταρο και ιστό, τα οιστρογόνα ρυθμίζουν ποικιλοτρόπως τη γονιδιακή έκφραση [57, 62, 63]. (Liu, Albanese et al. 2002, Matthews and Gustafsson 2003, Marino, Galluzzo et al. 2006).

1.2.3.4. Άμεσες μη γενωμικές δράσεις

Εκτός των παραπάνω μηχανισμών, τα οιστρογόνα μπορούν να επάγουν και άμεσες δράσεις εκτός πυρήνα, καθώς μέσω ενεργοποίησης κινασών μπορούν να επάγουν *καταρράκτες* σηματοδότησης στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 6.3). Έμμεσο αποτέλεσμα του μηχανισμού αυτού είναι πολλές φορές και η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Αυτοί οι *καταρράκτες* σηματοδότησης μπορούν να ταξινομηθούν στα κάτωθι τέσσερα μονοπάτια σηματοδότησης: (1) φωσφολιπάση C / πρωτεϊνική κινάση C (Phospholipase C / Protein Kinase C, PLC / PKCs), (2) Ras/Raf/πρωτεϊνικές κινάσες που σχετίζονται με τους μικροσωληνίσκους (Microtubule Associated Protein Kinase, MAPK), (3) κινάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης τύπου III (Phosphatidylinositol 3 Kinase, PI3K)/Akt, (4) cAMP/ πρωτεϊνική κινάση A (Protein Kinase A, PKA) (Marino, Galluzzo et al. 2006). Κάποιοι απ' τους στόχους αυτού του μηχανισμού σηματοδότησης είναι το σύμπλοκο του NF-κΒ, ο μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται στα στοιχεία απόκρισης κυκλικού AMP (cyclic AMP (cAMP) response element

binding protein, CREB) και η πρωτεΐνη Elk-1 (ETS - like protein-1) (Bjornstrom and Sjoberg 2005, Marino, Galluzzo et al. 2006, Cavalcanti, Lucas et al. 2015). Επιπλέον, από αρκετές μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας έχει αποκαλυφθεί η συμμετοχή των ERα, ERβ και GPER1 στις άμεσες μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων (Marino, Galluzzo et al. 2006, Prossnitz and Barton 2011, Gupte, Pownall et al. 2015).

1.2.3.5. Δράσεις απουσία προσδέτη

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι και απουσία οιστρογόνων ή άλλων αγωνιστών τους, οι ERs μπορούν να ενεργοποιηθούν και να επιτελέσουν τις δράσεις τους μέσω φωσφορυλίωσής τους (Εικόνα 6.4) σε συγκεκριμένα αμινοξέα, π.χ. σερίνης και τυροσίνης. Αυτός ο ανεξαρτήτου προσδέτη μηχανισμός απαιτεί τη δράση ρυθμιστικών μορίων που είναι απαραίτητα για τη φωσφορυλίωση των ERs, όπως η PKA, η PKC, συστατικά του καταρράκτη φωσφορυλίωσης MAPK, φλεγμονώδεις κυτοκίνες (π.χ. ιντερλευκίνη-2), ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και πεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων του μετασχηματίζοντος αυξητικού παράγοντα - β (Transforming Growth Factor beta, TGFβ), του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF) και του IGF1 (Nilsson, Makela et al. 2001, Heldring, Pike et al. 2007, Hewitt and Korach 2018).

1.2.3.6. Σύγκλιση γενωμικής και μη δράσης

Επιπλέον, οι υποδοχείς οιστρογόνων μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση των γονιδίων στόχων τους και μέσω ενός μηχανισμού "μεταγραφικής διασταυρούμενης επικοινωνίας" (transcriptional cross-talk), που αποτελεί συνδυασμό των παραπάνω δράσεων (Bjornstrom and Sjoberg 2005, Marino, Galluzzo et al. 2006). Χαρακτηριστικό παράδειγμα γονιδίου, του οποίου η έκφραση υπόκειται σε ρύθμιση απ' το μηχανισμό αυτό, είναι το γονίδιο της κυκλίνης D1 (Marino, Galluzzo et al. 2006).

Ακολουθούν δύο μηχανισμοί «Σύγκλισης γενωμικής και μη δράσης» που έχουν προταθεί και είναι οι εξής:

A) αφού τα οιστρογόνα δεσμευτούν στους ERs αυτοί διμερίζονται και μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου συνδέονται με φωσφορυλιωμένους μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν

προκύπτει από τη σηματοδότηση του GPER1. Τα σύμπλοκα που προκύπτουν μπορούν να δεσμευτούν άμεσα είτε έμμεσα με το DNA (Bjornstrom and Sjoberg 2005).

B) η αλληλεπίδραση μεταξύ των GPER1 και του ERα ή/και του ERβ, που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη, ενεργοποιεί καταρράκτες κινασών που έχουν ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση των AP-1, NF-κB, CREB, Elk-1, του μεταγωγέα σήματος και ενεργοποιητή μεταγραφής (Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT) και άλλων μεταγραφικών παραγόντων καθώς και των ίδιων των υποδοχέων οιστρογόνων. Όλα τα παραπάνω φωσφορυλιωμένα μόρια μπορούν στη συνέχεια να αλληλεπιδράσουν με αλληλουχίες του DNA και να ρυθμίσουν τη γονιδιακή μεταγραφή (Bjornstrom and Sjoberg 2005).

1.2.3.7. Συνρρυθμιστές των υποδοχέων οιστρογόνων και μεταγραφικός έλεγχος

Εκτός από τις ρυθμιστικές οδούς που περιγράφηκαν παραπάνω, η μεταγραφική δραστηριότητα των υποδοχέων στεροειδών ορμονών μπορεί να ρυθμιστεί θετικά ή αρνητικά μέσω της παρουσίας συνενεργοποιητών είτε συνκαταστολέων αντίστοιχα. Οι συνρρυθμιστές αυτοί εμπλέκονται σε πολλά στάδια της διαδικασίας της γονιδιακής έκφρασης και κάποια από αυτά είναι η τροποποίηση και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, η έναρξη της μεταγραφής, η επιμήκυνση των αλυσίδων του RNA, το μάτισμα του mRNA, η μετάφραση του mRNA και η επεξεργασία του miRNA. Μέσω μιας ποικιλίας μηχανισμών, που αποτελούν θέμα συνεχούς έρευνας, οι συνρρυθμιστές αυτοί έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν τις δράσεις των ERs (Lonard and O'Malley B 2007).

1.3. Συμμετοχή των υποδοχέων οιστρογόνων σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις

1.3.1. Γενικές πληροφορίες

Οι ERs, ERα και ERβ, εμπλέκονται στη ρύθμιση αρκετών και πολύπλοκων φυσιολογικών διεργασιών στον άνθρωπο. Παρεκκλίσεις από τη φυσιολογική σηματοδότηση των οιστρογόνων μπορεί να οδηγήσουν στην πρόκληση μιας πληθώρας ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, των μεταβολικών και καρδιαγγειακών παθήσεων, του

νευροεκφυλισμού, της φλεγμονής και της οστεοπόρωσης (Jia, Dahlman-Wright et al. 2015). Ακολουθούν συνοπτικά πληροφορίες σχετικά με το ρόλο που διαδραματίζουν οι ERs στο νευρικό σύστημα (Ενότητα 1.3.2) και στον καρκίνο (Ενότητα 1.3.3), καθώς αποτελούν αντικείμενο μελέτης και της παρούσας εργασίας.

1.3.2. Υποδοχείς οιστρογόνων και νευρικό σύστημα

Τα οιστρογόνα διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του νευρικού συστήματος (Cui, Shen et al. 2013). Επίσης ασκούν νευροπροστατευτικές δράσεις, μέσω των πυρηνικών αλλά και των μεμβρανικών ERs. Κάποιες από αυτές τις δράσεις είναι η ρύθμιση των επιπέδων ROS και του ασβεστίου και η ρύθμιση των επιπέδων και της δράσης των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 (Arevalo, Azcoitia et al. 2015, Baez-Jurado, Rincon-Benavides et al. 2019, Saldanha 2020).

Από μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας παρατηρήθηκε διαφορετική κατανομή των ERs στον εγκεφαλικό ιστό, επιβεβαιώνοντας την πολυπλοκότητα της δράσης τους (Cui, Shen et al. 2013). Και οι δύο βασικοί υπότυποι των ERs, ER α και ER β , φαίνεται να ασκούν νευροπροστατευτική δράση, καθώς επάγουν την αύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων καταλάση και υπεροξειδίου της δισμουτάσης (SOD) του χαλκού/ψευδαργύρου (Cu/Zn SOD, SOD 1) και του μαγγανίου (MnSOD, SOD 2) (Ishihara, Takemoto et al. 2015) και τη μείωση του παράγοντα νέκρωσης όγκου άλφα (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF- α) και των προφλεγμονωδών παραγόντων ιντερλευκίνη (Interleukin, IL) -1 και -6 (IL-1, IL-6) (Strom, Theodorsson et al. 2011). Επιπρόσθετα οι ERs εμπλέκονται και σε αντιαποπτωτικές διεργασίες (Παράρτημα 1), καθώς μέσω της ενεργοποίησης των μονοπατιών σηματοδότησης PI3K ή του μονοπατιού των εξωκυττάρια σηματορρυθμιζόμενων κινασών 1/2 (Extracellular signal - Regulated Kinases 1/2, ERK1/2), αναστέλλουν την έκφραση του προαποπτωτικού μορίου BAD (Bcl-Associated Death promoter) και επάγουν την έκφραση του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2 (Arevalo, Azcoitia et al. 2015). Η επαγόμενη από τους ERs αύξηση των αντιαποπτωτικών και μείωση των προαποπτωτικών μορίων προστατεύει το μιτοχόνδριο από την υπερφόρτωση Ca²⁺, την ενεργοποίηση αποπόλωσης της μιτοχονδριακής μεμβράνης, την αύξηση της διαπερατότητάς της μέσω δημιουργίας πόρων σε αυτήν (permeability transition pore, PTP) και την επακόλουθη απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Cytochrome c, Cyt c) στο κυτοσόλιο (Strom, Theodorsson et al. 2011).

Τέλος, όσον αφορά τη δράση του ERβ στο νευρικό σύστημα, πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι αποτελεί ένας σημαντικό παράγοντα για τη διαφοροποίηση ντοπαμινεργικών νευρώνων και ολιγοδενδροκυττάρων, καθώς ρυθμίζει μόρια που εμπλέκονται στην κυτταρική προσκόλληση, στη δημιουργία των αξόνων και στα σηματοδοτικά μονοπάτια των υποδοχέων Notch και του γ-αμινοβουτυρικού οξέος (Gamma-AminoButyric Acid, GABA) (Varshney, Inzunza et al. 2017). Επίσης πιθανολογείται ότι και η E2 μπορεί να επάγει τη διαφοροποίηση ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες, μέσω των IGF-1 και ERβ, με ενεργοποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης PI3K/AKT (Li, Ding et al. 2017).

Απόπτωση

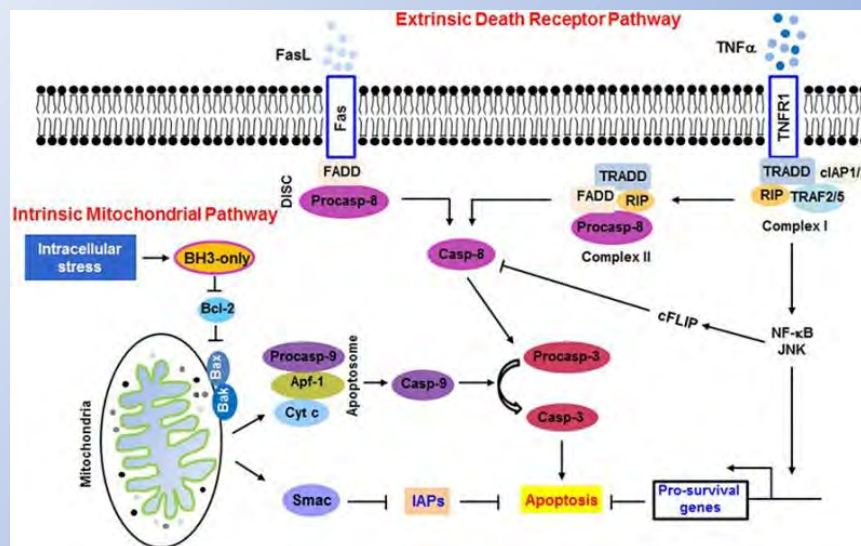
Η απόπτωση αποτελεί μια κυτταρική διεργασία ζωτικής σημασίας, καθώς διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση των ιστών κατά την ανάπτυξη αλλά και τη γήρανση. Η μη σωστή διεξαγωγή αυτής έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφόρων νευροεκφυλιστικών ασθενειών και τύπων καρκίνου (Elmore 2007). Αποτελεί μια ενεργειακά εξαρτώμενη κυτταρική διεργασία και κατά τη διεξαγωγή της επάγονται βιοχημικές και μορφολογικές μεταβολές στα κύτταρα (Cohen 1997). Οι βασικές μορφολογικές τροποποιήσεις που εμφανίζονται κατά την απόπτωση είναι η στρογγυλοποίηση του κυττάρου, η ανακατανομή των φωσφολιπιδίων της πλασματικής μεμβράνης, η αύξηση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, η συμπύκνωση του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος και τέλος ο κατακερματισμός του κυττάρου (Hacker 2000). Οι βιοχημικές αλλαγές που παρατηρούνται στα αποπτωτικά κύτταρα περιλαμβάνουν τη διάσπαση του DNA και των πρωτεϊνών, μέσω ενεργοποίησης πρωτεολυτικών κασπασών. Οι κασπάσες συναντώνται με τη μορφή ανενεργών προκασπασών και αφού ενεργοποιηθούν μπορούν να ενεργοποιήσουν άλλες κασπάσες και να οδηγήσουν, μέσω ενός μονοπατιού μεταγωγής σήματος, στον κυτταρικό θάνατο (Hengartner 2000, Elmore 2007). Η απόπτωση πραγματοποιείται μέσω δύο κύριων μονοπατιών: του εξωγενούς και του ενδογενούς ή μιτοχονδριακού (Elmore 2007), τα οποία απεικονίζονται στην Εικόνα 12 και ακολουθεί συνοπτική περιγραφή τους.

Το εξωγενές μονοπάτι ενεργοποιείται από προσδέτες των υποδοχέων θανάτου, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF- α . Η δέσμευση του προσδέτη FasL στον υποδοχέα Fas επάγει τη στρατολόγηση του πρωτεϊνικού ενδιάμεσου «προσαρμοστή» για τον υποδοχέα Fas - FADD (Fas - Associated protein with Death Domain) και της προκασπάσης 8 έτσι ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο σηματοδότησης που επάγει το θάνατο DISC (Death-Inducing Signaling Complex), το οποίο ενεργοποιεί την κασπάση 8 και αυτή με τη σειρά της επάγει την ενεργοποίηση άλλων κασπασών και κατ' επέκταση τον κυτταρικό θάνατο. Αντίθετα η δέσμευση του προσδέτη TNF- α στον υποδοχέα TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1, TNFR1) στρατολογεί τον πρωτεϊνικό ενδιάμεσο «προσαρμοστή» για τον υποδοχέα TNFR1 – TRADD (TNFR1 - Associated protein with Death Domain protein, TRADD), τις πρωτεϊνικές κινάσες που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς (Receptor - Interacting Protein kinases, RIP), τους παράγοντες που σχετίζονται με τον TNFR 2/5 (TNF Receptor Associated Factors 2/5, TRAF2/5) και τους κυτταρικούς αναστολείς των αποπτωτικών πρωτεϊνών 1/2 (cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins 1 and 2, cIAP1/2) έτσι ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο I, το οποίο, μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών NF- κ B και της c-Jun αμινοτελικής κινάσης (c-Jun N-terminal Kinase, JNK), επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων επιβίωσης (pro-survival genes). Ωστόσο, η τροποποίηση του RIP ή η αποικοδόμηση του cIAP1/2 μπορεί να οδηγήσει στη διάσπαση του συμπλόκου I με αποτέλεσμα το TRADD και το RIP να συμπλοκοποιηθούν με το FADD και την προκασπάση 8 και να σχηματίσουν το σύμπλοκο II, το λεγόμενο σύμπλοκο θανάτου (Zhou and Li 2015).

Το ενδογενές μονοπάτι ρυθμίζεται από πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (B-Cell Lymphoma-2) που ομαδοποιούνται ανάλογα με τη λειτουργία τους στις (1) αντιαποπτωτικές πρωτεΐνες (Bcl-xL, Bcl-2, κ.α.), (2) προαποπτωτικές πρωτεΐνες που διαμορφώνουν τους πόρους (Bax, Bad, Bak, κ.α.) και στις (3) προαποπτωτικές BH3-only πρωτεΐνες (Bid, Bim, Bik, Puma, Noxa) (Kale, Osterlund et al. 2018). Το ενδογενές μονοπάτι ενεργοποιείται από τις προαποπτωτικές BH3-only πρωτεΐνες κάτω από συνθήκες στρες. Οι BH3-only πρωτεΐνες αναστέλλουν τη δράση του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2, η οποία είναι να εξουδετερώνει τη δράση των προαποπτωτικών μορίων Bax και Bak. Τα ενεργοποιημένα πια προαποπτωτικά μόρια Bax και Bak, που βρίσκονται στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, οδηγούν στην απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (Cytochrome c, Cyt c) και του δεύτερου μιτοχονδριακά προερχόμενου ενεργοποιητή της κασπάσης (Second mitochondrial - derived activator of caspase, Smac). Το κυτταροπλασματικό πια κυτόχρωμα c συμπλοκοποιείται με τον αποπτωτικό

ενεργοποιητικό παράγων πρωτεάσης - 1 (Apoptotic protease activating factor-1, Apf-1) και την προκάσπαση 9 και σχηματίζουν το αποπτώσωμα. Αποτέλεσμα αυτού είναι η ενεργοποίηση της κασπάσης 9, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση και άλλων κασπασών, οδηγώντας το κύτταρο σε θάνατο. Επιπλέον το Smac μπορεί να ρυθμίσει την απόπτωση αναστέλλοντας τις πρωτεΐνες αναστολές της απόπτωσης (Inhibitor of Apoptosis Proteins, IAPs) (Zhou and Li 2015).

Από κάθε μονοπάτι ενεργοποιούνται διαφορετικές εναρκτήριες κασπάσες, κασπάση-8 και -9 αντίστοιχα, με τον ίδιο όμως τελικό στόχο που είναι η ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και ο κυτταρικός θάνατος (Elmore 2007).



Π.1.Εικ.1: Σχηματική αναπαράσταση των δύο μονοπατιών, εξωγενούς και ενδογενούς ή μιτοχονδριακού, της απόπτωσης. Το εξωγενές μονοπάτι ενεργοποιείται από προσδέτες των υποδοχών θανάτου της οικογένειας του παράγοντα νέκρωσης όγκου TNF, οι οποίοι στρατολογούν πρωτεΐνες για το σχηματισμό του συμπλόκου DISC ή/και του συμπλόκου II, σύμπλοκο θανάτου. Τα σύμπλοκα αυτά ενεργοποιούν πρωτεολυτικές κασπάσες, με εναρκτήρια την κασπάση 8, επάγοντας τον κυτταρικό θάνατο. Αντίθετα η ενεργοποίηση του συμπλόκου I από το εξωγενές μονοπάτι μπορεί να οδηγήσει στην επιβίωση του κυττάρου. Η ενεργοποίηση του ενδογενούς μονοπατιού επάγεται από πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2. Ειδικότερα, κάτω από συνθήκες στρες ενεργοποιούνται οι προαποπτωτικές BH3-only πρωτεΐνες, οι οποίες, μέσω αναστολής της δράσης του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2, ενεργοποιούν τα προαποπτωτικά μόρια Bax και Bak. Αυτά με τη σειρά τους απελευθερώνουν το Cyt c από το μιτοχόνδριο, το οποίο οδηγεί στο σχηματισμό του αποπτώσωματος, στην ενεργοποίηση πρωτεολυτικών κασπασών, με εναρκτήρια την κασπάση 9, και τέλος στον κυτταρικό θάνατο. Επίσης η απελευθέρωση του Smac από το μιτοχόνδριο μπορεί να ρυθμίσει την απόπτωση αναστέλλοντας τις πρωτεΐνες IAPs (Zhou and Li 2015). TNF, Tumor Necrosis Factor; TRADD, Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein; RIP, Receptor-Interacting Protein kinases; TRAF2/5, TNF Receptor Associated Factors-2/5; cIAP1/2, cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins 1 and 2; JNK, c-Jun N-terminal Kinase; FADD, Fas-Associated protein with Death Domain; DISC, Death-Inducing Signaling Complex; Bcl-2, B-cell lymphoma-2; Cyt c, Cytochrome c; Apf-1, Apoptotic protease activating factor-1; Smac, Second mitochondrial-derived activator of caspase; IAPs, Inhibitor of Apoptosis Proteins.

1.3.3. Υποδοχείς οιστρογόνων και καρκίνος

Ο έλεγχος του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε ορμονοεξαρτώμενους καρκίνους εξαρτάται τόσο από τον τύπο των κυττάρων όσο και από την έκφραση των υποδοχέων οιστρογόνων (GPER, ERα και ERβ), καθώς και των προϊόντων εναλλακτικού ματίσματος αυτών (Chimento, De Luca et al. 2022).

Πληθώρα βιβλιογραφικών δεδομένων υποστηρίζουν την εμπλοκή του ERα στους επαγόμενους από τα οιστρογόνα καρκίνους. Κάποια παραδείγματα καρκίνων, στους οποίους ο ERα διαδραματίζει κομβικό ρόλο κατά την ανάπτυξή τους, αποτελούν ο καρκίνος του προστάτη, των ωθηκών, του ενδομήτριου, του μαστού και των όρχεων. Μελέτες αποσιώπησης του γονιδίου του ERα φανερώνουν ότι ο υποδοχέας σχετίζεται τόσο με την εμφάνιση όσο και με την εξέλιξη του όγκου, όσον αφορά τον καρκίνο του προστάτη και του μαστού. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η αλληλεπίδραση του ERα με τα μονοπάτια σηματοδότησης IGFR1 και PI3K/AKT/ στόχος ραπαμυκίνης στα θηλαστικά (mammalian Target Of Rapamycin, mTOR) ενισχύει την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (Chimento, De Luca et al. 2022).

Αντίθετα, ο ERβ φαίνεται να ασκεί, ως επί το πλείστον, μια αντιπολλαπλασιαστική δράση (Chimento, De Luca et al. 2022) και μελέτες έχουν αναφέρει μειωμένα επίπεδα του ERβ σε καρκίνους του μαστού ή του προστάτη (Roger, Sahla et al. 2001, Cheng, Lee et al. 2004). Το σύμπλοκο E2/ERβ δεν ενεργοποιεί κανένα από τα συστατικά σηματοδότησης, τα οποία επάγουν την κυτταρική ανάπτυξη και ενεργοποιούνται από το σύμπλοκο E2/ERα. Επίσης υποστηρίζεται ότι σε κύτταρα καρκίνου του μαστού ο ERβ δημιουργεί ετεροδιμερή με τον ERα μειώνοντας τη μεταγραφική του δραστηριότητα και τις πολλαπλασιαστικές του δράσεις. Στον καρκίνο του προστάτη ο ERβ, εκτός της καταστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, έχει συσχετιστεί επίσης με επαγωγή διαφοροποίησης και απόπτωσης (Chimento, De Luca et al. 2022). Παρόμοιες δράσεις του ERβ παρατηρήθηκαν και σε καρκίνο του παχέος εντέρου (Saleiro, Murillo et al. 2012), όπου ο ERβ χρησιμοποιείται και ως μοριακός δείκτης για την πρόγνωσή του (Rudolph, Toth et al. 2012). Επίσης πειραματικά δεδομένα μελετών διερεύνησης του μηχανισμού δράσης του ERβ σε διάφορους τύπους καρκίνου, αποκάλυψαν ότι ο ERβ επάγει την απόπτωση (Παράρτημα 1) μέσω ρύθμισης των πρωτεϊνών IAPs, BAX και κασπάσης 3 και ενεργοποίησης του μονοπατιού NF-κΒ / Bcl-2 (Yang, Yang et al. 2019).

Επιπρόσθετα ο ERβ έχει συσχετιστεί με τη ρύθμιση της αυτοφαγίας. Η αυτοφαγία αποτελεί μια πολύπλοκη κυτταρική διεργασία (Παράρτημα 2 και 3) και ο ακριβής ρόλος που διαδραματίζουν οι υποδοχείς οιστρογόνων σε αυτή την κυτταρική διεργασία δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (Yang, Yang et al. 2019). Δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας υποστηρίζουν ότι ο ERβ επάγει την αυτοφαγία σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων μέσω ρύθμισης της έκφρασης των δεικτών αυτοφαγίας ελαφριά αλυσίδα 3 της πρωτεΐνης που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους (microtubule-associated protein Light Chain 3, LC3) και πρωτεΐνη σύνδεσης ουβικιτίνης (Sequestosome 1, P62/SQSTM1, P62), αναστολής του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR, και επαγωγής του μονοπατιού της ενεργοποιημένης κινάσης της 5'-μονοφωσφορικής αδενοσίνης (5' Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase, AMPK) (Yang, Yang et al. 2019). Στην ασθένεια λέμφωμα του Hodgkin καθώς και κάτω από γενετοξικές συνθήκες σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων, έχει αποδειχτεί ότι ο ERβ επάγει την αυτοφαγία μέσω αλληλεπίδρασης με το ρυθμιστή της αυτοφαγίας που ρυθμίζεται από βλάβες στο DNA 2 (DNA Damage Regulated Autophagy Modulator 2, DRAM2). Επιπλέον άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι ο ERβ επάγει την αυτοφαγία είτε επάγοντας την έκφραση της ομόλογης της τενσίνης φωσφατάσης (Phosphatase and TENsin homolog, PTEN), όσον αφορά το σεμίνωμα (κακοήθης όγκος των όρχεων), είτε ενεργοποιώντας το μονοπάτι σηματοδότησης PTEN/PI3K/AKT/mTOR, όσον αφορά φυσιολογικά κύτταρα νεφρού. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, αποτελέσματα μελετών φανερώνουν επίσης ότι ο ERβ μπορεί να αναστείλει την επαγόμενη από την υποξία αυτοφαγία, αναστέλλοντας το επαγόμενο από τον HIF-1α (επαγόμενος από την υποξία παράγοντα 1-α, Hypoxia - Inducible Factor 1-alpha) σηματοδοτικό μονοπάτι των πρωτεϊνών που περιέχουν BH3 περιοχή και αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 (Bcl-2 Interacting Protein 3, BNIP3). Τέλος και σε καρκίνο του πνεύμονα έχει παρατηρηθεί ότι ο ERβ μπορεί να αναστείλει την αυτοφαγία μέσω διατάραξης του συμπλόκου BAD – Bcl-2, καθώς ακολουθεί η απελευθέρωση του Bcl-2, το οποίο αναστέλλει τη δράση του ρυθμιστή της αυτοφαγίας Beclin 1 (BECN1) (Wei and Huang 2019).

Αυτοφαγία

Η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, αμινοξέων και αυξητικών παραγόντων, η γήρανση, οι γενετικές διαταραχές και η έκθεση σε διάφορες χημικές ουσίες και τοξίνες είναι κάποια από τα ερεθίσματα που πυροδοτούν την καταστροφή των κυττάρων. Η κυτταρική διαδικασία που είναι υπεύθυνη για τη στοχευμένη αποικοδόμηση ενδοκυτταρικών συστατικών ονομάζεται αυτοφαγία και πραγματοποιείται στα λυσοσώματα. Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι αυτοφαγίας: η αυτοφαγία που επάγεται από συνοδές πρωτεΐνες (Chaperone Mediated Autophagy, CMA), η μικροαυτοφαγία και η μακροαυτοφαγία (Bejarano and Cuervo 2010, Zhang 2013, Kocaturk and Gozuacik 2018).

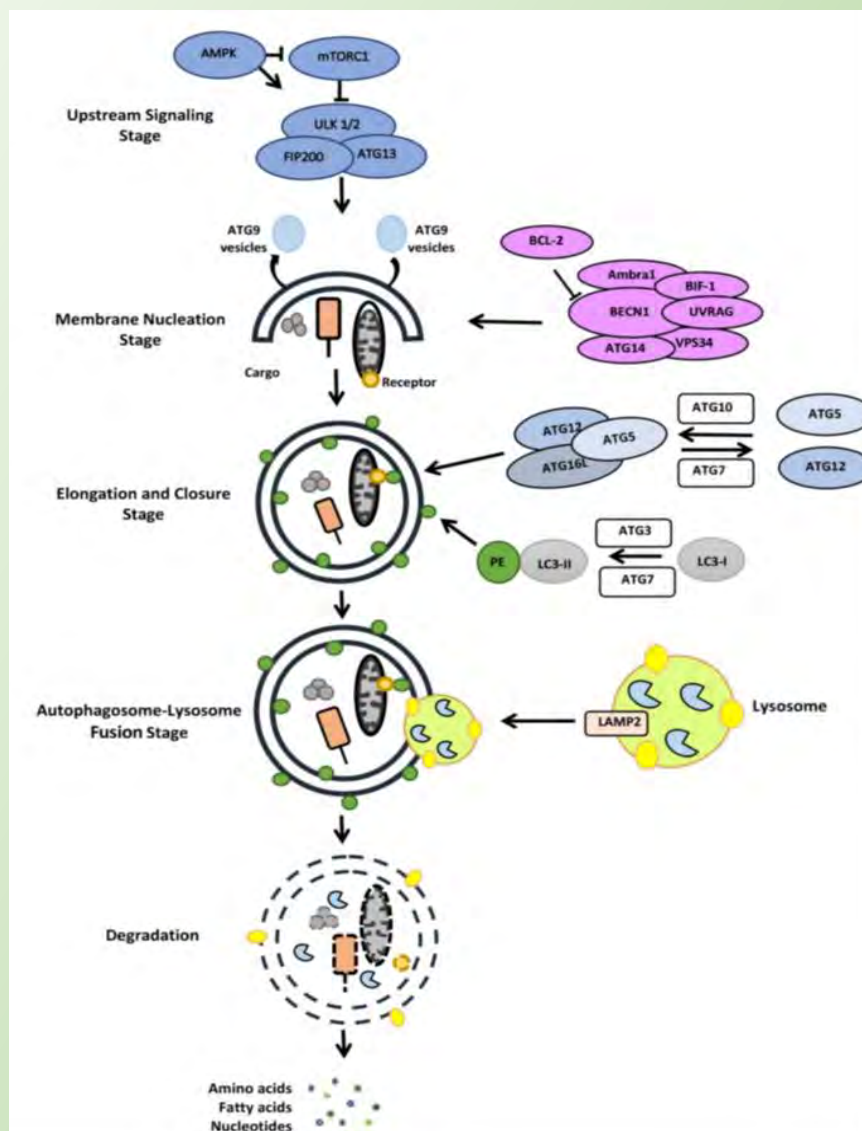
Όσον αφορά την επαγόμενη από συνοδές πρωτεΐνες αυτοφαγία, μεμονωμένες προς αποικοδόμηση κυτοσολικές πρωτεΐνες αναγνωρίζονται εξειδικευμένα από συγκεκριμένες συνοδές πρωτεΐνες, π.χ. HSP70, και μεταφέρονται στα λυσοσώματα (Bejarano and Cuervo 2010). Κατά τη διαδικασία της μικροαυτοφαγίας τα προς αποικοδόμηση συστατικά του κυτοσολίου συσσωρεύονται και περικλείονται σε σωληνάρια (tubules) ή εισέρχονται στα λυσοσώματα ύστερα από αλλοίωση των μεμβρανών των λυσοσωμάτων. Απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση της μικροαυτοφαγίας στα θηλαστικά ώστε να γίνει πλήρης γνωστός ο μοριακός μηχανισμός αυτής (Bejarano and Cuervo 2010). Τέλος η μακροαυτοφαγία, η οποία μελετήθηκε και στην παρούσα διδακτορική διατριβή, είναι η πιο μελετημένη μέθοδος αυτοφαγίας και αποτελεί τον πιο συχνό μηχανισμό αποικοδόμησης που πραγματοποιείται εντός των κυττάρων. Η μακροαυτοφαγία χαρακτηρίζεται από την «κατάποση» των προς αποικοδόμηση μορίων από κυστίδια διπλής μεμβράνης, που ονομάζονται αυτοφαγοσώματα, απομονώνοντας τα έτσι από τα υπόλοιπα συστατικά του κυτοσολίου (Bejarano and Cuervo 2010, Kocaturk and Gozuacik 2018). Τα αυτοφαγοσώματα μεταφέρονται στη συνέχεια από το σύστημα των μικροσωληνίσκων και συντήκονται με δευτερογενή λυσοσώματα σχηματίζοντας τα αυτολυσοσώματα. Σε αυτό το νέο διαμέρισμα, τα απομονωμένα μόρια αποικοδομούνται από τη δράση των λυσοσωμικών υδρολασών. Οι δομικές μονάδες που δημιουργούνται ύστερα από την υδρόλυση των μακρομορίων (π.χ. αμινοξέα από την αποικοδόμηση πρωτεϊνών) μεταφέρονται στη συνέχεια πίσω στο κυτταρόπλασμα και επαναχρησιμοποιούνται (Bejarano and Cuervo 2010, Kocaturk and Gozuacik 2018). Με το μηχανισμό της μακροαυτοφαγίας αποικοδομούνται εξειδικευμένα σύμπλοκα πρωτεϊνών και μη λειτουργικά οργανίδια αλλά όχι μεμονωμένες πρωτεΐνες (Hengartner 2000, Bejarano and Cuervo 2010). Ακολουθεί αναλυτικότερη περιγραφή του μηχανισμού της μακροαυτοφαγίας/αυτοφαγίας. Ανάλογα με τις ανάγκες των κυττάρων πραγματοποιείται είτε ανεξάρτητα ο κάθε παραπάνω μηχανισμός είτε και συντονισμών αυτών (Bejarano and Cuervo 2010).

Μονοπάτι Αυτοφαγίας

Το σύμπλοκο mTORC1 (mTOR Complex 1) αποτελεί τον πυρήνα ρύθμισης της αυτοφαγίας. Υπό κανονικές συνθήκες, το mTORC1 περιορίζει την αυτοφαγική δραστηριότητα καταστέλλοντας τη δράση του συμπλόκου της αυτοφαγίας ULK 1/2 (Unc-51 like κινάση ενεργοποίησης της αυτοφαγίας 1/2, Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1/2). Ο «αισθητήρας» της ενέργειας του κυττάρου AMPK, η υποξία και το μονοπάτι PI3K/AKT, που ενεργοποιείται σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, ρυθμίζουν άμεσα την αυτοφαγική δραστηριότητα καταστέλλοντας τη δράση του mTORC1 (Kocaturk and Gozuacik 2018, Folkerts, Hilgendorf et al. 2019).

Συνοπτικά τα στάδια της αυτοφαγίας απεικονίζονται στην Εικόνα 1 (Π.2.Εικ.1) και περιλαμβάνουν τα εξής. Το σύμπλοκο Beclin 1/ PI3K ελέγχει το στάδιο πυρήνωσης της μεμβράνης και τον αρχικό σχηματισμό φαγοφόρων. Η επιμήκυνση της μεμβράνης ξεκινάει με τη δράση των

πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αυτοφαγία (AuToPhaGy-related proteins, ATGs) -7 και -10, οι οποίες συμβάλουν στη δέσμευση των ATG12 με τις πρωτεΐνες ATG5. Στη συνέχεια στο διμερές ATG12-5 στρατολογείται η πρωτεΐνη ATG16L1 και τα σχηματιζόμενα ολιγομερή ATG12-5-16L1 χρησιμεύουν ως λιγάσες E3 που συζευγνύουν μόρια λιπιδίων στα ATG8. Οι συζευγμένες με λιπίδια πρωτεΐνες ATG8 συμβάλουν στην επιμήκυνση, στη διαστολή και στο κλείσιμο των μεμβρανών του αυτοφαγοσώματος (Kocaturk and Gozuacik 2018). Παράλληλα το LC3I, που έχει προκύψει από την πρωτεολυτική διάσπαση του LC3 από την ATG4, μεταφέρεται μέσω σύνδεσής του με την ATG7 στην ATG3 και σχηματίζεται το LC3II, ύστερα από σύζευξη του LC3I με το λιπίδιο φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (Phosphatidyl Ethanolamine, PE). Καθώς το αυτοφαγόσωμα επιμηκύνεται το LC3II εισέρχεται στην μεμβράνη του οδηγώντας στην ωρίμανσή του. Παράλληλα με τις παραπάνω διαδικασίες η πρωτεΐνη ρ62 απομονώνει τα προς αποικοδόμηση σύμπλοκα πρωτεϊνών και οργανίδια εντός του αυτοφαγοσώματος (Folkerts, Hilgendorf et al. 2019). Τέλος οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με το λυσόσωμα (Lysosome - Associated Membrane Protein -1 and -2, LAMP-1 and -2) επάγουν τη σύντηξη του λυσοσώματος με το ώριμο αυτοφαγόσωμα με αποτέλεσμα το σχηματισμό του αυτολυσοσώματος. Η αποικοδόμηση των συστατικών που περικλείει το αυτοφαγόσωμα πραγματοποιείται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα του λυσοσώματος (π.χ. λιπάσες, υδρολάσες, πρωτεάσες, νουκλεάσες). Οι δομικές μονάδες (π.χ. αμινοξέα, λιπαρά οξέα κ.λπ.), που έχουν προκύψει, αφού μεταφερθούν πίσω στο κυτταρόπλασμα μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν στις μεταβολικές διεργασίες των κυττάρων (Kocaturk and Gozuacik 2018, Folkerts, Hilgendorf et al. 2019).

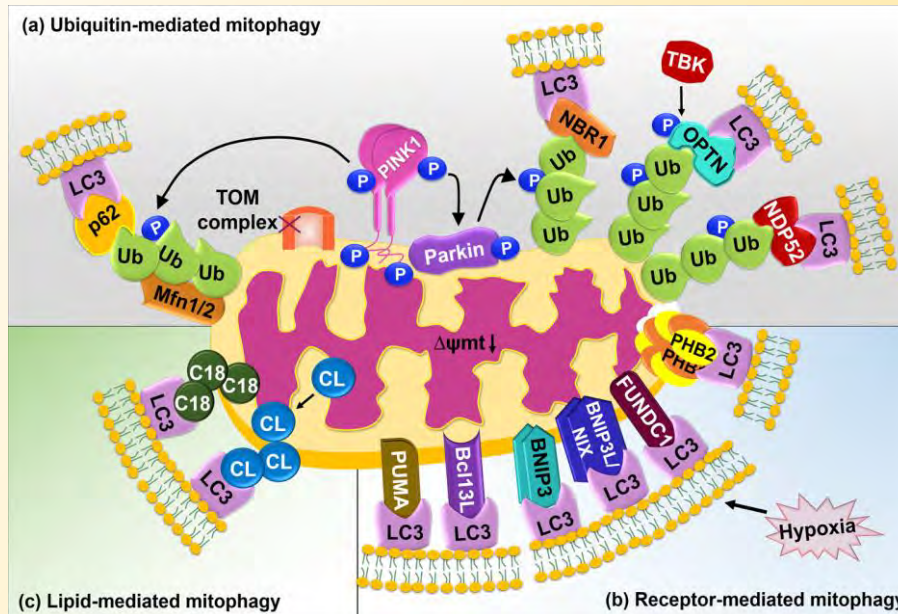


Π.2.Εικ.1: Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού της αυτοφαγίας. Κύριος ρυθμιστής της αυτοφαγίας αποτελεί το σύμπλοκο mTORC1, το οποίο κάτω από συνθήκες στρες ή έλλειψης θρεπτικών συστατικών καταστέλλεται οδηγώντας σε έναρξη του αυτοφαγικού μονοπατιού από το σύμπλοκο της αυτοφαγίας ULK1/2. Τα στάδια του μονοπατιού της αυτοφαγίας περιλαμβάνουν την πυρήνωση, την επιμήκυνση, τη διαστολή, το κλείσιμο των μεμβρανών και την ωρίμανση του αυτοφαγοσώματος. Παράλληλα με τα στάδια αυτά, τα προς αποικοδόμηση μόρια εισέρχονται εντός του αυτοφαγοσώματος και απομονώνονται. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η σύντηξη του λυσοσώματος με το ώριμο αυτοφαγόσωμα και ακολουθεί η αποικοδόμηση των μορίων που βρίσκονται σε αυτό. Τέλος οι δομικές μονάδες, που έχουν προκύψει, απελευθερώνονται, μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα και επαναχρησιμοποιούνται. Τα κυριότερα μόρια που είναι υπεύθυνα για τα παραπάνω στάδια απεικονίζονται στο σχήμα (Kocaturk and Gozuacik 2018). mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; AMPK, 5' AMP-activated protein kinase; ATG, autophagy-related gene; ULK1/2, Unc-51 like autophagy activating kinase; LC3, microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; PE, phosphatidylethanolamine; LAMP-1/2, lysosomal associated membrane protein 1/2.

Επιπρόσθετα είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η επιλεκτικότητα της αυτοφαγίας εξασφαλίζεται από τους υποδοχείς αυτοφαγίας, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να δεσμεύονται σε διάφορους τύπους φορτίου συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδρίων (π.χ. οι υποδοχείς OPTN (Optineurin), NDP52 (Nuclear Dot Protein 52), BNIP3L (Bcl-2 Interacting Protein 3 Like), FUNDC1 (FUN14 Domain - Containing protein 1)), των λυσοσωμάτων (π.χ. ο υποδοχέας p62), του ενδοπλασματικού δικτύου (π.χ. οι υποδοχείς Reticulon3) και των ενδοκυτταρικά ουβικιτυλιωμένων συσσωματωμάτων (π.χ. οι υποδοχείς p62, OPTN). Τέλος οι υποδοχείς αυτοφαγίας μπορούν να αναγνωρίσουν και βακτηριακούς εισβολείς (π.χ. οι υποδοχείς p62, OPTN, NDP52). Με αυτόν τον τρόπο, τα κύτταρα έχουν τον πλήρη έλεγχο του αριθμού των οργανιδίων τους, μπορούν να εξαλείψουν τα δυσλειτουργικά συστατικά αλλά και να απαλλαγούν από δυνητικά επιβλαβή συσσωματώματα και εισβολείς (Ke 2018, Kocaturk and Gozuacik 2018).

Μιτοφαγία

Η μιτοφαγία είναι η διαδικασία κατά την οποία τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια ενός κυττάρου αποικοδομούνται στα αυτοφαγοσώματα. Αποτελεί μια εξειδικευμένη διαδικασία καθώς εξαλείφονται μόνο τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την επαγωγή νέκρωσης ή απόπτωσης (Kubli and Gustafsson 2012). Τα κύρια μονοπάτια της μιτοφαγίας απεικονίζονται στην Εικόνα 1 (Π.3.Εικ.1).



Π.3.Εικ.1: Σχηματική αναπαράσταση των κύριων μηχανισμών της μιτοφαγίας. **(a)** Μεσολαβούμενη από την ουβικιτίνη μιτοφαγία. Η εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης, λόγω απώλειας του δυναμικού της, ενεργοποιεί το μονοπάτι PINK1 / Parkin. Η Parkin στρατολογεί διάφορους αυτοφαγικούς υποδοχείς, συμπεριλαμβανομένων των p62, OPTN, NDP52 και NBR1, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τη σειρά τους με το LC3 αποικοδομώντας το μιτοχόνδριο. **(b)** Μεσολαβούμενη από υποδοχείς μιτοφαγία. Κάτω από υποξικές συνθήκες επάγεται η άμεση αλληλεπίδραση των αυτοφαγικών υποδοχών BNIP3, BNIP3L/ NIX, FUNDC1, Bcl13L, PHB2 και PUMA, που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια, με το LC3 του αυτοφαγοσώματος. **(c)** Μεσολαβούμενη από τα λιπίδια μιτοφαγία, η οποία περιλαμβάνει μετατόπιση των λιπιδίων του μιτοχονδρίου στην εξωτερική του μεμβράνη και αλληλεπίδρασή τους με το LC3 του αυτοφαγοσώματος (Panigrahi, Praharaj et al. 2020). LC3, microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3; BNIP3, Bcl-2/adeno virus E1B 19 KDa protein interacting protein 3; P62 (P62/SQSTM1), Sequestosome 1; PINK1, PTEN-INDUCED Kinase 1; NBR1, NBR1 autophagy cargo receptor; OPTN, Optineurin; NDP52, Nuclear Dot Protein 52; PHB2, Prohibitin 2; FUNDC1, FUN14 Domain-Containing protein 1; BNIP3L, Bcl-2 Interacting Protein 3 Like; PUMA, p53-Upregulated Modulator of Apoptosis.

Το κύριο μονοπάτι που είναι υπεύθυνο για τη μιτοφαγία είναι το επαγόμενης απ' το PTEN κινάση 1 (PTEN - INDUCED Kinase 1, PINK1)/ Parkin. Η απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης είναι το ερέθισμα που προκαλεί τη συσσώρευση της πρωτεΐνης PINK1 στα μιτοχόνδρια, η οποία με τη σειρά της στρατολογεί την E3 λιγάση της ουβικιτίνης Parkin που ουβικιτινιλιώνει τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Kubli and Gustafsson 2012, Panigrahi, Praharaj et al. 2020). Οι στρατολογούμενοι από την Parkin αυτοφαγικοί υποδοχείς p62, OPTN, NDP52 και NBR1 (NBR1 autophagy cargo receptor) έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται ταυτόχρονα τόσο με τις ουβικιτιλιωμένες πρωτεΐνες του μιτοχονδρίου όσο και με το LC3 επάγοντας την αποικοδόμηση του μιτοχονδρίου (Parkin, Clausen et al. 2007, Panigrahi, Praharaj et al. 2020). Κάτω από συνθήκες στρες, παραδείγματος χάριν κάτω από υποξικές συνθήκες, ενεργοποιείται ένα δεύτερο μονοπάτι, που δρα ανεξάρτητα απ' την δράση της ουβικιτίνης, και παίζει επίσης καθοριστικό ρόλο στην μιτοφαγία. Στο συγκεκριμένο μονοπάτι συμμετέχουν οι πρωτεΐνες της οικογένειας ATG8 που αλληλεπιδρούν με τους αυτοφαγικούς μιτοχονδριακούς υποδοχείς BNIP3, BNIP3L/ NIX, FUNDC1, Bcl13L, PHB2 (Prohibitin 2) και PUMA

(p53 - Upregulated Modulator of Apoptosis), οι οποίοι διαθέτουν περιοχές αλληλεπίδρασης με το LC3 (LC3 Interacting Region, LIR) (Kubli and Gustafsson 2012, Panigrahi, Praharaaj et al. 2020). Επιπλέον τα παραπάνω μονοπάτια μπορούν να δράσουν και συνδυαστικά καθώς υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η έλλειψη του Parkin μειώνει τη δράση του BNIP3L και επιπλέον η υπερέκφραση του BNIP3L επάγει τη μιτοχονδριακή συσσώρευση του Parkin (Lee, Lee et al. 2011). Τέλος υπάρχει ένα ακόμη μονοπάτι μιτοφαγίας που επάγεται από τα λιπίδια του μιτοχονδρίου, τα οποία μετατοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και αλληλεπιδρούν με το LC3 μέσω των αντίστοιχων μοτίβων LIR που διαθέτουν (Panigrahi, Praharaaj et al. 2020).

Ακολουθούν κάποιες πληροφορίες που αφορούν την πρωτεΐνη BNIP3L, καθώς θα απασχολήσει στη συνέχεια της παρούσας διατριβής την ερμηνεία και συζήτηση των αποτελεσμάτων. Η BNIP3L ανήκει στις προαποπτωτικές BH3-only πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 και εδράζεται στην εξωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Αλληλεπιδρώντας με άλλα μέλη της οικογένειας Bcl-2, όπως με τα προαποπτωτικά μόρια BAD και BAX, αυξάνει τη διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης επάγοντας την απόπτωση. Επιπρόσθετα αποτελεί μιτοφαγικό υποδοχέα καθώς ένας από τους βασικούς ρόλους της είναι η επισήμανση των προς αποικοδόμηση μιτοχονδρίων. Από τη βιβλιογραφία έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί μέσω των οποίων η BNIP3L δρα ώστε να επάγει την αυτοφαγία, αλλά ο πιο καλά μελετημένος μηχανισμός δράσης της είναι, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μέσω αλληλεπίδρασής της με πρωτεΐνες της οικογένειας ATG8 και στη συνέχεια μέσω μιας περιοχής LIR που διαθέτει και η οποία αλληλεπιδρά με την LC3 επάγοντας τη στρατολόγηση του αυτοφαγοσώματος σε στοχευμένα μιτοχόνδρια (Li, Zheng et al. 2021). Επιπλέον η BNIP3L μπορεί να δεσμευτεί με το Bcl-2, μέσω της BH3 περιοχής, διασπώντας το σύμπλοκο Bcl-2- BECN1 και οδηγώντας σε απελευθέρωση του BECN1, το οποίο επάγει το σχηματισμό του αυτοφαγοσώματος. Ακόμη έχει αποδειχτεί ότι δύναται να αναστείλει τη σηματοδότηση του mTORC1 επάγοντας και πάλι την αυτοφαγία (Li, Zheng et al. 2021). Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κάτω από υποξικές συνθήκες έχει χαρακτηριστεί ως ογκογονίδιο, καθώς επάγει την καρκινογένεση (Li, Zheng et al. 2021) και είναι γνωστό από μια πληθώρα μελετών ότι η επαγωγή της έκφρασης και η ενεργοποίηση των μονοπατιών σηματοδότησης τόσο της BNIP3 όσο και της BNIP3L πραγματοποιείται μέσω της σηματοδότησης του HIF-1α (Killackey, Philpott et al. 2020, Panigrahi, Praharaaj et al. 2020, Li, Zheng et al. 2021, Poole and Macleod 2021). Παρόλο που σε μελέτες καρκίνου του παγκρέατος παρατηρήθηκαν αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα της BNIP3L και σχετίστηκαν με κακή πρόγνωση (Poole and Macleod 2021), έχει αναφερθεί σε διάφορους άλλους τύπους καρκίνου ότι τόσο τα αυξημένα όσο και τα μειωμένα επίπεδα της BNIP3L έχουν συσχετιστεί με αναστολή της καρκινογένεσης (Li, Zheng et al. 2021).

1.4. Μιτοχόνδριο και υποδοχείς οιστρογόνων

1.4.1. Γενικές πληροφορίες

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν τα εργοστάσια παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, καθώς παρέχουν περισσότερο από το 90% των ενεργειακών του απαιτήσεων μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας – οξειδωτικής φωσφορλίωσης (OXidative PHOSphorylation, OXPHOS). Επιπλέον στα μιτοχόνδρια πραγματοποιούνται σημαντικές μεταβολικές διεργασίες, όπως ο κύκλος του κιτρικού οξέος (TriCarboxylic Acid, TCA cycle) / κύκλος του Krebs, η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, η βιοσύνθεση της αίμης κ.α. (Psarra and Sekeris 2009). Επίσης αποτελούν βασικά συστατικά απόκρισης στο οξειδωτικό στρες, μέσω της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), στην κυτταρική διαφοροποίηση, στην ανοσορρύθμιση και στη γήρανση. Διαταραχές των μιτοχονδριακών λειτουργιών έχουν συσχετιστεί με πρόκληση νευρομυϊκών εκφυλιστικών ασθενειών, καθώς και με καρκίνο. Κατά συνέπεια, αυτά τα μοναδικά οργανίδια αποτελούν δέκτες και τελεστές πολλών ρυθμιστικών σημάτων ρυθμίζοντας μεταβολικές, αναπτυξιακές και αποπτωτικές διεργασίες (Psarra and Sekeris 2008, Psarra and Sekeris 2009).

Από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι η οιστραδιόλη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των μιτοχονδριακών λειτουργιών και συγκεκριμένα έχει αποδειχτεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, της μιτοχονδριακής βιογένεσης, της παραγωγής τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine TriPhosphate ATP), των συγκεντρώσεων ασβεστίου και της εξαρτώμενης από το μιτοχόνδριο απόπτωσης. Επίσης και οι ERs, μέσω των προαναφερθέντων δράσεων τους (Ενότητα 1.2.3), εμπλέκονται στις παραπάνω δράσεις της οιστρογονικής σηματοδότησης (Gupte, Pownall et al. 2015, Klinge 2017, Mahmoodzadeh and Dworatzek 2019, Klinge 2020, Beikoghli Kalkhoran and Kararigas 2022).

1.4.2. Μιτοχονδριακός εντοπισμός των υποδοχέων οιστρογόνων

Στα μιτοχόνδρια διαφόρων κυτταρικών τύπων και ιστών, π.χ. λεμφοκυττάρων, καρκινικών κυττάρων μαστού, εγκεφάλου, σπερματοκυττάρων, κ.α., έχουν εντοπιστεί αρκετοί πυρηνικοί υποδοχείς, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων οιστρογόνων, γλυκοκορτικοειδών, θυρεοειδικών ορμονών και ανδρογόνων. Ο ακριβής χαρακτηρισμός των δράσεων των υποδοχέων στα μιτοχόνδρια και η αποσαφήνιση του βιοχημικού μηχανισμού επιτέλεσης αυτών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και αποτελεί αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητικών ομάδων (Klinge 2008, Psarra and Sekeris 2008, Klinge 2017).

Παρόλο που και οι δύο ERs, ERα και ERβ, έχουν εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια κυττάρων καρκίνου του μαστού MCF-7, ηπατοκαρκινώματος HepG2, ανθρώπινων σπερματοκυττάρων και ανθρώπινου εμβρυϊκού ανδρικού καφέ λιπώδους ιστού, ο ERβ έχει εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια και μιας πληθώρας άλλων κυτταρικών τύπων και ιστών, όπως στην ωοθήκη και μήτρα κουνελιού, στους πρωτογενείς νευρώνες αρουραίου, στον υπόκαμπο αρουραίου, σε επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα και του εγκεφάλου ποντικού, σε πρωτογενή καρδιομυοκύτταρα, σε ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος SaOS-2, σε ανθρώπινα καρδιακά και επιθηλιακά κύτταρα μαστού, σε ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y, κ.α. (Chen, Yager et al. 2005, Klinge 2017).

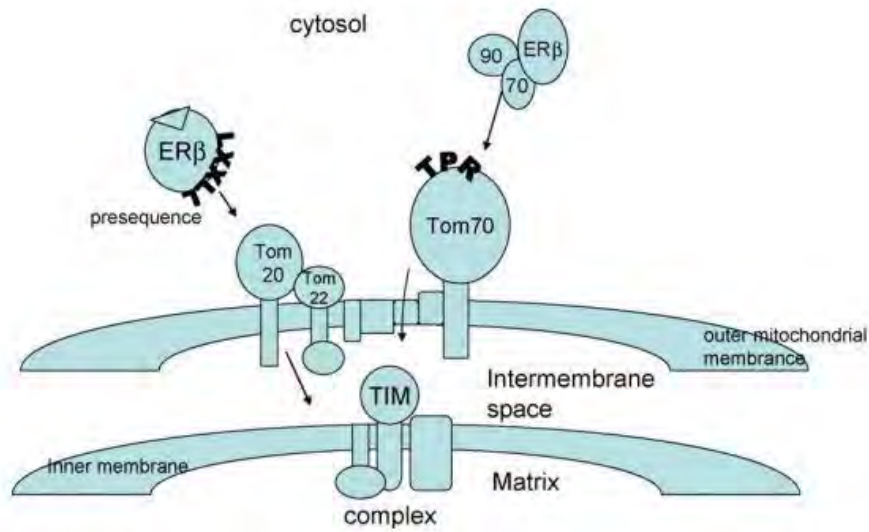
Τα μέχρι σήμερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο μιτοχονδριακά εντοπισμένος ERβ (mitochondrial ERβ, mtERβ) παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση μιας ποικιλίας μιτοχονδριακών λειτουργιών (Liao, Tzeng et al. 2015, Ventura-Clapier, Piquereau et al. 2019), αναλυτικότερα στις ενότητες 1.5.3. και 1.6., ο ακριβής χαρακτηρισμός των μηχανισμών αυτών δράσης του μιτοχονδριακού ERβ παραμένει υπό διερεύνηση.

1.4.3. Είσοδος του ERβ στο μιτοχόνδριο

Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 1.4.2, πολλοί πυρηνικά κωδικοποιούμενοι υποδοχείς στεροειδών ορμονών, συμπεριλαμβανομένων και των υποδοχέων οιστρογόνων, έχουν εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια μια πληθώρας κυττάρων. Στην παρούσα ενότητα θα αναφερθούν οι προτεινόμενοι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι πρωτεΐνες αυτές, και ειδικότερα ο ERβ που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή, μπορούν να εισέλθουν σε αυτό.

Η κλασική οδός εισαγωγής μια πρωτεΐνης στο μιτοχόνδριο είναι μέσω του συμπλόκου της μετατοπάσης της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Translocase of the mitochondrial Outer Membrane, TOM), που περιλαμβάνει αρκετές πρωτεΐνες, με κύριες τις Tom20 και Tom70 (Wiedemann and Pfanner 2017). Η πρωτεΐνη Tom20 αναγνωρίζει τις προ-πρωτεΐνες που φέρουν πεπτίδια-οδηγούς (leaders peptides) ή αλληλουχία-σηματοδότησης στο αμινοτελικό τους άκρο με στόχο τη μήτρα του μιτοχονδρίου, ενώ η Tom70 αναγνωρίζει υδροφοβικές προ-πρωτεΐνες (Bhango, Tzankov et al. 2007), οι οποίες, προκειμένου να διατηρήσουν την διαλυτότητα τους, είναι δεσμευμένες με τις ATP-εξαρτώμενες HSP-70 και -90 και συνδέονται με τη αμινοτελική περιοχή της Tom70 (Young, Hoogenraad et al. 2003) και κατά την είσοδο τους στο μιτοχόνδριο αλληλεπιδρούν και με τη C-τελική περιοχή της Tom70 (Bhango, Tzankov et al. 2007). Το σύμπλοκο TOM σε συνδυασμό με τη μετατοπάση της εσωτερικής μεμβράνης (Translocase of the Inner Membrane, TIM) καθιστούν δυνατή τη μεταφορά των παραπάνω πρωτεϊνών εντός της μήτρας του μιτοχονδρίου (Wiedemann and Pfanner 2017).

Στην Εικόνα 7 απεικονίζονται δύο οδοί πιθανής εισόδου του ERβ στο μιτοχόνδριο, με κοινό παρονομαστή το σύμπλοκο TOM. Ο συμπλοκοποιημένος ERβ με τον προσδέτη του αναγνωρίζεται και δεσμεύεται από τις Tom20/Tom22, μέσω του μοτίβου LXXLL (όπου L λευκίνη) που βρίσκεται στην περιοχή σύνδεσης του προσδέτη, και στη συνέχεια μεταφέρεται κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης στην εσωτερική μεμβράνη μιτοχονδρίου. Εναλλακτική οδός εισόδου του αποτελεί η Tom70, η οποία αναγνωρίζει τον ERβ απουσία προσδέτη καθώς είναι δεσμευμένος με τις συνοδές πρωτεΐνες HSP70 και HSP90. Οι HSP70 και HSP90 προσαρτώνται σε τετρατικοπεπτιδικά επαναλαμβανόμενα μοτίβα (Tetratricopeptide Repeat Motifs, TRP) του Tom70 και μεταφέρονται, μαζί με τον υποδοχέα, στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Και στις δύο περιπτώσεις εισόδου του, ο ERβ καταλήγει στο σύμπλοκο TIM μέσω του οποίου εισέρχεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου (Simpkins, Yang et al. 2008). In silico μελέτες διεθνούς βιβλιογραφίας υποδεικνύουν την ύπαρξη αλληλουχίας μιτοχονδριακής στόχευσης στο εσωτερικό του ERβ (Chen, Delannoy et al. 2004, Chen, Eshete et al. 2004, Psarra, Solakidi et al. 2006).

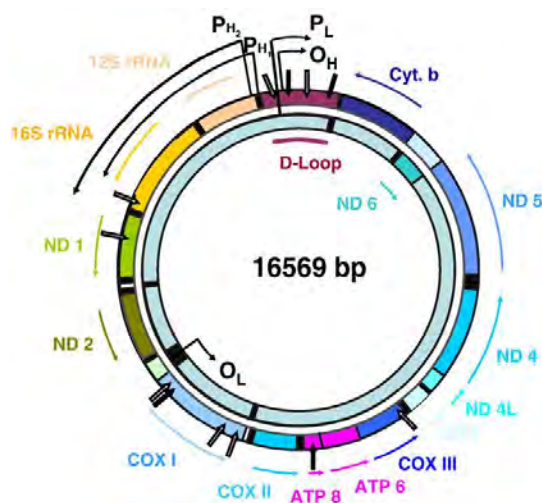


Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της πιθανής εισόδου του ERβ στα μιτοχόνδρια μέσω του συμπλόκου TOM. Απουσία προσδέτη ο ERβ είναι δεσμευμένος με τις HSP70/90 οι οποίες μπορούν να δεσμευτούν με τα TRP του Tom70, ενώ παρουσία προσδέτη το σύμπλοκο ERβ-προσδέτης αναγνωρίζεται, μέσω του μοτίβου LXXLL, από τις Tom20/Tom22. Και στις δύο πιθανές οδούς εισόδου ο ERβ αφού περάσει διαμέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης αναγνωρίζεται από το σύμπλοκο TIM και μέσω αυτού εισέρχεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου (Simpkins, Yang et al. 2008). TOM, Translocase of the mitochondrial Outer Membrane; HSP70/90, Heat Shock Proteins 70/90; TRP, Tetratricopeptide Repeat Motifs; TIM, Translocase of the mitochondrial Inner Membrane.

1.5. Μιτοχονδριακή μεταγραφή

1.5.1. Μιτοχονδριακό γονιδίωμα

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (mitochondrial DNA, mtDNA) (Εικόνα 8) των θηλαστικών είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο 16,569 βάσεων (bp). Οι δύο αλυσίδες του μιτοχονδριακού DNA αποτελούνται από πουρίνες και πυριμιδίνες σε άνιση κατανομή, παράγοντας έτσι τη βαριά (Heavy, H) και την ελαφριά (Light, L) αλυσίδα. Η ελαφριά αλυσίδα μεταγράφεται από τον υποκινητή PL (Light strand Promoter), ενώ η βαριά αλυσίδα από τους γειτονικούς υποκινητές PH1 και PH2 (Heavy strand Promoters 1 and 2). Όλοι οι υποκινητές εδράζονται σε μια ρυθμιστική περιοχή η οποία αποτελείται από έναν εκτοπισμένο βρόχο (Displacement-Loop, D-Loop) (Εικόνα 8). Η εξαρτώμενη από τους PH2 και PL υποκινητές μεταγραφή παράγει μεγάλα πολυκιστρονικά μόρια mRNA, ενώ η εξαρτώμενη από τον PH1 υποκινητή μεταγραφή παράγει 2 ριβοσωμικά RNAs (ribosomal RNAs, rRNAs) (Psarra and Sekeris 2008, Psarra and Sekeris 2009).



Εικόνα 8: Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών. Με λευκά και μαύρα βέλη απεικονίζονται οι θέσεις που εμφανίζουν ομοιότητα με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των στοιχείων απόκρισης σε στεροειδείς και θυρεοειδείς ορμόνες, αντίστοιχα (Psarra and Sekeris 2009).

12 rRNA and 16S rRNA, 12S and 16S ribosomal RNAs; COX I-IV, Cytochrome c Oxidase subunit I-IV; ND 1-6 and ND 4L, NADH Dehydrogenase subunit 1-6 and 4L; ATP 6 and ATP 8, ATP synthase subunit -6 and -8.

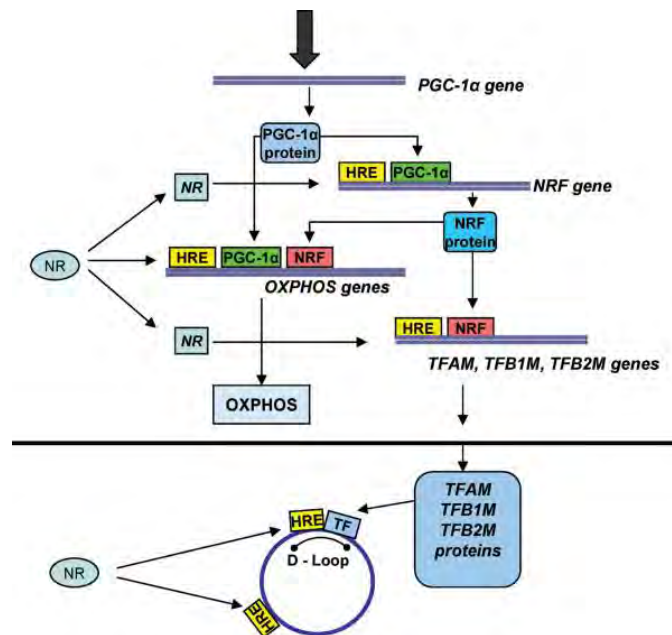
Η μιτοχονδριακή μεταγραφή, όπως και άλλες μιτοχονδριακές λειτουργίες, πραγματοποιείται ύστερα από τον αναγκαίο συντονισμό του μιτοχονδρίου με τον πυρήνα (Psarra and Sekeris 2009). Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι η μιτοχονδριακή πολυμεράση (RNA POLYmerase Mitochondrial, POLRMT), οι μιτοχονδριακοί μεταγραφικοί παράγοντες A, B1 και B2 (Mitochondrial Transcription Factor A/B1/B2, TFAM/TFB1M/TFB2M), στοιχεία απαραίτητα για την υλοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, κωδικοποιούνται από τον πυρήνα (Scarpulla 2006, Gustafsson, Falkenberg et al. 2016). Επιπλέον και αρκετές υπομονάδες OXPHOS είναι πυρηνικά κωδικοποιούμενες (Psarra and Sekeris 2009). Συγκεκριμένα μόνο οι 13 από τις 80 πρωτεΐνες των συμπλόκων I, II, III, IV και V της

αναπνευστικής αλυσίδας κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Chen, Yager et al. 2005) και περιλαμβάνουν τρεις υπομονάδες (I, II, III) της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (Cytochrome c Oxidase subunit I-III, COX I-III), επτά υπομονάδες (1-6 και 4L) της αφυδρογονάσης του NADH (NADH Dehydrogenase 1-6 and 4L, ND1-6 and ND 4L), δύο υπομονάδες (6 και 8) της ATP συνθάσης (ATP synthase subunits -6 and -8, ATP 6 and ATP 8) και μια του Cyt b. Τέλος, από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα κωδικοποιούνται δύο rRNAs (12S and 16S rRNAs) και 22 tRNAs (Chen, Yager et al. 2005, Bonawitz, Clayton et al. 2006, Psarra and Sekeris 2008, Psarra and Sekeris 2009).

1.5.2. Μιτοχονδριακή μεταγραφή και ρύθμιση της βιοσύνθεσης των OXPHOS από τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών

Είναι γνωστό απ' τη βιβλιογραφία ότι αρκετές ορμόνες και οι αντίστοιχοι πυρηνικοί υποδοχείς τους παίζουν καθοριστικό ρόλο στην άμεση ή έμμεση ρύθμιση της μεταγραφής των πυρηνικά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στη ρύθμιση της λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας – OXPHOS. Όμως εκτός αυτού, οι στεροειδείς ορμόνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στο συντονισμό της συνεργασίας μεταξύ του πυρήνα και του μιτοχονδρίου, ρυθμίζοντας έμμεσα τη μιτοχονδριακή μεταγραφή και κατ' επέκταση τη μεταγραφή των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS. Ο μηχανισμός δράσης τους απεικονίζεται στην Εικόνα 9 και περιλαμβάνει, ενεργοποίηση της πυρηνικής μετατόπισης των αντίστοιχων πυρηνικών υποδοχέων, δέσμευση αυτών στα στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (Hormone Response Elements, HREs) του πυρηνικού γονιδιώματος, τα οποία εδράζουν στους υποκινητές των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων NRF1/2 (Nuclear Respiratory Factors 1/2) και PGC-1α (Peroxisome proliferator - activated receptor Gamma - Coactivator 1 alpha), επάγοντας έτσι τη σύνθεσή τους. Ο πυρηνικός αναπνευστικός μεταγραφικός παράγοντας NRF1/2 ρυθμίζει άμεσα τη μεταγραφή τόσο των πυρηνικά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS όσο και των πυρηνικά κωδικοποιούμενων μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων TFAM, TFB1M και TFB2M, οι οποίοι με τη σειρά τους μετατοπίζονται στο μιτοχόνδριο και ρυθμίζουν τη μεταγραφή των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS. Ο υποδοχέας PGC-1α μπορεί να ρυθμίζει άμεσα τη μεταγραφή κάποιων πυρηνικά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS αλλά και έμμεσα τη μεταγραφή κάποιων πυρηνικά και μιτοχονδριακά

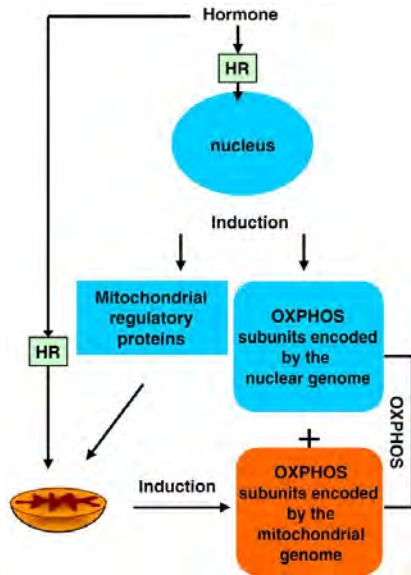
κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS, επάγοντας τη μεταγραφή του μεταγραφικού παράγοντα NRF (Psarra and Sekeris 2008, Scarpulla 2012, Scarpulla, Vega et al. 2012).



Εικόνα 9: Η ρύθμιση των πυρηνικά και μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS από τους υποδοχείς στεροειδών και θυροειδών ορμονών. Μέσω δέσμευσης των υποδοχέων στα HREs του πυρηνικού γονιδιώματος επάγεται η έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων PGC-1α και NRF, οι επάγουν στη συνέχεια, έμμεσα ή άμεσα αντίστοιχα, την έκφραση των πυρηνικά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS και έμμεσα την έκφραση των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS, μέσω επαγωγής της έκφρασης των πυρηνικά κωδικοποιούμενων TFAM, TFB1M και TFB2M (Psarra and Sekeris 2008). NR, Nuclear Receptor; HRE, Hormone Response Element; PGC-1α, Peroxisome proliferator - activated receptor Gamma - Coactivator 1 alpha; NRF, Nuclear Respiratory Factors; TFAM, Mitochondrial Transcription Factor A; TFB1M/TFB2M, Mitochondrial Transcription Factor B1/B2; TF, Transcription Factor.

Συνοψίζοντας, στην Εικόνα 10 παρατηρούμε ότι οι ορμόνες μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων τους επάγουν την έκφραση των πυρηνικά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS και δεύτερον επάγουν την έκφραση των πυρηνικά κωδικοποιούμενων μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι μεταφερόμενοι στα μιτοχόνδρια ενεργοποιούν τη μιτοχονδριακή μεταγραφή και την έκφραση των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS (Psarra and Sekeris 2009). Όμως λαμβάνοντας υπόψη το μιτοχονδριακό εντοπισμό των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, ενότητα 1.4.2., συμπεραίνουμε ότι οι στεροειδείς ορμόνες έχουν την δυνατότητα να επηρεάσουν και άμεσα τη μιτοχονδριακή μεταγραφή (Εικόνα 10), μέσω σύνδεσης του συμπλόκου ορμόνης-υποδοχέα σε πιθανές ειδικές ορμονοεξαρτώμενες αλληλουχίες, που έχουν εντοπιστεί στο μιτοχονδριακό DNA (Εικόνα 8) (Sekeris 1990, Demonacos, Karayanni et al. 1996, Chen, Eshete et al. 2004, Psarra and Sekeris 2009). Η άποψη αυτή ενισχύεται περαιτέρω από το γεγονός

ότι αρκετοί πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες, που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών, μετατοπίζονται στα μιτοχόνδρια, συμπεριλαμβανομένων των NF-κB, p53, CREB, STAT1, STAT3, STAT5, και συμβάλουν στη μεταγραφή του mtDNA (Psarra and Sekeris 2008, Psarra and Sekeris 2009, Leigh-Brown, Enriquez et al. 2010, Simpkins, Yi et al. 2010, Klinge 2017, Sepuri, Tammineni et al. 2017).

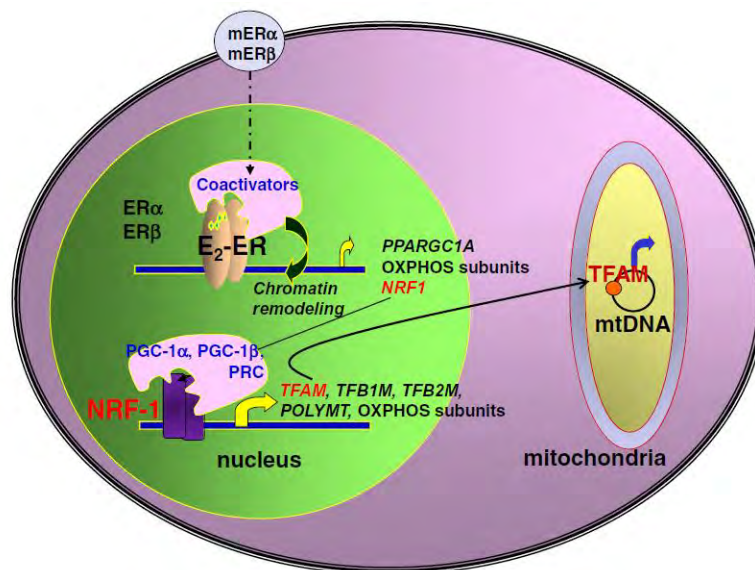


Εικόνα 10: Δράση των στεροειδών και θυροειδών ορμονών, μέσω των αντίστοιχων υποδοχών τους, στην πυρηνική και μιτοχονδριακή βιοσύνθεση των OXPPOS. Το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα επάγει την έκφραση τόσο των πυρηνικά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPPOS όσο και των πυρηνικά κωδικοποιούμενων μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι ύστερα από την μετατόπισή τους στο μιτοχόνδριο επάγουν την έκφραση των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPPOS. Όμως, προτείνεται ότι και οι ίδιες οι ορμόνες, μέσω των αντίστοιχων υποδοχών τους που εντοπίζονται στο μιτοχόνδριο, μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη μιτοχονδριακή μεταγραφή μέσω δέσμευσης των υποδοχών τους στα αντίστοιχα HREs που έχουν εντοπιστεί στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Psarra and Sekeris 2009). HR, Hormone Receptors.

1.5.3. Μιτοχονδριακή μεταγραφή και ρύθμιση της βιοσύνθεσης των OXPPOS από τους υποδοχείς οιστρογόνων

Απ' τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι οι πυρηνικοί ERs, ERα και ERβ, ρυθμίζουν έμμεσα τη μιτοχονδριακή μεταγραφή, καθώς, όπως βλέπουμε στην Εικόνα 11, έχει βρεθεί ότι επάγουν την έκφραση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NRF1, ο οποίος με τη σειρά του επάγει την έκφραση του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα TFAM (Klinge 2008, Mattingly, Ivanova et al. 2008, Chen, Cammarata et al. 2009). Επίσης και οι μεμβρανικοί ERs (Εικόνα 11), μέσω ποικίλων μονοπατιών, επάγουν φωσφορυλίωση και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις σε διάφορους συνρρυθμιστές, ελέγχοντας έμμεσα, μέσω επαγωγής της έκφρασης του NRF1, τόσο τη μιτοχονδριακή μεταγραφή όσο και την έκφραση των πυρηνικά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPPOS (Klinge 2017). Τέλος αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι ERs επάγουν την έκφραση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα PGC-1α ρυθμίζοντας έμμεσα την έκφραση των πυρηνικά και μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων OXPPOS (Hsieh, Yang et al. 2005, Hsieh, Choudhry et al. 2006). Συμπερασματικά οι

μεμβρανοί και πυρηνικοί ERs μπορούν, μέσω μια ποικιλίας μηχανισμών, να ρυθμίσουν έμμεσα τη μιτοχονδριακή μεταγραφή.



Εικόνα 11: Μηχανισμοί έμμεσης ρύθμισης της μιτοχονδριακής μεταγραφής από τους ERs. Τόσο οι μεμβρανοί όσο και οι πυρηνικοί ERs ρυθμίζουν την έκφραση πυρηνικών και μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων, ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο έμμεσα τη μιτοχονδριακή μεταγραφή (Klinge 2017). mERα/β, membrane Estrogen Receptor α/β; TFAM, Mitochondrial Transcription Factor A; NRF1, Nuclear Respiratory Factor 1.

Η υπόθεση της άμεσης ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής από τους ERs υποστηρίζεται από το γεγονός ότι τόσο ο μιτοχονδριακός ERα όσο και ο mtERβ έχουν εντοπιστεί σε μιτοχόνδρια πολλών τύπων κυττάρων και ιστών, με τον mtERβ να φαίνεται να παίζει ένα πιο καθοριστικό ρόλο στο συγκεκριμένο οργανίδιο (Chen, Yager et al. 2005, Liao, Tzeng et al. 2015, Klinge 2017, Ventura-Clapier, Piquereau et al. 2019). Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την επαγόμενη από τον mtERβ ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής. Η δράση αυτή του mtERβ πιθανόν να επιτελείται είτε με άμεση δέσμευσή του στα μιτοχονδριακά EREs (mitochondrial EREs, mtEREs) της περιοχής D-loop του mtDNA (Sekeris 1990, Chen, Eshete et al. 2004, Song, Jeong et al. 2019), είτε έμμεσα μέσω αλληλεπίδρασής του με μεταγραφικούς παράγοντες που εδράζονται στο μιτοχόνδριο, όπως ο CREB (Fujimoto, Hirose et al. 1999, Cue, Diaz et al. 2015).

1.6. Δράσεις μιτοχονδριακού ERβ (mtERβ)

Συνοψίζοντας, στις προηγούμενες ενότητες είδαμε ότι ο mtERβ έχει εντοπιστεί σε πληθώρα ιστών και κυττάρων και υποστηρίζεται ότι πιθανόν να εμπλέκεται στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής καθώς και διαφόρων άλλων μιτοχονδριακών λειτουργιών. Η διερεύνηση των μηχανισμών δράσης του στο συγκεκριμένο οργανίδιο αποτελεί αντικείμενο συνεχούς έρευνας και βασικό αντικείμενο μελέτης και της παρούσας εργασίας. Ακολουθεί περιγραφή των κυριότερων δράσεων του mtERβ που γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία.

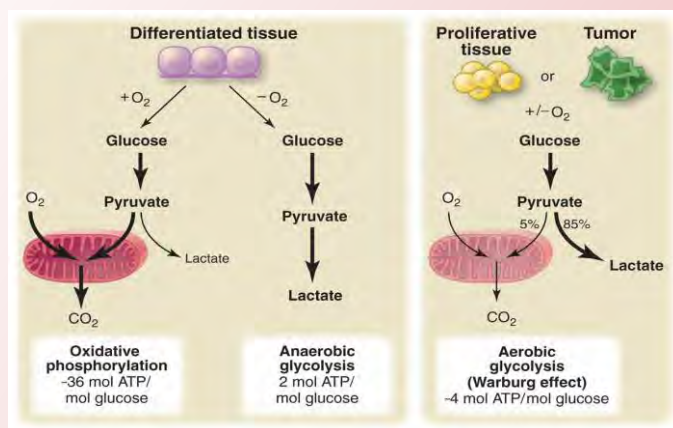
Τα μέχρι σήμερα πειραματικά δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας συσχετίζουν τον mtERβ με την ενεργοποίηση αντιαποπτωτικών μονοπατιών, καθώς έχει αποδειχτεί ότι αναστέλλει τη λειτουργία του προαποπτωτικού μορίου BAD, διαταράσσοντας κατ' επέκταση την αλληλεπίδραση του BAD με τα αντιαποπτωτικά μόρια Bcl-xl και Bcl-2 και αναστέλλοντας την απελευθέρωση του Cyt c από το μιτοχόνδριο. Επιπρόσθετα ο mtERβ έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών μονοπατιών, καθώς μέσω αλληλεπίδρασης και ενεργοποίησης του MnSOD επάγει τη μείωση της παραγωγής ROS (Liang, Xie et al. 2015, Liao, Tzeng et al. 2015, Liao, Lee et al. 2019). Αποτελέσματα άλλων μελετών υποστηρίζουν ότι ο mtERβ ασκεί νευροπροστατευτική δράση έναντι ισχαιμικού επεισοδίου ρυθμίζοντας έμμεσα την έκφραση των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS, καθώς μέσω αλληλεπίδρασης με το μεταγραφικό παράγοντα CREB, που εντοπίζεται στο μιτοχόνδριο, επάγει τη φωσφορυλίωσή του και τη δέσμευσή του στο mtDNA (Cue, Diaz et al. 2015). Τέλος, πρόσφατες μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας, ύστερα από υπερέκφραση του mtERβ σε κύτταρα TNBC (Triple Negative Breast Cancer) και εμβολιασμό αυτών των κυττάρων σε μύες, έδειξαν ότι ο mtERβ μέσω ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής μεταγραφής, διασφαλίζει την παραγωγή ATP από το σύστημα OXPHOS (Παράρτημα 4) και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την καρκινογένεση (Song, Jeong et al. 2019).

Μεταβολικός επαναπρογραμματισμός καρκινικών κυττάρων Φαινόμενο Warburg

Παρουσία οξυγόνου, τα περισσότερα διαφοροποιημένα κύτταρα μεταβολίζουν τη γλυκόζη σε διοξείδιο του άνθρακα μέσω οξειδωσης του πυροσταφυλικού στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Αυτή η αντίδραση παράγει NADH, το οποίο τροφοδοτεί την αναπνευστική αλυσίδα-ΟΧΡΗΟΣ για να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή ATP. Παρουσία οξυγόνου η παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι ελάχιστη και μόνο υπό αναερόβιες συνθήκες τα διαφοροποιημένα κύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες του (Vander Heiden, Cantley et al. 2009).

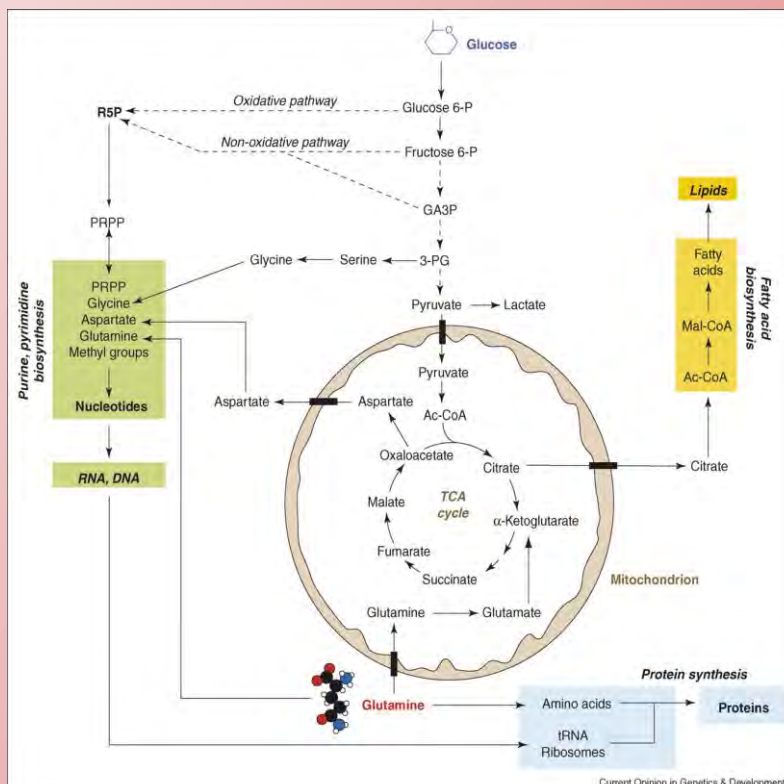
Αντίθετα, τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν υψηλότερους ρυθμούς πρόσληψης γλυκόζης και έκκρισης γαλακτικού οξέος ακόμη και παρουσία οξυγόνου και λόγω αυτού ο μεταβολισμός τους αναφέρεται συχνά ως «αερόβια γλυκόλυση». Οι παρατηρήσεις αυτές έγιναν αρχικά τη δεκαετία του 1920 από τον Otto Warburg ο οποίος παρατήρησε ότι τα καρκινικά κύτταρα μετατρέπουν την πλειονότητα της γλυκόζης σε γαλακτικό προκειμένου να καλύψουν γρήγορα τις ενεργειακές απαιτήσεις τους, φαινόμενο γνωστό και ως Warburg (Warburg effect) (Warburg 1956, Vander Heiden, Cantley et al. 2009, Ferreira, Hebrant et al. 2012). Η αρχική υπόθεση υποστήριζε ότι τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μη λειτουργικά μιτοχόνδρια γεγονός που οδηγεί σε εξασθενημένη αερόβια αναπνοή και επακόλουθη εξάρτηση από το γλυκολυτικό μεταβολισμό. Ωστόσο, μεταγενέστερες μελέτες αποκάλυψαν ότι η λειτουργία των μιτοχονδρίων δεν είναι μειωμένη στα περισσότερα καρκινικά κύτταρα (Vander Heiden, Cantley et al. 2009, Egawa, Saigo et al. 2018). Οι παραπάνω ανακαλύψεις ενθάρρυναν την ευρύτερη αντίληψη ότι απαιτείται ένας μεταβολικός επαναπρογραμματισμός κατά την καρκινογένεση. Τα χρόνια που ακολούθησαν από αυτή την κομβική ανακάλυψη μέχρι και σήμερα ενισχύουν αυτή την ιδέα, καθώς υποστηρίζουν ότι μέσω αυτού του επαναπρογραμματισμού τα θρεπτικά συστατικά που διαθέτουν τα καρκινικά κύτταρα υπερβαίνουν κατά πολύ εκείνα που απαιτούνται για τη φυσιολογική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων (Deberardinis, Sayed et al. 2008). Επιπλέον, εκτός της γλυκόζης, έχει παρατηρηθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, έχουν και αυξημένη πρόσληψη γλουταμίνης (Hengartner 2000, Otto 2016). Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι σε συνθήκες έλλειψης γλυκόζης και οξυγόνου η χρήση της γλουταμίνης αποτελεί σωτήρια λύση για την κάλυψη των απαιτήσεων του κυττάρου τόσο σε ενέργεια όσο και σε δομικά συστατικά (Burgess 2013).

Συνοψίζοντας, όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 1 (Π.4.Εικ.1), στα φυσιολογικά διαφοροποιημένα κύτταρα ο μεταβολισμός της γλυκόζης σε γαλακτικό παράγει μόνο 2 ATP ανά μόριο γλυκόζης, ενώ η οξειδωτική φωσφορυλίωση παράγει έως και 32 ATP κατά την πλήρη οξειδωση ενός μορίου γλυκόζης. Τα καρκινικά κύτταρα, μέσω της αερόβιας γλυκόλυσης, «φαίνεται» να επιλέγουν το μονοπάτι παραγωγής λιγότερων μορίων ATP, κάτι το οποίο δεν ισχύει στην πραγματικότητα καθώς τα καρκινικά κύτταρα των θηλαστικών, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, εκτίθενται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε συνεχή παροχή γλυκόζης και άλλων θρεπτικών συστατικών. Μια άλλη πιθανή εξήγηση για τη μετάβαση στην αερόβια γλυκόλυση, είναι ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν σημαντικές μεταβολικές απαιτήσεις, που εκτείνονται πέρα από την παραγωγή ATP, και μέσω αυτού του μονοπατιού διατηρούν μεγάλες ποσότητες ενδιάμεσων προϊόντων της γλυκολυτικής οδού (Vander Heiden, Cantley et al. 2009). Κατά την κυτταρική διαίρεση ένα κύτταρο πρέπει να αντιγράψει το γονιδίωμά του, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια του και στη συνέχεια να συνθέσει τα συστατικά που χρειάζεται στα δυο θυγατρικά κύτταρα, διαδικασία που απαιτεί την πρόσληψη εξωκυττάρων θρεπτικών συστατικών, όπως η γλυκόζη και η γλουταμίνη, και την κατανομή αυτών σε μεταβολικές οδούς με στόχο τη μετατροπή τους σε πρόδρομα βιοσυνθετικά μόρια. Για το λόγο αυτό, τα καρκινικά κύτταρα μέσω τροποποίησης της έκφρασης και της δραστηριότητας διαφόρων ενζύμων μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταβολική ροή ως προς την κάλυψη των απαιτητικών αναγκών τους (Deberardinis, Sayed et al. 2008).



Π.4.Εικ.1: Σχηματική αναπαράσταση των διαφορών μεταξύ της αερόβιας γλυκόλυσης (φαινόμενο Warburg) και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και αναερόβιας γλυκόλυσης. Παρουσία οξυγόνου, οι διαφοροποιημένοι ιστοί μεταβολίζουν, μέσω γλυκόλυσης, τη γλυκόζη σε πυροσταφυλικό και στη συνέχεια οξειδώνουν πλήρως το μεγαλύτερο μέρος του πυροσταφυλικού σε CO₂ κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια. Το οξυγόνο είναι απαραίτητο γι' αυτή τη διαδικασία επειδή αποτελεί τον τελικό δέκτη ηλεκτρονίων για την πλήρη οξείδωση της γλυκόζης. Όταν το οξυγόνο είναι περιορισμένο, τα κύτταρα μπορούν να ανακατευθύνουν το πυροσταφυλικό, που παράγεται από τη γλυκόλυση, μακριά από τη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση δημιουργώντας γαλακτικό οξύ (αναερόβια γλυκόλυση). Αυτή η παραγωγή γαλακτικού κατά τη διάρκεια της αναερόβιας γλυκόλυσης επιτρέπει τη συνέχιση της γλυκόλυσης (ανακυκλώνοντας το NADH σε NAD⁺), αλλά οδηγεί σε ελάχιστη παραγωγή ATP, σε σύγκριση με την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Ο Warburg παρατήρησε ότι τα καρκινικά κύτταρα τείνουν να μετατρέπουν την περισσότερη γλυκόζη σε γαλακτικό ανεξαρτήτως της παρουσίας οξυγόνου (αερόβια γλυκόλυση) (Vander Heiden, Cantley et al. 2009).

Συνοπτικά, στα πλαίσια του μεταβολικού επαναπρογραμματισμού τους, τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν τα δύο πιο άφθονα εξωκυττάρια θρεπτικά συστατικά, τη γλυκόζη και τη γλουταμίνη, και μέσω της γρήγορης πρόσληψης και του μεταβολισμού τους τροφοδοτούν αρκετά μονοπάτια που συμμετέχουν στην σύνθεση των τριών κύριων μακρομορίων (νουκλεϊικά οξέα, λιπίδια και πρωτεΐνες) καλύπτοντας με αυτόν τον τρόπο τις απαιτήσεις τους (Deberardinis, Sayed et al. 2008), αναλυτικότερα στην Εικόνα 2 (Π.4.Εικ.2).



Π.4.Εικ.2: Τα καρκινικά κύτταρα διατηρούν μεγάλες ποσότητες πρόδρομων βιοσυνθετικών συστατικών των κύριων μακρομορίων (νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και πρωτεΐνες) μέσω του μεταβολισμού της γλυκόζης και της γλουταμίνης. Αρχικά για τη βιοσύνθεση πουρινών και πυριμιδινών το κύτταρο χρησιμοποιεί 5-φωσφορική ριβόζη (Ribose 5-Phosphate, R5P) και αμινοξέα. Η R5P παράγεται από την εκτροπή των ενδιάμεσων προϊόντων της γλυκολυτικής οδού στον οξειδωτικό και μη οξειδωτικό κλάδο του μονοπατιού της φωσφορικής πεντόζης και τα απαιτούμενα αμινοξέα προέρχονται τόσο από τη γλυκόλυση όσο και τη γλουταμινόλυση. Το ακετυλοσυνένζυμο Α (Acetyl Coenzyme A, Ac-CoA), που απαιτείται ως πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων, παράγεται από τη γλυκόζη και μεταφέρεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα μέσω κιτρικού. Τέλος η πρωτεϊνοσύνθεση απαιτεί αμινοξέα, tRNAs και ριβοσώματα, μόρια που προέρχονται τόσο απ' το μεταβολισμό της γλυκόζης όσο και της γλουταμίνης, όπως απεικονίζεται στο σχήμα (Deberardinis, Sayed et al. 2008).

1.7. Μεταλλοιστρογόνα

1.7.1. Γενικές πληροφορίες

Εκτός από τα οιστρογόνα που παράγονται φυσικά στον οργανισμό, υπάρχει μια ποικιλία οργανικών και ανόργανων ενώσεων που είναι σε θέση να αναγνωρίσουν τους ERs και να δεσμευτούν με ακρίβεια στην LBD αυτών. Υπάρχουν πέντε κύριες κατηγορίες προσδετών των ERs: τα ενδοοιστρογόνα, τα φυτοοιστρογόνα, τα ξενοοιστρογόνα, οι εκλεκτικοί ρυθμιστές των υποδοχέων οιστρογόνων (Selective Estrogen Receptor Modulators, SERMs) και τα μεταλλοιστρογόνα (Fuentes and Silveyra 2019).

Τα μεταλλοιστρογόνα αποτελούν ανόργανες ενώσεις, με τη μορφή ιόντων βαρέων μετάλλων, που εμφανίζουν οιστρογονική δράση. Παραδείγματα αυτών περιλαμβάνουν τα εξής: το αργίλιο (Al^{3+}), το οποίο μελετήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή και θα αναλυθεί παρακάτω, το αντιμόνιο (Sb^{3+}), το κοβάλτιο (Co^{2+}), ο χαλκός (Cu^{2+}), ο μόλυβδος (Pb^{2+}), ο υδράργυρος (Hg^{2+}), το νικέλιο (Ni^{2+}), κ.α. (Fuentes and Silveyra 2019).

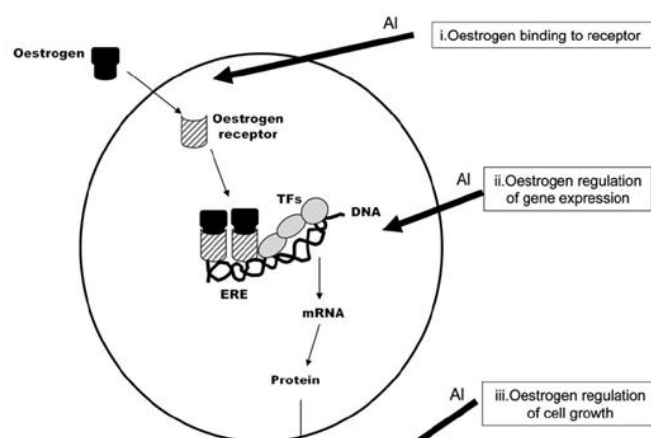
1.7.2. Αργίλιο και άλατα αργιλίου

Το αργίλιο (Aluminum, Al) είναι το τρίτο πιο άφθονο μέταλλο που βρίσκεται στο φλοιό της γης (Becaria, Bondy et al. 2003). Το Al αλλά και οι ενώσεις Al χρησιμοποιούνται καθημερινά από τον άνθρωπο σε διάφορους τομείς, όπως στον καθαρισμό του νερού, στην κοσμετολογία, σε φαρμακευτικά προϊόντα και στα τρόφιμα, ως συντηρητικά και μέσα χρωματισμού (Becaria, Bondy et al. 2003, Shaw 2018). Επακόλουθο των παραπάνω είναι ότι σημαντικές ποσότητες ιόντων Al έχουν βρεθεί στον οργανισμό τόσο του ανθρώπου όσο και διαφόρων ζώων (Yokel and McNamara 2001, Krewski, Yokel et al. 2007). Οι συσσωρευμένες

ποσότητες AI έχουν συσχετιστεί με αρκετές παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο, όπως η μικροκυτταρική αναιμία, ο καρκίνος του μαστού και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Dorea 2015, Gherardi, Aouizerate et al. 2016, Mold, Shardlow et al. 2016). Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελούν κάποια αντιδρωτικά τα οποία φαίνεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, καθώς περιέχουν άλατα AI σε συγκεντρώσεις μέχρι και 25%^{w/v} καθιστώντας τα μια σημαντική πηγή έκθεσης του ανθρώπου στο AI (Darbre 2005, Darbre 2006).

Όσον αφορά τις χημικές του ιδιότητες, το AI εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με το σίδηρο, καθώς μεταφέρεται στους ιστούς μέσω της πρωτεΐνης τρανσφερίνης. Η πρωτεΐνη αυτή μέσω ενδοκύττωσης διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ανίχνευση υψηλών συγκεντρώσεων ενώσεων AI στο κεντρικό νευρικό σύστημα πολλών ασθενών συσχετίζουν το AI και τα άλατα AI με την ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Becaria, Campbell et al. 2002, Bondy 2014, Chalansonnet, Carabin et al. 2018). (Bondy 2014).

Οι αρνητικές επιδράσεις των ενώσεων AI περιλαμβάνουν την αύξηση της παραγωγής ROS και του ρυθμού οξείδωσης των λιπαρών οξέων, τη μείωση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μορίων και την αύξηση των επιπέδων της φωσφολιπάσης A2, του προδρόμου της IL-1β και των υπομονάδων του NF-κB. Επακόλουθο των παραπάνω αποτελεί η αύξηση τόσο του οξειδωτικού στρες όσο και των προφλεγμονωδών και προαποπτωτικών διεργασιών (Becaria, Bondy et al. 2003, Vucetic-Arsic, Radonjic et al. 2013, Maya, Prakash et al. 2016).



Εικόνα 12: Πιθανά σημεία παρέμβασης του AI στις μοριακές δράσεις των ERs. i) Εμπλοκή του AI στη δέσμευση των ERs με τους φυσικούς τους προσδέτες, ii) Κατάληψη βασικών θέσεων δέσμευσης ψευδαργύρου από το AI επηρεάζοντας την πρόσδεση του συμπλόκου ER-προσδέτης στα EREs. iii) Εμπλοκή του AI στο προφίλ έκφρασης των γονιδίων στόχων των ERs (Darbre 2005). TFs, Transcription Factors; ERE, Estrogen Response Element.

Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν την οιστρογονομιμική δράση του AI, καθώς μπορεί να παρέμβει ποικιλοτρόπως στη δράση των ERs, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 12. Μελέτη μακροχρόνιας έκθεσης κυττάρων καρκίνου του μαστού MCF-7 σε άλατα AI είχε ως αποτέλεσμα το διπλασιασμό της έκφρασης των μορίων στόχων της οιστρογονικής σηματοδότησης (Darbre 2005). Επιπλέον, αποτελέσματα της ερευνητικής μας ομάδας, υποδεικνύουν την επαγόμενη από το AI αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα και ρύθμιση της έκφρασης των μορίων στόχων του, ύστερα από έκθεση κυττάρων MCF-7 σε άλατα AI (Gorgogietas, Tsialtas et al. 2018).

1.8. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση του ρόλου του mtERβ στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας σε νευρικά κύτταρα. Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκε η εμπλοκή του mtERβ στη ρύθμιση διεργασιών άρρηκτα συνδεδεμένων με το μιτοχόνδριο όπως η μιτοχονδριακή μεταγραφή, η παραγωγή ενέργειας, η αντιοξειδωτική άμυνα και η σχετιζόμενη με το μιτοχόνδριο απόπτωση, καθώς και η συσχέτιση των επαγόμενων από τον mtERβ δράσεων με μηχανισμούς ρύθμισης της κυτταρικής διαφοροποίησης και καρκινογένεσης. Επιπλέον μελετήθηκε η παρεμβολή του αργιλίου στη ρύθμιση της οιστρογονικής σηματοδότησης σε νευρικά κύτταρα, ο χαρακτηρισμός των βιοχημικών μηχανισμών επιτέλεσης αυτής της δράσης και η συσχέτιση των επαγόμενων από το αργίλιο νευροτοξικών δράσεων με τις επαγόμενες από τον ERβ νευροπροστατευτικές δράσεις.

1.9. Συνοπτική περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού

Για την επίτευξη των προαναφερθέντων επιμέρους στόχων της παρούσας διδακτορικής διατριβής εκτελέστηκαν τρεις ενότητες εργασίας, όπως περιγράφεται στη συνέχεια:

Η διερεύνηση της εμπλοκής του mtERβ σε σχετιζόμενες με το μιτοχόνδριο διεργασίες, όπως η μιτοχονδριακή μεταγραφή, η παραγωγή ενέργειας, η απόπτωση, το οξειδωτικό στρες και η κυτταρική διαφοροποίηση, αποτέλεσαν το αντικείμενο μελέτης της πρώτης ενότητας της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Λόγω αμφισβήτησης της αποτελεσματικότητας των εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων έναντι του ERβ (Nelson, Groen et al. 2017, Gustafsson,

Strom et al. 2019) θεωρήθηκε αναγκαία η κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών που θα υπερεκφράζουν τον ERβ με μιτοχονδριακή στόχευση. Έτσι κατασκευάστηκαν δύο σταθερές κυτταρικές σειρές με χρήση κυττάρων νευροβλαστώματος ποντικού N2A, καθώς εμφανίζουν μειωμένα ενδογενή επίπεδα του ERβ, σε σχέση με άλλες κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος και μη (Mendez and Garcia-Segura 2006, Su, Rybalchenko et al. 2012, Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020). Η πρώτη σταθερή κυτταρική σειρά που κατασκευάστηκε υπερεκφράζει σταθερά τον ERβ, ως χιμαιρική πρωτεΐνη με την GFP με μιτοχονδριακή στόχευση (N2AmtGFPERβ) και η δεύτερη υπερεκφράζει την GFP με μιτοχονδριακή στόχευση (N2AmtGFP) και χρησιμοποιήθηκε ως κυτταρική σειρά αναφοράς. Στη συνέχεια οι σταθερές κυτταρικές σειρές χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλο μελέτης της διερεύνησης του ρόλου του mtERβ στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Το πλάνο εργασίας περιλάμβανε καλλιέργεια κυττάρων, παρουσία και απουσία παραγόντων αναστολής της πυρηνικής μεταγραφής ή της αναπνευστικής αλυσίδας, επαγωγής απόπτωσης, οξειδωτικού στρες ή διαφοροποίησης. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν διάφορες πειραματικές διαδικασίες, όπως ανοσοαποτύπωση κατά Western και ανοσοφθορισμός με χρήση ειδικών αντισωμάτων, PCR πραγματικού χρόνου, μικροσκοπία φθορισμού, δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας MTT και μέτρηση των επιπέδων ATP. Τα σημαντικότερα ευρήματα της παρούσας ενότητας επαληθεύτηκαν και σε κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπου SH-SY5Y, καθώς εμφανίζουν, σε σύγκριση με άλλες κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος και μη, αυξημένα ενδογενή πρωτεϊνικά επίπεδα και μιτοχονδριακή εντόπιση του ERβ (Liang, Xie et al. 2015, Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020), γεγονός που διαπιστώθηκε και στην παρούσα εργασία.

Στόχος της δεύτερης ενότητας της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η συσχέτιση των παραπάνω δράσεων του mtERβ με το ρόλο που διαδραματίζει ο υποδοχέας στην καρκινογένεση. Η επίτευξη του στόχου αυτού πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας *in vivo* πειράματα καρκινογένεσης σε μύες (*xenograft mouse model*). Οι μελέτες αυτές περιλάμβαναν εμβολιασμό των κυττάρων των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών, καθώς και κυττάρων N2A αγρίου τύπου (N2A wild type, N2A wt), σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Στη συνέχεια, με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western, πραγματοποιήθηκε η βιοχημική ανάλυση των παραγόμενων όγκων με στόχο τη διερεύνηση των μηχανισμών δράσης του mtERβ στη ρύθμιση ανάπτυξης αυτών.

Αντικείμενο μελέτης της τρίτης ενότητας της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της εμπλοκής του AI, το οποίο όπως γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία ανήκει στα μεταλλοιστρογόνα (Darbre 2005, Fuentes and Silveyra 2019), με την οιστρογονική σηματοδότηση και η συσχέτιση της δράσης αυτής με τις επαγόμενες από το AI νευροτοξικές δράσεις. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν ιόντα αργίλιου υπό τη μορφή υδροξυχλωριούχο αργίλιο (Aluminum Chlorohydrate, ACH). Τα πειράματα αυτής της ενότητας πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y, λόγω του ότι ο ERβ ανιχνεύεται ενδογενώς σε σημαντικό βαθμό σε αυτά (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020), καθώς και επειδή χρησιμοποιούνται κατά κόρον για την εκτίμηση των νευροτοξικών δράσεων διαφόρων ενώσεων (Valdiglesias, Costa et al. 2013, Maddirala, Tobwala et al. 2015, Morales-Hernandez, Corrales-Redondo et al. 2016). Τα κύτταρα SH-SY5Y αφού κατεργάστηκαν με το ACH υποβλήθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ανοσοφθορισμού και μικροσκοπίας φθορισμού.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

2.1. Όργανα

Heat blocks: KISKER / Nippon Genetics

Laminar Flow Hood: Tel Star AV-30/70

Nanodrop: Thermofisher

PCR hood: UVC/T-AR

Sonicator: Helscher Ultrasound Technologies, model UP400S

Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss Optronic Germany

Επωαστήρες: SHEL LAB / New Brunswick (an Eppendorf Company) Galaxy 170S

Ζυγοί: KERN EW / KERN 440-47 N

Λουμινόμετρο: Berthold Technologies, LuBat 39508

Μηχάνημα PCR: eppendorf mastercycler gradient

Μηχανήματα Real time PCR: Stratagene Mx 3005p / Applied Biosystems

Συνεστιακό Μικροσκόπιο (Confocal): Zeiss laser scanning microscope 800, Zeiss LSM 800

Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς: Biorad mini-trans Blot

Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell

Υδατόλουτρο: P SELECTA

Φυγόκεντροι Entrofriger- BLII/ PSSelecta® / Helme Z36HK / Eppendorf 5810R

Φωτόμετρο: Spectronic® 20 GENESYSTM

2.2. Αναλώσιμα

Πίνακας 1: Τα κυριότερα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν

Προϊόντα	Εταιρεία
Γυάλινα σιφώνια	Fisherbrand
Διηθητικά χαρτιά Whatman	Cytiva
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0,45μm και 0,2μm	Amersham™ Protran™
Ορολογικές Πιπέττες – Serological pipettes 2, 5, 10 και 25 ml	Sarstedt
Πιάτα καλλιέργειας κυττάρων – cell culture plates 6, 24 και 96 θέσεων	Costar
Πιάτα καλλιέργειας κυττάρων – culture dishes 60x15 και 150x20mm	Corning
Σωληνάρια για φύλαξη ευκαρυωτικών κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη – Cryovials 1.8 και 2ml	Corning
Φιλμ ανίχνευσης σήματος	Fuji medical
Φλάσκες για ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων – flasks 25 και 75 cm ²	Sarstedt

2.3. Χημικά – Διαλύματα

Πίνακας 2: Τα κυριότερα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν

Αντιδραστήρια – Χημικά	Εταιρεία
Acrylamide/Bis acrylamide 40 %	Bio-Rad
All trans retinoic acid (ATRA)	Sigma-Aldrich
Aluminum Chlorohydrate (ACH)	Clariant International
Ammonium persulfate (APS)	Sigma-Aldrich
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bradford protein assay	Bio-Rad
DCF (6-carboxy H ₂ DCFDA, 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)	Thermo Fisher Scientific
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich
dNTP Mix (10 mM each)	Thermo Fisher Scientific
DPN (Diarylpropionitrile ,3-Bis(4-hydroxyphenyl / propionitrile)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific

ECL (Enhanced ChemiLuminescence)	Santa Cruz Biotechnology
EDTA	Serva
Enliten	Promega
Estradiol (E2)	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific
Geneticin (G418)	Calbiochem
Glycine	Serva
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich
Human neuregulin 1b (h-NRG-1)	ImmunoTools
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich
JC-1 (5,5', 6,6' – tetrachloro - 1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide)	Thermo Fisher Scientific
L-Glutamin 200mM	Thermo Fisher Scientific
Lipofectamin 2000	Thermo Fisher Scientific
MitoTracker Red CMXRos (CMX)	Thermo Fisher Scientific
PBS x10, pH:7,4	Thermo Fisher Scientific
Penicillin / Streptomycin (P/S)	Thermo Fisher Scientific
PMSF	Serva
Protein Molecular Weight Markers	Thermo Fisher Scientific
Random Hexamers (50 µM)	Thermo Fisher Scientific
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific
RQ1 DNase Stop Solution Buffer	Promega
RQ1 RNase Free, DNA 10x Reaction Buffer	Promega
RQ1 RNase-Free DNase	Promega
Skimmed milk powder	Regilait
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 10%	Sigma-Aldrich
Staurosporine (STS)	Sigma-Aldrich
SuperScript II RT	Promega
SYBER Green Mix	Applied Biosystems
SYBR™ Select Master Mix	Thermo Fisher Scientific
TEMED	PanReac AppliChem
Tris	Serva
Triton-X 100	PanReac AppliChem
Trizol	Sigma-Aldrich

Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red	Thermo Fisher Scientific
Tween-20	Sigma-Aldrich
α-αμανιτίνη	Sigma-Aldrich
Αιθανόλη	Sigma-Aldrich
β-μερκαπτοαιθανόλη	Riedel-de Haën
Ισοπροπανόλη	Sigma-Aldrich
Μεθανόλη	Sigma-Aldrich
Μείγμα αναστολέων πρωτεασών	Roche
τριχλωροξικό οξύ (Trichloroacetic acid, TCA)	PanReac AppliChem
Χλωροφόρμιο	PanReac AppliChem

Πίνακας 3: Τα κυριότερα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν και η σύστασή τους

Διαλύματα	Σύσταση
Διάλυμα λύσης κυττάρων	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 20mM Tris-HCl, pH 7.5 ▪ 3mM EDTA ▪ 250mM NaCl ▪ 0,5 % v/v Triton X-100 ▪ Πριν τη χρήση του προστίθενται στο διάλυμα οι κάτωθι αναστολείς πρωτεασών ▪ 0,02M PMSF ▪ 1/100 Proteases Inhibitors (Roche) ▪ 1M DTT ▪ Και οι κάτωθι αναστολείς φωσφατασών, όπου απαιτείται: ▪ 1mM Sodium Pyrophosphate ▪ 10mM Sodium Fluoride (NaF)
Sample Buffer 4x	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1M Tris-HCl, pH 6.8 ▪ 10% w/v SDS ▪ 5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη ▪ 10% w/v Γλυκερόλη ▪ 1% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10× (Running Buffer)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1L διαλύματος (σε ddH₂O) περιέχει: ▪ 144 gr Γλυκίνη ▪ 30.3 gr Tris base
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς 1× (Transfer Buffer)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1L διαλύματος (σε ddH₂O) περιέχει: ▪ 10% v/v Running Buffer 10X ▪ 0,05% v/v SDS ▪ 20% v/v Μεθανόλη
Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10× (PBS)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 0,091M Na₂HPO₄ ▪ 1,5M NaCl ▪ 0,017M NaH₂PO₄
Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα 10× (Tris-buffered saline, TBS)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1,5M NaCl ▪ 0,2M Tris Base ▪ Ρύθμιση pH 7.5
Διάλυμα Polyvinyl-Alcohol (PVA)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 75ml ddH₂O, 80oC ▪ 5ml Tris-PO₄, pH 9 ▪ 100 mg χλωροβουτανόλη ▪ 20gr PVA ▪ 50μl phenol red ▪ 20 ml γλυκερόλη
Διάλυμα ζωάνθρακα	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 2,5% w/v ζωάνθρακα ▪ 0,25% w/v Δεξτράνη (Dextran) ▪ 10mM Tris-HCL, pH: 7,4
Διάλυμα κλασμάτωσης μιτοχονδρίων A	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 20mM HEPES-KOH, pH 7.5 ▪ 10mM KCl ▪ 1mM EDTA ▪ 1mM EGTA ▪ 1,5mM MgCl₂ ▪ 250mM Σουκρόζη
Διάλυμα κλασμάτωσης μιτοχονδρίων B	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 20mM Tris-HCl, pH 7.5 ▪ 210mM Μαννιτόλη ▪ 2,5mM EDTA

2.4. Αντισώματα

Πίνακας 4: Πρωτογενή αντισώματα

Αντίσωμα	Εταιρεία	Κωδικός	Μοριακό Βάρος (kDa)
AMPKα	Cell Signaling	2532	62
BAD (C-7)	Santa Cruz Biotechnology	sc-8044	25
BAX	Cell Signaling	2772	20
Bcl-2	Cell Signaling	2876	28
Bcl-xL	Cell Signaling	2762	30
BECN1 (E-8)	Santa Cruz Biotechnology	sc-48341	60
BNIP3L/NIX (D4R4B)	Cell Signalling	12396	38
caspase 3	Cell Signaling	9662	35
caspase 9	Cell Signaling	9508	49 & 37
Citrate synthase (G-3)	Santa Cruz Biotechnology	sc-390693	52
cleaved caspase 3	Cell Signaling	9661	17
COX I	Invitrogen	-	40
COX IV	Proteintech	11242-1-AP	17
ERα-F10	Santa Cruz Biotechnology	sc-8002	66
ERβ (B-3)*	Santa Cruz Biotechnology	sc-373853	56
ERβ-H150**	Santa Cruz Biotechnology	sc-8974	56
ERβ-MCA***	Serotec	MCA1974S	56
GAPDH	Proteintech	60004-1-Ig	36
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	sc-365062	37
GFP	Roche	-	27
LC3	Abcam	Ab48394	17 & 19
LDH (H-10)	Santa Cruz Biotechnology	sc-133123	35
MDH2 (1G12)	Santa Cruz Biotechnology	sc-293474	36
p21 (12D1)	Cell Signaling	2947	21
P62/SQSTM1	MBL International	PM045	62
PDH-E1α (D-6)	Santa Cruz Biotechnology	sc-377092	43

Phospho-AMPKα (Thr172) (40H9)	Cell Signaling	2535	66
Phospho-ERα (Ser118) (16J4)	Cell Signaling	2511	66
SDH	Invitrogen	-	72
α-τουμπουλίνη	Proteintech	11224-1-AP	55
βIII-tubulin / Tuj-1	Cell Signaling	5568	55
β-ακτίνη	Sigma Aldrich	-	42

* μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι επιτόπου μεταξύ των αμινοξέων 2-29 της αμινοτελικής περιοχής του ERβ ανθρώπινης προέλευσης.

** πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι επιτόπου μεταξύ των αμινοξέων 1-150 του ERβ ανθρώπινης προέλευσης

*** μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της καρβοξυτελικής περιοχής του ERβ ανθρώπινης προέλευσης.

Πίνακας 5: Δευτερογενή αντισώματα

Αντίσωμα	Εταιρεία
Alexa 488 (anti-rabbit)	Thermo Fisher Scientific
Alexa 568 (anti-mouse)	Thermo Fisher Scientific
Mouse IgG-HRP	Pierce Antibodies-Thermo Fisher Scientific
Rabbit IgG-HRP	Pierce Antibodies-Thermo Fisher Scientific

2.5. Κυτταρικές σειρές

Πίνακας 6: Κυτταρικές σειρές

Κυτταρική σειρά	Οργανισμός	Ιστός	Ασθένεια
Neuro – 2a (N2A)	Mus musculus, mouse	Εγκέφαλος	Νευροβάστωμα
SH-SY5Y	Homo sapiens, human	Οστό	Νευροβάστωμα

2.6. Καλλιέργεια κυττάρων

Τα ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y και τα κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού N2A καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (1mg/ml), στο οποίο είχε προστεθεί 10%(v/v) εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum, FBS), 2mM L-γλουταμίνη (L-Glutamine, L-Glu),

50U/ml πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Penicillin / Streptomycin, P/S) [θρεπτικό μέσο ανάπτυξης] και αναπτύχθηκαν στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

40-48 ώρες πριν την προσθήκη ουσιών αλλά και κατά την επώαση των κυττάρων με τις απαραίτητες ουσίες, για τη διεξαγωγή της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη, απουσία του δείκτη κόκκινο της φαινόλης, και εμπλουτισμένου με 2mM L-Glu, 50U/ml P/S και 10% cs-FBS (charcoal stripped FBS) [θρεπτικό μέσο απαλλαγμένο από ορμόνες].

Το cs-FBS είναι FBS που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με διάλυμα ενεργού άνθρακα (2,5% w/v ζωάνθρακα, 0,25% w/v δεξτράνη και διάλυμα Tris-HCL 10 mM, pH: 7,4), ο οποίος έχει τη δυνατότητα να προσδένει μη πολικά μόρια, συμπεριλαμβανομένων των ορμονών. Συνοπτικά η διαδικασία περιλαμβάνει επώαση του διαλύματος ορού – ζωάνθρακα, αναλογία 5:1, σε συνθήκες 56°C, 210rpm για 30min και ακολουθεί φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση του ζωάνθρακα και κατ' επέκταση και των μορίων με τα οποία έχει συμπλοκοποιηθεί. Η παραπάνω διαδικασία εκτελείται δύο φορές και στο τέλος πραγματοποιείται, φιλτράρισμα του ορού από 0,22μm φίλτρο, υπό στείρες συνθήκες.

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη είναι απαραίτητη η απομάκρυνση των ορμονών από τον ορό έτσι ώστε μετά την εξωγενή τους προσθήκη να μπορεί να εκτιμηθεί η δράση αυτών. Επιπλέον, σε κάθε πειραματική διαδικασία συμπεριλήφθηκε συνθήκη αναφοράς, όπου τα κύτταρα επώαστηκαν με τον/τους διαλύτη/τες των υπό μελέτη ουσιών, σε συγκέντρωση ίδια με αυτήν στα δείγματα μελέτης.

2.7. Διαφοροποίηση κυττάρων σε νευρικά

Η διαφοροποίηση των κυττάρων νευροβλαστώματος SH-SY5Y ή N2A σε νευρικά κύτταρα πραγματοποιήθηκε με καλλιέργεια αυτών σε θρεπτικό μέσο DMEM, χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη, στο οποίο προστέθηκε 1% FBS και 10μM ρετινοϊκού οξέος (Retinoic Acid, RA) (Lopes, Schroder et al. 2010), ή 2% FBS και 20μM RA (Riboni, Prinetti et al. 1995, Ettinger, Wilsch-Brauninger et al. 2011, Tsiaras, Papastefanaki et al. 2013), αντίστοιχα [θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης]. Συνοπτικά η διαδικασία περιλαμβάνει στρώσιμο των κυττάρων SH-SY5Y ή N2A σε πυκνότητα 10,000 cells/cm² ή 8,000 cells/cm², αντίστοιχα, σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα επώαστηκαν με το αντίστοιχο

θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης της κάθε κυτταρικής σειράς. Τα κύτταρα N2A επώαστηκαν με το παραπάνω θρεπτικό μέσο για 5 ημέρες, ενώ τα κύτταρα SH-SY5Y για 8-10 ημέρες, όπου στις 4-5 ημέρες το θρεπτικό μέσο τους ανανεώθηκε.

Οι εικόνες των διαφοροποιημένων κυττάρων ελήφθησαν σε μικροσκόπιο αντίθετης φάσης και η ποσοτικοποίηση του μήκους των νευρώνων έγινε με το πρόγραμμα ImageJ (1.52p).

2.8. Κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών

Για την κατασκευή των σταθερών κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pmtEGFPC2 και pmtEGFPC2ERβ, τα οποία κατασκευάστηκαν από την Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά, όπως περιγράφεται στο ακόλουθο άρθρο από τους Psarra & Sekeris (Psarra and Sekeris 2009). Συγκεκριμένα το γονίδιο ERβ του ανθρώπου (AB006590) (Ogawa, Inoue et al. 1998) εισήχθη στον φορέα pEGPC2 (Clontech-Takara, Mountain View, CA, USA), μεταξύ των θέσεων Xho1 και BamH1, για την κατασκευή του φορέα pEGFPC2ERβ. Στη συνέχεια για την κατασκευή των φορέων pmtEGFPC2 και pmtEGFPC2ERβ εισήχθη μεταξύ των θέσεων NheI και AgeI των φορέων pEGFPC2 και pEGFPC2ERβ, αντίστοιχα, η ακόλουθη αλληλουχία: «atggctcagcgacttcttctgaggagggtcctggcctctgtcatctccaggaagccctctcagggtcagtggccaccctcacttccagagcctgcagaccccaaatgcagtcctggggcctgctgtaacacccaaccagcccggacaatatacaccacgaggatctccttgaca», η οποία κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο με μιτοχονδριακή στόχευση.

Για την παρασκευή των σταθερών κυτταρικών σειρών, τα κύτταρα N2A στρώθηκαν σε 60mm πιάτα καλλιέργειας κυττάρων σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, όπου αναπτύχθηκαν για μια ημέρα, και την επόμενη ημέρα ακολούθησε διαμόλυνσή τους με τους παραπάνω πλασμιδιακούς φορείς (pmtEGFPC2ERβ και pmtEGFPC2) και με χρήση εμπορικά διαθέσιμων μέσων διαμόλυνσης, Lipofectamine 2000. Με σκοπό την επιλογή των θετικά διαμολυσμένων κυττάρων, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για δύο εβδομάδες σε θρεπτικό μέσο DMEM στο οποίο είχε προστεθεί 10% FBS και 1,5mg/mL αντιβιοτικού G418. Τέλος συλλέχθηκαν οι αποικίες που ήταν ανθεκτικές στο G418 και αξιολογήθηκαν ως προς την έκφραση των πρωτεϊνών mtGFP και mtGFPERβ με τη μέθοδο της μικροσκοπίας φθορισμού, του ανοσοφθορισμού, της ανοσοαποτύπωσης κατά Western και της PCR πραγματικού χρόνου (Real time PCR).

2.9. Ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των ERs αλλά και για την αξιολόγηση της επίδρασης των ERs, και κυρίως του mtERβ, στη ρύθμιση των επιπέδων μια πληθώρας πρωτεϊνικών μορίων, που εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες της οιστρογονικής σηματοδότησης. Οι συνθήκες της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας, συμπεριλαμβανομένου των παραγόντων επώασης των κυττάρων, χρόνου επώασης και συγκέντρωσης αυτών αναφέρονται αναλυτικά στην ενότητα των αποτελεσμάτων.

Αρχικά τα κύτταρα που προορίζονταν γι' αυτή την πειραματική διαδικασία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απαλλαγμένο από ορμόνες σε πιάτα καλλιέργειας κυττάρων 6 θέσεων και στη συνέχεια επώαστηκαν με τους εκάστοτε παράγοντες. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης πραγματοποιήθηκε στα κύτταρα μια έκπλυση με αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικά (PBS, Phosphate-buffered saline) και ακολούθησε συλλογή (scraping), φυγοκέντρηση (5 λεπτά, 1000 rpm, 4 °C) και λύση των κυττάρων με χρήση διαλύματος λύσης (20 mM Tris pH:7.5, 0,5 % Triton, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA), στο οποίο είχε προστεθεί κατάλληλη ποσότητα από κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών (0,02M PMSF, 1/100 Proteases Inhibitors - Roche, 1M DTT) και φωσφατασών (1mM Sodium Pyrophosphate, 10mM NaF). Τα κύτταρα παρέμειναν στο διάλυμα λύσης για 25 λεπτά στους 4°C και κολούθησε ομογενοποίηση με χρήση υπερήχων (sonication) με σκοπό τον κατακερματισμό των μεμβρανών και του DNA. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε φασματοφωτομετρική μέθοδος Bradford (Bradford protein assay) για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στα κυτταρικά εκχυλίσματα και παρασκευή δειγμάτων με ίση ποσότητα πρωτεϊνών αναμειγμένων με το διάλυμα «φόρτωσης» (sample buffer). Αφού τα δείγματα θερμάνθηκαν για 5 λεπτά στους 95°C, ηλεκτροφορήθηκαν υπό αποδιατακτικές συνθήκες, δηλαδή σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE). Η σύσταση του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου απεικονίζεται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Σύσταση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

Πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου	Σύσταση
Πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel)	<ul style="list-style-type: none">▪ 0,125M Tris-HCl, pH 6,8▪ 0,1% (w/v) SDS▪ 4% (w/v) ακρυλαμίδιο▪ 1% (w/v) APS▪ 0,04% v/v Temed
Πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel)	<ul style="list-style-type: none">▪ 0,375M Tris-HCl, pH 8,8▪ 0,1% (w/v) SDS▪ 7 - 15% (w/v) ακρυλαμίδιο▪ 1% (w/v) APS▪ 0,04% v/v Temed

Αφού ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφόρησης έλαβε χώρα η ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών (Western Blotting) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, σε συνθήκες σταθερής έντασης ρεύματος 0,35A για 70 λεπτά, και έπειτα η δέσμευση/αποκλεισμός των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης (blocking) με επώαση αυτής με 10% (w/v) άπαχο αποξηραμένο γάλα σε διάλυμα PBSTx1 ή TBSTx1 (0,1% Tween 20 σε PBSx1 ή TBSx1, αντίστοιχα) υπό ανάδευση για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου.

Τέλος η μεμβράνη επώαστηκε με πρωτογενή μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα και στη συνέχεια με δευτερογενή αντισώματα, τα οποία είναι ομοιοπολικά συζευγμένα με αρμορακική οξειδάση-χρένου (horseradish peroxidase, HRP). Τα πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα διαλυτοποιήθηκαν σε PBSTx1 ή TBSTx1 που περιείχε 2% αλβουμίνη βόειου ορού (Bovine serum albumin BSA). Η ανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών έγινε με το σύστημα ECL (Enhanced ChemiLuminescence), το οποίο βασίζεται στη χημειοφωταύγεια. Το φως ανιχνεύτηκε από φωτοευαίσθητα φιλμ αυτοραδιογραφίας (X-ray films) ύστερα από σύντομη έκθεση της εμποτισμένης με ECL μεμβράνης σε ειδικά διαλύματα εμφάνισης (Developer, Fixer) σε σκοτεινό θάλαμο.

Η πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών των υπό μελέτη μορίων κανονικοποιήθηκε ως προς την αντίστοιχη πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων κανονικοποίησης β-ακτίνη, α-τουμπουλίνη και αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος (Succinate DeHydrogenase, SDH),

όσον αφορά τα μιτοχονδριακά κλάσματα, του κάθε πειράματος. Η ποσοτικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών έγινε με το πρόγραμμα ImageJ (1.52p).

2.10. Μικροσκοπία Φθορισμού – Ανοσοφθορισμός

Με εφαρμογή μικροσκοπίας φθορισμού αξιολογήθηκαν οι αποικίες των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, ως προς τα επίπεδα έκφρασης αλλά και τη μιτοχονδριακή εντόπιση των πρωτεϊνών GFP και GFPERβ αντίστοιχα. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε επιπλέον για την αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στην επαγόμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (Hydrogen peroxide, H₂O₂) μιτοχονδριακή βλάβη σε κύτταρα N2A wt και σε κύτταρα N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, όπως περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια. Επίσης, με χρήση ειδικών αντισωμάτων και με εφαρμογή ανοσοφθορισμού επιβεβαιώθηκε πρώτον η παραγωγή της χημεικής πρωτεΐνης GFPERβ, αξιολογώντας τον συνεντοπισμό της GFP με τον ERβ σε αποικίες της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ, και δεύτερον η επίδραση του ACH στην υποκυτταρική εντόπιση του ERβ σε διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα SH-SY5Y.

Στις συγκεκριμένες πειραματικές διαδικασίες, μικροσκοπία φθορισμού και ανοσοφθορισμός, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε ειδικές καλυπτρίδες (coverslips) αφού είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί και τοποθετηθεί σε φρεάτια κατάλληλων τρυβλίων ανάπτυξης των κυττάρων. Τα κύτταρα των αποικιών των N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ κυτταρικών σειρών καθώς και της κυτταρικής σειράς N2A wt στρώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Όσον αφορά τις πειραματικές διαδικασίες στις οποίες διερευνήθηκε η επίδραση 10⁻⁴M ACH και / ή 10⁻⁹M E2 σε διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα SH-SY5Y, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης DMEM, από το οποίο απουσίαζε ο δείκτης κόκκινο της φαινόλης, εμπλουτισμένο με cs-FBS αντί του FBS [θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης απαλλαγμένο από ορμόνες], τόσο για 48 ώρες πριν την διεξαγωγή του πειράματος, όσο κατά τη δίωρη επώαση των κυττάρων με τις ουσίες.

Κατά την αξιολόγηση των αποικιών των σταθερών κυτταρικών σειρών τα κύτταρα επώαστηκαν 30 λεπτά πριν την μονιμοποίησή τους με 1μg/ml Hoechst 33342 και 200nM κόκκινου φθορίζοντος μιτοχονδριακού ιχνηθέτη CMXRos (MitoTracker Red CMXRos, CMX). Στην περίπτωση της αξιολόγησης της επίδρασης του mtERβ στην επαγόμενη από το H₂O₂

μιτοχονδριακή βλάβη, τα κύτταρα και των τριών κυτταρικών σειρών (N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ) επώαστηκαν με 1μg/ml Hoechst 33342 και 200nM CMX καθώς και με 1 ή 2mM H₂O₂ για 2,5 ώρες. Οι παραπάνω χρωστικές CMX και Hoechst χρησιμοποιήθηκαν για τη σήμανση των μιτοχονδρίων και των πυρήνων αντίστοιχα. Μετά το πέρας των 30 λεπτών ή των 2 ή 2,5 ωρών, πραγματοποιήθηκαν 2-3 εκπλύσεις των καλυπτρίδων με PBSx1 (4°C) και μονιμοποίηση τους για 10 λεπτά στους -20°C με μεθανόλη και έπειτα για 2 λεπτά στους -20°C με ακετόνη. Ύστερα από 3 εκπλύσεις με PBSx1 οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με χρήση του μέσου επίστρωσης βασισμένο στην πολυβινυλική αλκοόλη (PolyVinyl Alcohol, PVA) (Psarra and Sekeris 2008) και τέλος ελήφθησαν εικόνες με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας (Zeiss laser scanning microscope 800, Zeiss LSM 800).

Στις περιπτώσεις που πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός, αφού τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω, οι καλυπτρίδες πριν την τοποθέτησή τους στις αντικειμενοφόρους επώαστηκαν για 1 ώρα με τα πρωτογενή αντισώματα ERβ-H150, όσον αφορά τα κύτταρα SH-SY5Y, και ERβ-B-3, όσον αφορά τα κύτταρα των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών, και στη συνέχεια για ακόμη 1 ώρα με τα δευτερογενή αντισώματα σημασμένα με Alexa fluor 488 και 568, αντίστοιχα. Τα πρωτογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 1:50 σε PBSTx1, ενώ τα δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 1:500 σε PBSTx1. Κατά την αλλαγή από το πρωτογενές στο δευτερογενές αντίσωμα αλλά και μετά την επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, πραγματοποιήθηκαν 2 εκπλύσεις των καλυπτρίδων με PBSx1. Τέλος, όπως και στην μικροσκοπία φθορισμού, οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με χρήση του μέσου επίστρωσης βασισμένο σε PVA (Psarra and Sekeris 2008) και στη συνέχεια ελήφθησαν εικόνες με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης απαλλαγμένο από ορμόνες, στο οποίο επώαστηκαν τα κύτταρα SH-SY5Y με τις ουσίες ACH και E2 για 2 ώρες περιείχε και 200nM CMX. Επίσης τα κύτταρα SH-SY5Y και τα κύτταρα των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών επώαστηκαν και με 1μg/ml Hoechst 33342, το οποίο προστέθηκε στο διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος.

Με χρήση του προγράμματος Image J (1.52p) πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων και η σχετική πυκνότητα φθορισμού υπολογίστηκε βάσει του τύπου «Total corrected fluorescence of area of interest (TCF) = integrated density – (selected area x mean

fluorescence of background readings)». Με χρήση του λογισμικού ZEN Zeiss LSM 800 και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson κατά την ποσοτική ανάλυση του συνεντοπισμού δύο υπό μελέτη χρωστικών.

2.11. Αξιολόγηση της παραγωγής ROS και του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης

Η παραγωγή ROS αξιολογήθηκε με τη χρήση της χρωστικής 6-καρβοξυ-H₂DCFDA (6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCF) η οποία μονιμοποιείται στις κυτταρικές μεμβράνες και οξειδώνεται, κατά της παραγωγή ROS, σε πράσινη φθορίζουσα χρωστική. Όσον αφορά τη μελέτη της μιτοχονδριακής λειτουργίας, αξιολογήθηκαν οι μεταβολές του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης χρησιμοποιώντας τη χρωστική JC-1 (5,5', 6,6' – tetrachloro - 1,1',3,3' - tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide). Η κατιονική χρωστική, JC-1, συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια και εκπέμπει πράσινο φθορισμό, ο οποίος μεταπίπτει σε κόκκινο μόνο σε «υγιή» μιτοχόνδρια. Έτσι ο λόγος της έντασης του πράσινου / κόκκινου φθορισμού αυξάνεται ανάλογα με την εκπόλωση των μιτοχονδριακών μεμβρανών.

Για την διεξαγωγή αυτών των μελετών διαφοροποιημένα νευρικά κύτταρα SH-SY5Y επώαστηκαν για 14-16 ώρες σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης απαλλαγμένο από ορμόνες. Έπειτα επώαστηκαν για 70-74 ώρες με 10⁻⁴M ACH και/ή 10⁻⁹M E2 σε ίδιο θρεπτικό. Μετά την επώαση των διαφοροποιημένων νευρικών κυττάρων SH-SY5Y με τις παραπάνω ουσίες πραγματοποιήθηκε έκπλυση αυτών με PBSx1 (37°C) και στη συνέχεια επώαση αυτών με 10μM DCF ή 2μM JC-1, για 30 λεπτά, σε θρεπτικό μέσο χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη απουσία κόκκινου της φαινόλης (37 °C). Η χρωστική JC-1 προστέθηκε στα κύτταρα μαζί με τη χρωστική Hoechst 33342 (1μg/ml), ενώ η χρωστική DCF μαζί με τις χρωστικές Hoechst 33342 (1μg/ml) και CMX (200nM). Ακολούθησε πλύση των κυττάρων με το ίδιο θρεπτικό και τέλος τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε ανάλυση συνεστιακής μικροσκοπίας (Zeiss laser scanning microscope 800, Zeiss LSM 800).

Η διέγερση φθορισμού της οξειδωμένης DCF χρωστικής πραγματοποιήθηκε στα 488nm και η εκπομπή φθορισμού μετρήθηκε στα 530-550nm. Το πράσινο σήμα JC-1 μετρήθηκε σε μήκος κύματος διέγερσης 488nm και σε μήκος κύματος εκπομπής 494-535nm, ενώ το κόκκινο σήμα JC-1 μετρήθηκε σε μήκος κύματος διέγερσης 560nm και σε μήκος κύματος εκπομπής

560-590nm. Η ποσοτικοποίηση της πυκνότητας φθορισμού της κάθε χρωστικής υπολογίστηκε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.10.

2.12. Δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας MTT

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του mtERβ στην κυτταρική βιωσιμότητα υπό συνθήκες στρες, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας MTT (Mosmann 1983). Τα κύτταρα των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών στρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας κυττάρων 96 πηγαδιών και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απαλλαγμένο από ορμόνες. Μετά από 40 - 48 ώρες, τα κύτταρα επώαστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις σταυροσπορίνης (Staurosporine, STS) ή H₂O₂ παρουσία ή απουσία E2 για 12 ώρες, όπως υποδεικνύεται στην ενότητα των αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν με 0,5mg/mL MTT για 3 ώρες στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Οι κρύσταλλοι φορμαζάνης που σχηματίστηκαν διαλύθηκαν με ισοπροπανόλη. Η ένταση χρώματος μετρήθηκε στα 570 nm (φίλτρο αναφοράς στα 690 nm).

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και κατά την διερεύνηση της εμπλοκής του mtERβ στο ρυθμό ανάπτυξης αδιαφοροποίητων ή διαφοροποιημένων νευρικών κυττάρων N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ.

2.13. PCR πραγματικού χρόνου (Real time PCR)

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των επιπέδων mRNA α) του ERβ κατά την αξιολόγηση των αποικιών της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ, β) της κυκλίνης D1 και του αναστολέα της κυκλινοεξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (Cyclin-dependent kinase, CDK) P21 στα κύτταρα N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, ύστερα από καλλιέργειά τους σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης απουσία RA (αναλυτικότερα στην ενότητα 3.1.6.), και γ) διαφόρων μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων, για τη διερεύνηση του ρόλου του mtERβ στη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Συγκεκριμένα αξιολογήθηκαν τα επίπεδα mRNA των δύο μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων rRNA, διαφόρων μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS και της πυρηνικά κωδικοποιούμενης υπομονάδας COX IV, στα κύτταρα SH-SY5Y και στα κύτταρα των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών, ύστερα από επώασή τους για 6 ώρες με τον αναστολέα πυρηνικής μεταγραφής α-αμανιτίνη (10 μg/ml) (Seifart and

Sekeris 1969, Lindell, Weinberg et al. 1970) ή / και για 1 ώρα με E2 ($10^{-9}M$) σε θρεπτικό μέσο απαλλαγμένο από ορμόνες.

Σε όλες τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες, ύστερα από την επώαση των κυττάρων με ουσίες, όπου αυτό προβλεπόταν, πραγματοποιήθηκε πλύση των κυττάρων με PBSx1 και απομόνωση του ολικού RNA με Trizol και κατεργασία του έπειτα με DNase σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Στη συνέχεια με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (superscript II reverse transcriptase) και χρήση τυχαίων εκκινητών (Random Hexamers) μετατράπηκε το RNA σε cDNA. Τέλος με εφαρμογή PCR πραγματικού χρόνου και χρήση της SYBR Green, του cDNA καθώς και κατάλληλων εκκινητών (Πίνακας 8) ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα mRNA του ERβ, της κυκλίνης D1, του P21, διαφόρων μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων, του COX IV και του μορίου κανονικοποίησης β-ακτίνη.

Οι συνθήκες διεξαγωγής της PCR (θερμικό προφίλ) ήταν:

52 °C, 2min	}	35 κύκλοι
95 °C, 2min		
95 °C, 15 sec		
60 °C, 40sec		
60 °C, 10min		

Πίνακας 8: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των PCR πραγματικού χρόνου, όπου h: Human και m: Mouse.

Εκκινητές	Forward	Reverse
h_ERβ	CGGAAGCTGGCTCACTTGCT	ATGCCTGACGTGGGACAGGA
h_12S rRNA	AAACTGCTCGCCAGAACACTACGA	TGAGCAAGAGGTGGTGAGGTTGAT
h_16S rRNA	TACCCTCACTGTCAACCCAACACA	TTAAACATGTGTCACTGGGCAGGC
h_ND 1	ATGGCCAACCTCCTACTCCTCATT	TTATGGCGTCAGCGAAGGGTTGTA
h_ND 2	CCATCTTTGCAGGCACACTCATCA	ATTATGGATGCGGTTGCTTGCCTG
h_COX I	ACCCTAGACCAAACCTACGCCAAA	TAGGCCGAGAAAGTGTGTGGGAA
h_COX II	ACAGATGCAATTCCCGGACGTCTA	GGCATGAAACTGTGGTTTGCTCCA
h_ATP8	ACCGTATGGCCCACCATAATTACC	TTTATGGGCTTTGGTGAGGGAGGT
h_ATP6	ACATTACTIONGCAGGCCACCTACTCA	ACGTAGGCTTGGATTAAGGCGACA
h_COX III	TCACTTCCACTCCATAACGCTCCT	GTGTTACATCGCGCCATCATTGGT
h_ND 3	GCCCTACAAACAACCTAACCTGCCA	ATAGGCCAGACTTAGGGCTAGGAT
h_ND 4L	TATCGCTCACACCTCATATCCTCCCT	AGGCGGCAAAGACTAGTATGGCAA
h_ND 4	AGCTCCATCTGCCTACGACAAACA	TAAGCCCGTGGGCGATTATGAGAA

h_ND 5	CACAGCAGCCATTCAAGCAATCC	ACCTAATTGGGCTGATTTGCCTGC
h_ND 6	ATAGGATCCTCCCGAATCAACCCT	AGGATTGGTGCTGTGGGTGAAAGA
h_Cyt b	AGTCCCACCCTCACACGATTCTTT	AGTAAGCCGAGGGCGTCTTTGATT
h_COX IV	AGAAAGTCGAGTTGTATCGCATT	GATAACGAGCGCGGTGAAAC
h_β-actin	GGAGCAATGATCTTGATCTT	CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT
m_κυκλίνη D1	GCCCTCCGTATCTTACTTCAA	CATTTGCAGCAGCTCCTCG
m_P21	AGCCTGACAGATTTCTATCACTC	TTTAAGTTTGGAGACTGGGAGAG
m_12S rRNA	CTTGCCTAGCCACACCCCCA	AATCGTATGACCGCGGTGGC
m_ND 1	CCCCTTCGACCTGACAGAAG	GGGCCGGCTGCGTATT
m_COX I	GAAGAGACAGTGTTCATGTGGTGT	TCCTGGGCCTTTCAGGAATA
m_COX II	ACCTGGTGAACACTACGACTGCT	TTAGTCGGCCTGGGATGGCA
m_ATP 6	AATTACAGGCTTCCGACACAAAC	TGGAATTAGTGAAATTGGAGTTCCT
m_ND 4	CGCCTACTCCTCAGTTAGCCACA	ACGGCTGTGGATCCGTTCTG
m_Cyt b	TTATCGCGGCCCTAGCAA	TAATCCTGTTGGGTTGTTTGATCC
m_COX IV	CCATGTCACGATGCTGTCTG	CTCCCAAATCAGAACGAGCG
m_β-actin	TGTGACGTTGACATCCGTAA	GCTAGGAGCCAGAGCAGTAA

2.14. Μιτοχονδριακή κλασμάτωση

Για τον έλεγχο της υποκυτταρικής εντόπισης του ERβ, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των κυττάρων SH-SY5Y για 2 ημέρες σε 150mm πιάτα καλλιέργειας κυττάρων με θρεπτικό μέσο απαλλαγμένο από ορμόνες. Στη συνέχεια επωάστηκαν με 10^{-8} M DPN ή 10^{-9} M E2 (Marzagalli, Casati et al. 2015), και χρήση ίδιας σύστασης θρεπτικού, για 3 ώρες. Έπειτα πραγματοποιήθηκε έκπλυση των κυττάρων με PBSx1 και συλλογή τους με το διάλυμα κλασμάτωσης A (Πίνακας 3), το οποίο περιείχε κατάλληλη συγκέντρωση αναστολέων πρωτεασών (0,02M PMSF, 1/100 Proteases Inhibitors – Roche και 1M DTT). Η ομογενοποίηση που ακολούθησε πραγματοποιήθηκε στα 2000rpm με χρήση του μηχανικού ομογενοποιητή Potter Elvehjem με 10-20 επαναλαμβανόμενες ανόδους και καθόδους αυτού κατά το κατακόρυφο άξονα, σε πάγο. Μετά την ομογενοποίηση αποθηκεύτηκε από κάθε συνθήκη μια ποσότητα του ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος (Total extract, TE).

Η μέθοδος της υποκυτταρικής κλασμάτωσης βασίζεται στο γεγονός ότι τα διάφορα υποκυτταρικά οργανίδια έχουν διαφορετικό φορτίο, πυκνότητα και μέγεθος. Έτσι με

διαφορικές φυγοκεντρήσεις και στη συνέχεια με χρήση του διαλύματος κλασμάτωσης B επιτεύχθηκε η απομόνωση εμπλουτισμένων μιτοχονδρίων. Το πρωτόκολλο απομόνωσης μιτοχονδριακών κλασμάτων, που χρησιμοποιήθηκε, αναφέρεται αναλυτικά στη δημοσίευση (Psarra, Solakidi et al. 2005). Τα δύο διαφορετικά κλάσματα που συλλέχτηκαν είναι τα εξής: 1) το μεταμιτοχονδριακό υπερκείμενο (PostMitochondrial fraction, PM), το οποίο περιέχει κυτταροπλασματικά συστατικά, όπως το κυτταρόπλασμα και διάφορα μικροσωμάτια και 2) το εμπλουτισμένο σε μιτοχόνδρια κλάσμα (Mitochondrial fraction, Mito).

2.15. Μέτρηση επιπέδων της ATP

Η ολική ATP των κυττάρων SH-SY5Y, N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ μετρήθηκε όπως περιγράφεται στο ακόλουθο άρθρο από τους Psarra & Sekeris (Psarra and Sekeris 2011). Εν συντομία, αφού τα κύτταρα στρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας κυττάρων 24 θέσεων και καλλιεργήθηκαν για 48 ώρες σε θρεπτικό μέσο απαλλαγμένο από ορμόνες, επώαστηκαν τα μεν N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ παρουσία ή απουσία 0,2M ροτενόνης για 16 ώρες και τα δε SH-SY5Y παρουσία ή απουσία 10^{-9} M E2, 10^{-8} M DPN ή 0,2M ροτενόνης, καθώς και με συνδυασμό αυτών των ουσιών, για 16 ώρες. Η ροτενόνη είναι αναστολέας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (Li, Ragheb et al. 2003, Psarra and Sekeris 2011, Han, Casson et al. 2014) και χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας, για τον καθορισμό του ποσοστού της μιτοχονδριακής προέλευσης ATP. Ακολούθησε έκπλυση με PBSx1 και συλλογή των κυττάρων με διάλυμα λύσης το οποίο περιείχε κατάλληλη ποσότητα αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών (1/100 Proteases Inhibitors, 2mM DTT, 10μM PMSF, 10mM NaF, 1mM Sodium Pyrophosphate και 4mM EDTA διαλυτοποιημένα σε ddH₂O). Η ATP εξάχθηκε με 1% τριχλωροξικό οξύ και η περιεκτικότητα των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε ATP μετρήθηκε σε λουμινόμετρο χρησιμοποιώντας το κιτ αντίδρασης λουσιφερίνης – λουσιφεράσης Enliten και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πριν την εξαγωγή της ATP από τα κυτταρικά εκχυλίσματα κρατήθηκε μια ποσότητα κυτταρικών εκχυλισμάτων από κάθε συνθήκη ώστε να πραγματοποιηθεί φασματοφωτομετρική μέθοδος Bradford για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών και την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

2.16. In vivo πειράματα καρκινογένεσης σε μύες

Για την διεξαγωγή αυτής της σειράς πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί μύες στελέχους 1303, της εταιρείας «The Jackson Laboratory», οι οποίοι ήταν ανοσοκατεσταλμένοι. Τα in vivo πειράματα καρκινογένεσης στους μύες διεξήχθησαν σε ειδικό χώρο πειραματόζων (EL 42 BIO/br1), που εδράζεται στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, με Επιστημονικό Υπεύθυνο τον Δρ. Κων/νο Δήμα (Άδεια: PD 56/2013, 2215/117550/2013, αριθμός πρωτοκόλλου 5542/228006). Η θερμοκρασία του ειδικά διαμορφωμένου χώρου της φιλοξενίας των μυών ήταν μεταξύ 20-22°C, παρουσία 50-60% υγρασίας και σε συνθήκη 12 ωρών φωτός και αντίστοιχα 12 ωρών σκοταδιού. Επίσης οι μύες είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και φαγητό.

2.16.1. Εμβολιασμός μυών με τις σταθερές κυτταρικές σειρές N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ και με την κυτταρική σειρά N2A wt

Στελέχη θηλυκών μυών 1303 εμβολιάστηκαν με κύτταρα των κυτταρικών σειρών N2AmtGFP, N2AmtGFPERβ και N2A wt με χρήση θρεπτικού DMEM χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη. Στην πίσω μασχαλιαία χώρα υποδόρια σε κάθε μυ πραγματοποιήθηκαν δύο εμβολιασμοί, ένας σε κάθε πόδι, και κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των όγκων διεξάγονταν, με χρήση παχύμετρου, μετρήσεις των αναπτυσσόμενων όγκων.

2.16.2. Αφαίρεση όγκων και απομόνωση μιτοχονδριακών κλασμάτων

Αφού αναπτύχθηκαν οι όγκοι, αφαιρέθηκαν από τους μύες και μεταφέρθηκαν σε πάγο όπου παρέμειναν για όλες τις ακόλουθες διαδικασίες, δηλαδή τεμαχισμό, ομογενοποίηση και απομόνωση μιτοχονδριακών κλασμάτων. Συνοπτικά σε κάθε όγκο ή διαδοχικά σε τμήματα αυτού προστέθηκε διάλυμα λύσης A, μαζί με κατάλληλη ποσότητα αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών, σε αναλογία 4ml διαλύματος / 1gr ιστού. Η σύσταση του διαλύματος κλασμάτωσης A καθώς και η συγκέντρωση των αναστολέων φωσφατασών και πρωτεασών απεικονίζονται στον Πίνακα 3. Η διαδικασία απομόνωσης μιτοχονδριακών κλασμάτων αναλύεται στην ενότητα 2.14. Τα δύο διαφορετικά κλάσματα που συλλέχτηκαν ήταν το μεταμιτοχονδριακό υπερκείμενο (PM) και το εμπλουτισμένο σε μιτοχόνδρια (Mito).

2.16.3. Βιοχημική ανάλυση των παραγόμενων όγκων

Με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western, αναλυτικά στην ενότητα 2.9, σε ολικά ομογενοποιημένα και σε κυτταροπλασματικά (PM) και μιτοχονδριακά (Mito) κλάσματα όγκων, που αναπτύχθηκαν από τον εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές N2AmtGFPERβ, N2AmtGFP και N2A wt, αξιολογήθηκαν διάφορα πρωτεϊνικά μόρια που συμμετέχουν σε μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών με στόχο τη διερεύνηση της εμπλοκής του mtERβ στην καρκινογένεση.

2.17. Στατιστική επεξεργασία

Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τη μέση τιμή \pm SD και η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε χρησιμοποιώντας τα λογισμικά SPSS και StatPlus LE 7.3.0 με μονόδρομη ή αμφίδρομη ανάλυση διακύμανσης (one-way or two-way ANOVA) που ακολουθείται από Tukeys's post-hoc test. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σε δίπλευρη κατανομή με P value <0.05.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Διερεύνηση της εμπλοκής του μιτοχονδριακού ERβ (mtERβ) σε διάφορες μιτοχονδριακές διεργασίες

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος που διαδραματίζει ο ERβ στο μιτοχόνδριο και πιο συγκεκριμένα η εμπλοκή του στις διάφορες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε αυτό, όπως η μιτοχονδριακή μεταγραφή, η απόπτωση, το οξειδωτικό στρες κ.α., κατασκευάστηκε κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού N2A που υπερεκφράζει σταθερά τον ERβ, υπό μορφή χιμαιρικής πρωτεΐνης με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP με μιτοχονδριακή στόχευση (N2AmtGFPERβ). Παράλληλα κατασκευάστηκε και η αντίστοιχη κυτταρική σειρά αναφοράς που υπερεκφράζει την GFP με μιτοχονδριακή στόχευση (N2AmtGFP).

3.1.1. Επιλογή και χαρακτηρισμός των αποικιών των σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ

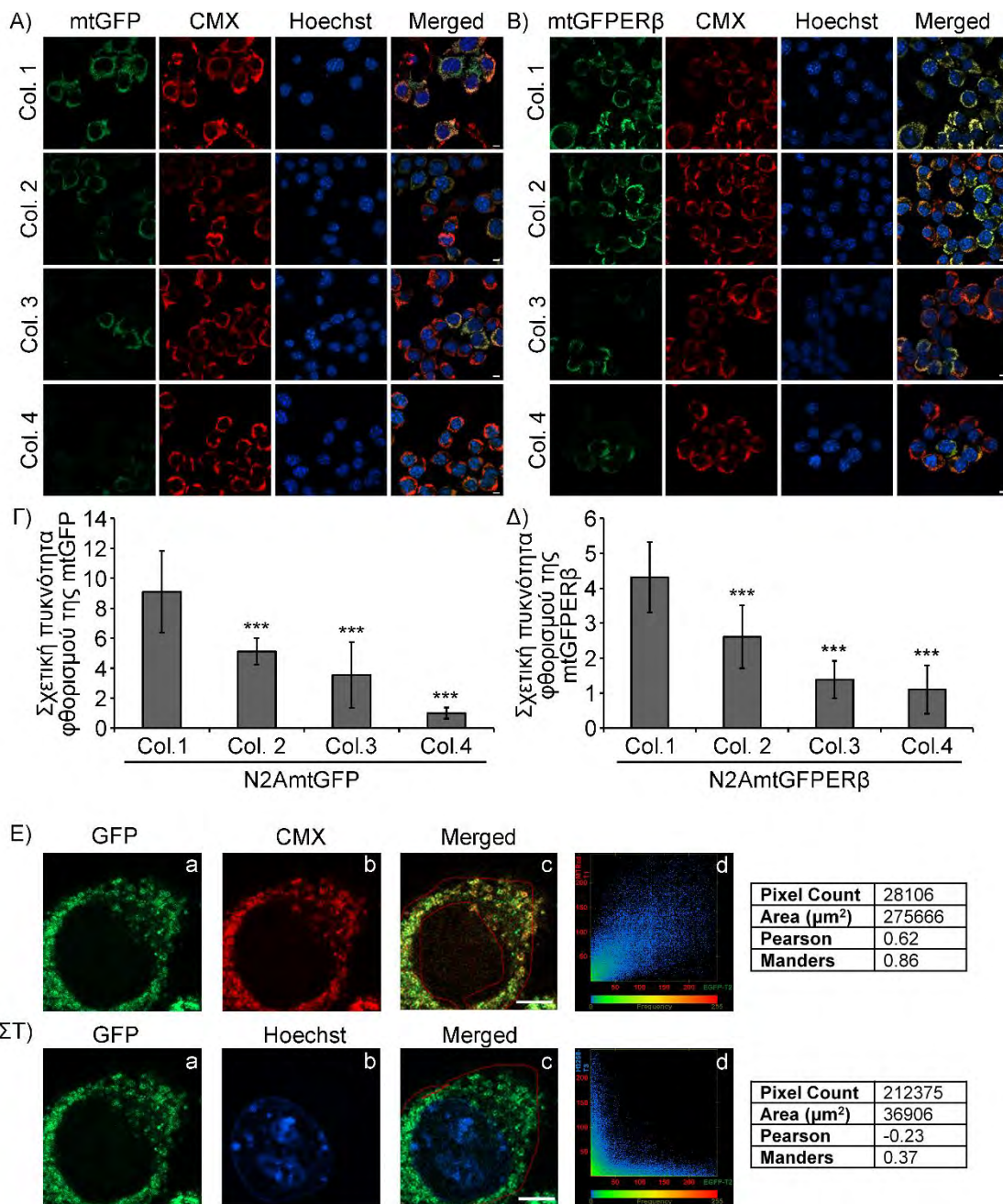
Οι θετικά διαμολυσμένες αποικίες των δύο τροποποιημένων κυτταρικών σειρών (N2AmtGFP, N2AmtGFPERβ), αφού συλλέχθηκαν με βάση την έκφραση της GFP πρωτεΐνης, αξιολογήθηκαν αρχικά με εφαρμογή μικροσκοπίας φθορισμού και χρήση του κόκκινου φθορίζοντος μιτοχονδριακού ιχνηθέτη CMX ως προς τη μιτοχονδριακή έκφραση των GFP και GFPERβ πρωτεϊνών, αντίστοιχα. Στην Εικόνα 13 παρατηρούμε το συνεντοπισμό της χρωστικής GFP με το μιτοχονδριακό δείκτη CMX σε όλες τις επιλεγμένες αποικίες των σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών N2AmtGFP (Εικόνα 13Α) και N2AmtGFPERβ (Εικόνα 13Β). Η ποσοτικοποίηση των σχετικών επιπέδων φθορισμού των πρωτεϊνών mtGFP και mtGFPERβ στις αντίστοιχες αποικίες των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.10., και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην Εικόνα 13Γ και 13Δ. Στη συνέχεια, ποσοτική ανάλυση του συνεντοπισμού της χρώσης GFP με τη χρώση CMX (Εικόνα 13Ε) ανέδειξε συντελεστή συσχέτισης του Pearson 0.75 και 0.62, για τα κύτταρα N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ αντίστοιχα, υποδεικνύοντας το συνεντοπισμό της GFP με τη μιτοχονδριακή χρώση CMX και επιβεβαιώνοντας το μιτοχονδριακό εντοπισμό της πρωτεΐνης GFP και στις δύο κυτταρικές σειρές. Ομοίως διεξήχθη ποσοτική ανάλυση συνεντοπισμού της GFP με την πυρηνική χρώση Hoechst 33342 (Εικόνα 13ΣΤ), η οποία ανέδειξε συντελεστή συσχέτισης του Pearson 0.25 και 0.23, για τα κύτταρα N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ

αντίστοιχα, υποδεικνύοντας το μη συνεντοπισμό των δύο χρωστικών, και κατ' επέκταση τη μη πυρηνική εντόπιση των πρωτεϊνών mtGFP και mtGFPERβ (Tsialtas, Georgantopoulos et al. 2021).

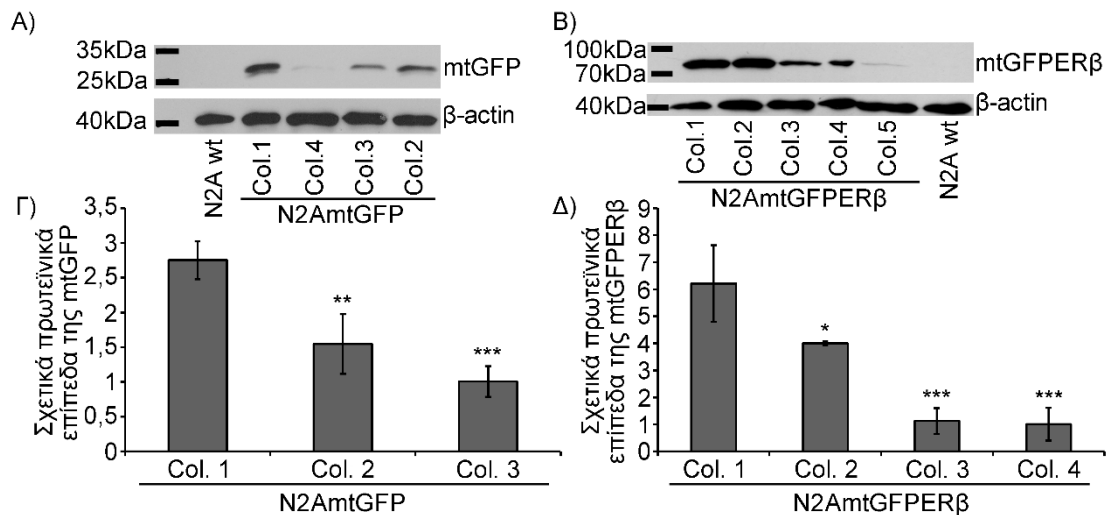
Στη συνέχεια με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρήση αντισώματος έναντι της GFP (Εικόνα 14A, 14B) αξιολογήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των mtGFP και mtGFPERβ στις διάφορες αποικίες των δύο κυτταρικών σειρών. Στις Εικόνες 14Γ και 14Δ απεικονίζεται η αντίστοιχη ποσοτικοποίηση. Παρατηρούμε ότι η αποικία 1 της κυτταρικής σειράς N2AmtGFP εμφανίζει 2 με 3 φορές υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της mtGFP (Εικόνα 14A, 14Γ) και η αποικία 1 της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ 2 με 8 φορές υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της mtGFPERβ (Εικόνα 14B, 14Δ), σε σύγκριση με τις υπόλοιπες αποικίες που επιλέχτηκαν από την κάθε κυτταρική σειρά (Tsialtas, Georgantopoulos et al. 2021).

Για περαιτέρω αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων και επιπέδων mRNA του mtGFPERβ και για επαλήθευση της μιτοχονδριακής του έκφρασης διεξήχθησαν πειράματα ανοσοκυταρροχημείας και ανοσοαποτύπωσης κατά Western, με χρήση αντισώματος έναντι του ERβ ανθρώπινης προέλευσης (B-3, Santa Cruz Biotechnology), και πειράματα Real time PCR, με χρήση κατάλληλων εκκινητών έναντι του mRNA του ανθρώπινου ERβ.

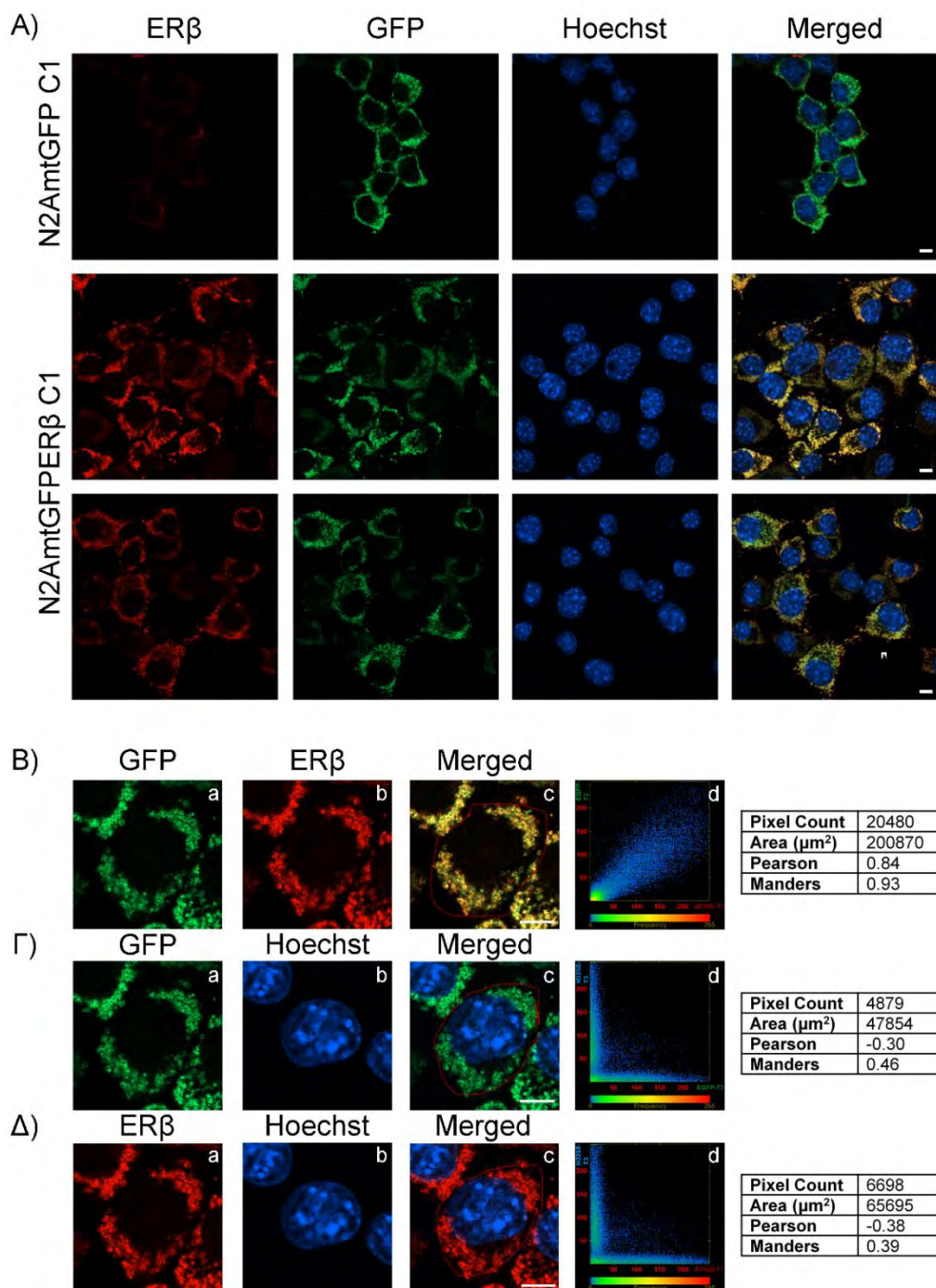
Στην Εικόνα 15A παρατηρούμε το συνεντοπισμό του ERβ με τη μιτοχονδριακή GFP στα κύτταρα της αποικίας 1 της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. Η ποσοτική ανάλυση του συνεντοπισμού της GFP με το σημασμένο με κόκκινη χρωστική ERβ (Εικόνα 15B) ανέδειξε συντελεστή συσχέτισης του Pearson 0.84, γεγονός που επιβεβαιώνει τόσο το μιτοχονδριακό εντοπισμό της mtGFPERβ όσο και την έκφραση της ως χμιαρική πρωτεΐνη. Όπως ήταν αναμενόμενο η ποσοτική ανάλυση του συνεντοπισμού της Hoechst με την GFP (Εικόνα 15Γ) και τον ERβ (Εικόνα 15Δ) ανέδειξε συντελεστή συσχέτισης του Pearson -0.30 και -0.38, αντίστοιχα, επαληθεύοντας τη μη πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης mtGFPERβ (Tsialtas, Georgantopoulos et al. 2021).



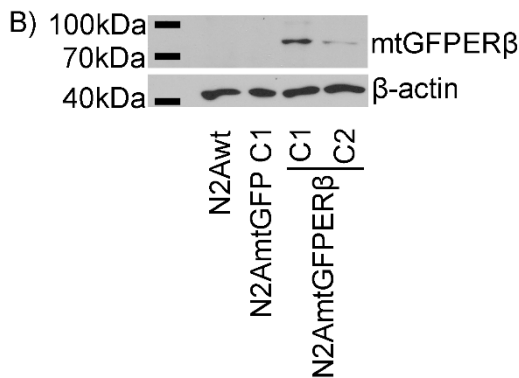
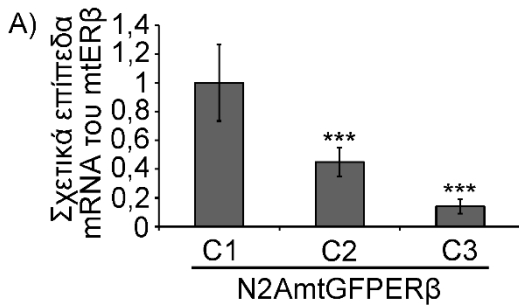
Εικόνα 13: Χαρακτηρισμός των αποικιών των σταθερών κυτταρικών σειρών N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ ως προς τα επίπεδα έκφρασης καθώς και τη μιτοχondριακή έκφραση της GFP. Αντιπροσωπευτικές εικόνες των αποικιών των κυτταρικών σειρών N2AmtGFP (**A**) και N2AmtGFPERβ (**B**), που ελήφθησαν με εφαρμογή συνεστιακής μικροσκοπίας, με στόχο την αξιολόγηση των επιπέδων έκφρασης της GFP. Οι χρωστικές CMX και Hoechst 33342 χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό και τη σήμανση των μιτοχondρίων και των πυρήνων, αντίστοιχα. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 10μm. Στις εικόνες **Γ** και **Δ** απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση της πυκνότητας φθορισμού της GFP στις αποικίες των δύο σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών. Το χαμηλότερο επίπεδο πυκνότητας φθορισμού της GFP στην αντίστοιχη αποικία της κάθε κυτταρικής σειράς ορίστηκε ως 1. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n=30-50), *** p < 0.001 σε σύγκριση με την αντίστοιχη αποικία 1 της κάθε κυτταρικής σειράς. Όπου Col. (Colony), αποικία. **E**, **ΣΤ**) Αντιπροσωπευτικές εικόνες που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτική ανάλυση του συνεντοπισμού της GFP με την χρωστική CMX (**E**) και Hoechst (**ΣΤ**) στα κύτταρα της αποικίας 1 της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. Η περιοχή ενδιαφέροντος (ROI) σημαίνεται με κόκκινο χρώμα (**Ec** και **ΣΤc**). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 10μm. Η γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων του συνεντοπισμού φαίνεται στο **Ed** και **ΣΤd** ακολουθούμενη από πίνακες με τα δεδομένα της ανάλυσης συνεντοπισμού. Η ποσοτική ανάλυση συνεντοπισμού, προσδιορίζοντας το συντελεστή συσχέτισης του Pearson και τον συντελεστή επικάλυψης του Manders, πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού ZEN Zeiss LSM 800.



Εικόνα 14: Χαρακτηρισμός των αποικιών των σταθερών κυτταρικών σειρών N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ ως προς τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών GFP και GFPERβ. **A, B)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των μορίων GFP και β-ακτίνης σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από τις αντίστοιχες αποικίες των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των GFP και GFPERβ κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Στις εικόνες **Γ** και **Δ** απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της GFP και της GFPERβ, αντίστοιχα. Το χαμηλότερο επίπεδο έκφρασης των πρωτεϊνών GFP και GFPERβ στην αντίστοιχη αποικία της κάθε κυτταρικής σειράς ορίστηκε ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n=3), * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, σε σύγκριση με την αντίστοιχη αποικία 1 της κάθε κυτταρικής σειράς. Όπου Col. (Colony), αποικία.



Εικόνα 15: Χαρακτηρισμός της αποικίας 1 της σταθερής κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ ως προς την έκφραση της χμαιρικής πρωτεΐνης mtGFPERβ πραγματοποιώντας μελέτες συνεντοπισμού του ERβ με τη μιτοχονδριακή GFP. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες που ελήφθησαν με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας ύστερα από εφαρμογή ανοσοφθορισμού και χρήση πρωτογενούς αντισώματος έναντι του ERβ (B-3, Santa Cruz Biotechnology) και δευτερογενούς αντισώματος Alexa 568 (κόκκινο) σε κύτταρα των αποικιών 1 των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών. Η χρωστική Hoechst 33342 χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση των πυρήνων. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 10μm. Όπου C (Colony), αποικία. **B-Δ)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτική ανάλυση του συνεντοπισμού των χρώσεων **B)** GFP και ERβ, **Γ)** GFP και Hoechst 33342 και **Δ)** ERβ και Hoechst σε κύτταρα της αποικίας 1 της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. Η περιοχή ενδιαφέροντος (ROI) σημαίνεται με κόκκινο χρώμα (**Bc**, **Γc** και **Δc**). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 10μm. Η γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων του συνεντοπισμού φαίνεται στο **Bd**, **Γd** και **Δd** ακολουθούμενη από πίνακες με τα δεδομένα της ανάλυσης συνεντοπισμού. Η ποσοτική ανάλυση συνεντοπισμού, προσδιορίζοντας το συντελεστή συσχέτισης του Pearson και τον συντελεστή επικάλυψης του Manders, πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού ZEN Zeiss LSM 800.



Εικόνα 16: Έλεγχος των επιπέδων mRNA του ERβ και της παραγόμενης πρωτεΐνης mtGFPERβ σε αποικίες της σταθερής κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. **A)** Αποτίμηση των σχετικών επιπέδων mRNA του ERβ με εφαρμογή Real time PCR και χρήση κατάλληλων εκκινητών (h_ERβ, m_β-ακτίνη), σε τρεις αποικίες της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές έναντι της β-ακτίνης. Το υψηλότερο επίπεδο έκφρασης mRNA στην αντίστοιχη αποικία ορίστηκε ως 1. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 4-5), *** p < 0.001, σε σύγκριση με την αποικία 1. **B)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των μορίων ERβ (B-3, Santa Cruz Biotechnology) και β-ακτίνης σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από αποικίες των σταθερών κυτταρικών σειρών N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ αλλά και της κυτταρικής σειράς N2A wt. Όπου C (Colony), αποικία.

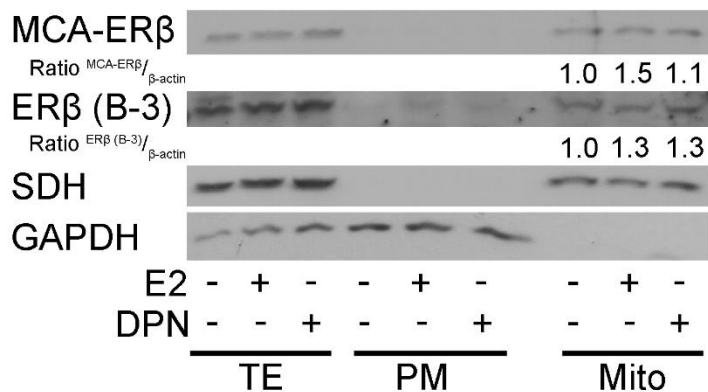
Με εφαρμογή Real time PCR επιβεβαιώθηκε η υπερέκφραση του ERβ στην αποικία 1 της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 16A η αποικία 1 εμφανίζει 2 με 3 φορές υψηλότερα επίπεδα mRNA του ERβ σε σύγκριση με τις αποικίες 2 και 3 της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ. Στη συνέχεια με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western και με χρήση αντισώματος έναντι του ERβ ανθρώπινης προέλευσης (B-3, Santa Cruz Biotechnology) (Εικόνα 16B), η πρωτεΐνη mtGFPERβ ανιχνεύτηκε μόνο στα κύτταρα N2AmtGFPERβ, και όχι στα κύτταρα N2AmtGFP και N2A wt, σε μοριακό βάρος που αποτελεί το άθροισμα των επιμέρους μοριακών βαρών των δύο πρωτεϊνών, GFP και ERβ, επαληθεύοντας την έκφρασή της ως χιμαιρική πρωτεΐνη (Tsialtas, Georgantopoulos et al. 2021).

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων η αποικία 1 της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ και η αποικία 1 της κυτταρικής σειράς N2AmtGFP, οι οποίες εκφράζουν τα υψηλότερα επίπεδα των mtGFPERβ και mtGFP πρωτεϊνών, αντίστοιχα, χρησιμοποιήθηκαν για όλες τις παρακάτω πειραματικές διαδικασίες.

3.1.2. Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στην έκφραση μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS

Ο ρόλος του mtERβ στη μιτοχονδριακή μεταγραφή μελετήθηκε εφαρμόζοντας Real time PCR και αξιολογώντας τα επίπεδα mRNA διαφόρων μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS, καθώς και της πυρηνικά κωδικοποιούμενης υπομονάδας OXPHOS, COX IV, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μόριο αναφοράς. Τόσο τα κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπου SH-SY5Y όσο και οι σταθερές κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος ποντικού, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες αυτές, αφού πρώτα επώαστηκαν για 6 ώρες με τον αναστολέα της πυρηνικής αλλά όχι της μιτοχονδριακής μεταγραφής, α -αμανιτίνη (10 $\mu\text{g/ml}$), αναστέλλοντας τη δράση της πολυμεράσης II του πυρήνα (Seifart and Sekeris 1969, Lindell, Weinberg et al. 1970), και / ή για 1 ώρα με 10^{-9}M E2.

Στο σημείο αυτό να επισημάνουμε ότι τα κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y εμφανίζουν αυξημένα ενδογενή πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020), σε σχέση με άλλες αντίστοιχες κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος, και παλιότερες μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας, τόσο της ερευνητικής μας ομάδας όσο και άλλων, υποστηρίζουν τον εντοπισμό του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς (Liang, Xie et al. 2015, Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020), γεγονός που ενισχύεται παρουσία E2 (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε περαιτέρω στην παρούσα μελέτη, μετά από ενεργοποίηση του ERβ τόσο από την E2 όσο και από τον ειδικό προσδέτη του DPN (Marzagalli, Casati et al. 2015). Αναλυτικότερα, κύτταρα SH-SY5Y επώαστηκαν με 10^{-8}M DPN ή 10^{-9}M E2 για 3 ώρες, ακολούθησε μιτοχονδριακή κλασμάτωση στα κυτταρικά εκχυλίσματα αυτών και τέλος με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρήση αντισωμάτων έναντι του ERβ (MCA_Serotec, B-3_Santa Cruz Biotechnology) ελέγχθηκε η υποκυτταρική εντόπιση του υποδοχέα. Στην Εικόνα 17 απεικονίζεται ο μιτοχονδριακός εντοπισμός του ERβ στα μιτοχόνδρια των κυττάρων SH-SY5Y, ο οποίος αυξάνεται παρουσία τόσο της E2 όσο και του DPN.

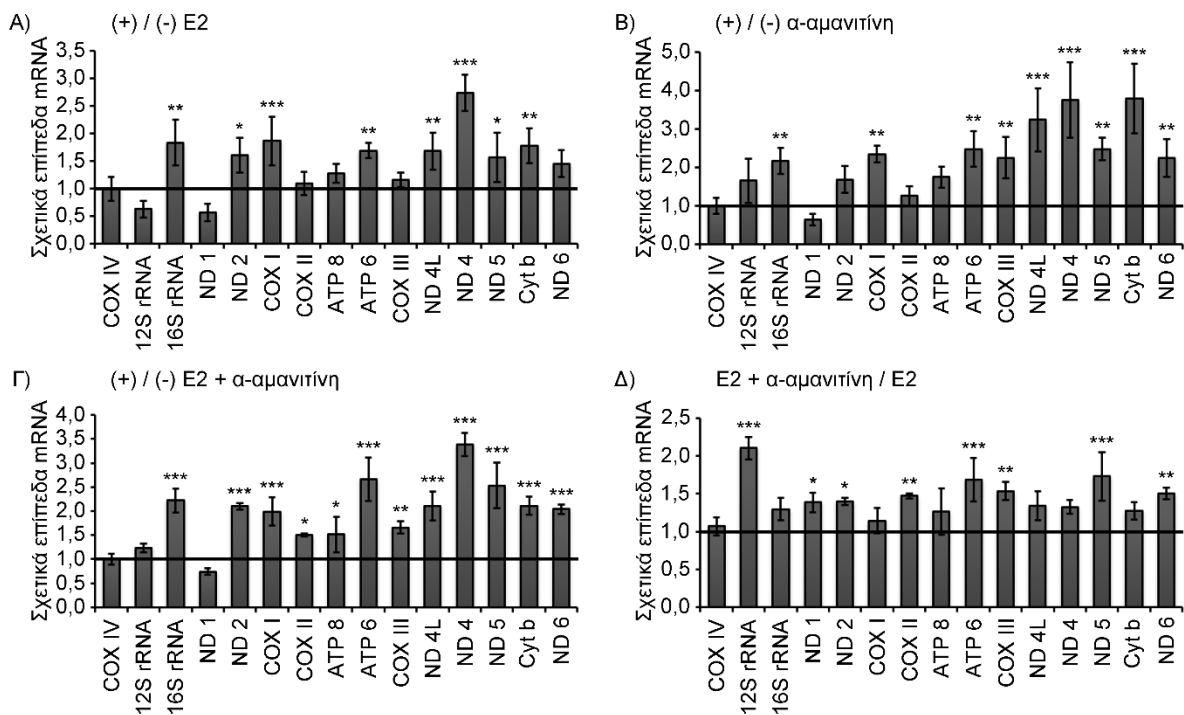


Εικόνα 17: Ενεργοποίηση της μετακίνησης του ERβ στα μιτοχόνδρια παρουσία ειδικών προσδετών του υποδοχέα. Αντιπροσωπευτικές εικόνες της υποκυτταρικής εντόπισης του ERβ που προέκυψαν με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρήση κατάλληλων αντισωμάτων έναντι του ERβ (MCA_Serotec, B-3_Santa Cruz Biotechnology) σε ολικά, κυτταροπλασματικά και μιτοχονδριακά κλάσματα από κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία είχαν επωαστεί με 10^{-9} M E2 ή 10^{-8} M DPN για 3 ώρες. Οι τιμές Ratio (λόγος) προέκυψαν μετά από την κανονικοποίηση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ με τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της SDH και εκφράζονται ως σχετικές τιμές σε σχέση με αυτές των κυττάρων αναφοράς.

Τα αποτελέσματα διερεύνησης της απ' ευθείας ρύθμισης της έκφρασης μιτοχονδριακών γονιδίων από τον mtERβ με εφαρμογή Real time PCR στα κύτταρα SH-SY5Y και στα κύτταρα των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών απεικονίζονται στις εικόνες 18 και 19 αντίστοιχα και προέκυψαν τόσο από την παρούσα μελέτη - διδακτορική διατριβή, όσο και από παλιότερες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας - Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία Αχιλλέα Γεωργαντόπουλου.

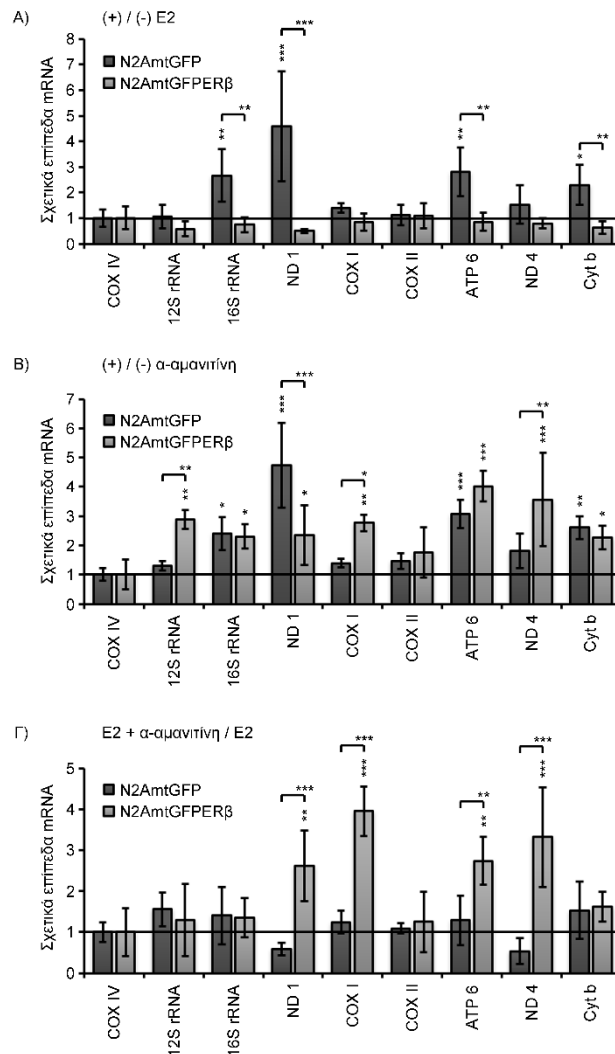
Στα κύτταρα SH-SY5Y, τόσο παρουσία E2 όσο και παρουσία α-αμανιτίνης παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων mRNA των περισσότερων μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS. Ειδικότερα παρατηρούμε 1,5 έως 3 φορές αύξηση των επιπέδων mRNA των 16S rRNA, ND 2, COX I, ATP 6, ND 4L, ND 4, ND 5 και Cyt b παρουσία E2 «(+)/(-) E2» (Εικόνα 18A), και 2 έως 4 φορές αύξηση των επιπέδων mRNA των 16S rRNA, COX I, ATP 6, COX III, ND 4L, ND 4, ND 5, ND 6 και Cyt b, παρουσία α-αμανιτίνης «(+)/(-) α-αμανιτίνη» (Εικόνα 18B), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του COX IV, της κάθε συνθήκης. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει διατήρηση της ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής μεταγραφής σε συνθήκες αναστολής της πυρηνικής μεταγραφής (συνεπώς και της αναστολής της έκφρασης των πυρηνικά κωδικοποιούμενων OXPHOS καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν τη μιτοχονδριακή μεταγραφή). Επομένως, συμπεραίνουμε ότι η όποια παρατηρούμενη ενεργοποίηση οφείλεται σε ενεργοποίηση σε τοπικό επίπεδο, εντός των μιτοχονδρίων. Ομοίως, κατά τη συνεπώαση των κυττάρων και με

τις δύο ουσίες (παρουσία και απουσία E2 και α -αμανιτίνης, «(+) / (-) E2 και α -αμανιτίνη») (Εικόνα 18Γ) 12 από τα 14 μόρια που ελέγχθηκαν εμφανίζουν 1,5 με 3,5 φορές στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των mRNA τους σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα της πυρηνικά κωδικοποιούμενης υπομονάδας COX IV (Τιμή «1»), υποδεικνύοντας και πάλι ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής απ' ευθείας από τον mtERβ. Επιπρόσθετα στην Εικόνα 18Δ όπου απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA που προέκυψαν από τη δράση των δύο ουσιών ως προς τα επίπεδα mRNA που προέκυψαν από ένα ήδη ενεργοποιημένο σύστημα από την E2 «E2 + α -αμανιτίνης / E2» παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση



Εικόνα 18: Διατήρηση της μεταγραφής μιτοχονδριακών OXPHOS παρουσία α -αμανιτίνης και ενεργοποίηση αυτής παρουσία E2 στα κύτταρα SH-SY5Y. Εκτίμηση των σχετικών επιπέδων mRNA διαφόρων μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων καθώς και του πυρηνικά κωδικοποιούμενου μορίου COX IV, ύστερα από επώαση των κυττάρων SH-SY5Y για 6 ώρες με τον αναστολέα πυρηνικής μεταγραφής α -αμανιτίνη (10 μ g/ml) ή / και για 1 ώρα με 10^{-9} M E2, με εφαρμογή Real time PCR και χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές έναντι της β -ακτίνης. Τα επίπεδα mRNA που απεικονίζονται εκφράζονται ως εξής: **(Α)** τα επίπεδα mRNA του εκάστοτε μορίου κατά την επώαση των κυττάρων με E2 ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του ίδιου μορίου κατά την επώαση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο απουσία E2, (+) E2 / (-) E2. Ομοίως **(Β)** (+) / (-) α -αμανιτίνης, **(Γ)** (+) / (-) E2 + α -αμανιτίνης και τέλος **(Δ)** E2 + α -αμανιτίνης / E2. Τα επίπεδα mRNA του COX IV ορίστηκαν ως 1. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή \pm S.D. (n=3), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, σε σύγκριση με επίπεδα mRNA του COX IV. 12/16S rRNA, 12/16S ribosomal RNA; ND, NADH dehydrogenase; COX, Cytochrome c oxidase; CYT B, Cytochrome b.

κατά 1,5 με 2 φορές των επιπέδων mRNA των 12S rRNA, ND 1, ND 2, COX II, ATP 6, COX III, ND 5 και ND 6 σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του COXIV. Η παρατήρηση αυτή, αναδεικνύει την άμεση δράση της E2 στην ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής.



Εικόνα 19: Ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής παρουσία ή απουσία E2 υπό συνθήκες αναστολής της πυρηνικής μεταγραφής και υπερέκφρασης του mtERβ. Εκτίμηση των επιπέδων mRNA διαφόρων μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων καθώς και της πυρηνικά κωδικοποιούμενης υπομονάδας COX IV, ύστερα από κατεργασία των κυττάρων N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ για 6 ώρες με τον αναστολέα πυρηνικής μεταγραφής α-αμανιτίνη (10 μg/ml) ή / και για 1 ώρα με 10^{-9} M E2, με εφαρμογή Real time PCR και χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές έναντι της β-ακτίνης. Τα επίπεδα mRNA που απεικονίζονται εκφράζονται ως εξής: **(Α)** τα επίπεδα mRNA του εκάστοτε μορίου κατά την επώαση των κυττάρων με E2 ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του ίδιου μορίου κατά την επώαση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο απουσία E2, (+) E2 / (-) E2. Ομοίως **(Β)** (+) / (-) α-αμανιτίνης και **(Γ)** E2 + α-αμανιτίνης / E2. Τα επίπεδα mRNA του COX IV ορίστηκαν ως 1. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με two-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n=3), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Οι κάθετοι αστερίσκοι αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των επιπέδων mRNA του εκάστοτε μορίου σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του COX IV της κάθε κυτταρικής σειράς, ενώ οι οριζόντιες γραμμές και οι αντίστοιχοι αστερίσκοι υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων mRNA του ίδιου μορίου μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών. 12/16S rRNA, 12/16S ribosomal RNA; ND, NADH dehydrogenase; COX, Cytochrome c oxidase; CYT B, Cytochrome b.

Ομοίως κατά τον έλεγχο της επίδρασης της E2 στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, σε κύτταρα N2AmtGFP (Εικόνα 19Α) παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 1,5 με 5 φορές των επιπέδων mRNA των 16S rRNA, ND 1, ATP 6 και Cyt b σε σύγκριση με τα επίπεδα mRNA της υπομονάδας COX IV της ίδιας κυτταρικής σειράς, επιβεβαιώνοντας δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας που αναδεικνύουν την επαγωγή μιτοχονδριακά κωδικοποιούμεν υπομονάδων OXPHOS από την E2 μέσω πυρηνικών και μεμβρανικών ERs. Στα κύτταρα N2AmtGFPERβ δεν παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων παρουσία E2 «(+)/(-) E2» (Εικόνα 19Α) σε σύγκριση με τα επίπεδα mRNA του πυρηνικά κωδικοποιούμενου COX IV, και το αποδίδουμε στο γεγονός ότι στα κύτταρα αυτά προϋπάρχει ο μιτοχονδριακός υποδοχέας και στη συνθήκη αναφοράς (απουσία ορμόνης), και πιθανόν η μιτοχονδρική εντόπιση του υποδοχέα να είναι αρκετή για την ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, και να συντελεί παράλληλα στο συγχρονισμό μιτοχονδριακής και πυρηνικής μεταγραφής, υπόθεση που διατυπώθηκε αρχικά από τον αείμνηστο Κωνσταντίνο Σέκερη (Scheller and Sekeris 2003). Επίσης, κατά αναλογία με τις παρατηρήσεις μας στα κύτταρα SH-SY5Y, παρουσία της α -αμανιτίνης «(+)/(-) α -αμανιτίνη» (Εικόνα 19B) διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 2 με 5 φορές των επιπέδων mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων 16S rRNA, ND1, ATP6 και Cyt b, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του COX IV, τόσο σε κύτταρα N2AmtGFP όσο και σε κύτταρα N2AmtGFPERβ, υποδηλώνοντας ότι υπό συνθήκες αναστολής της πυρηνικής μεταγραφής, η μιτοχονδριακή μεταγραφή των συγκεκριμένων γονιδίων παραμένει. Η δράση αυτή υποδεικνύει την παρουσία τοπικών ενεργοποιητών της μιτοχονδριακής μεταγραφής στο μιτοχόνδριο, ενδεχομένως συμπεριλαμβανομένου και του mtERβ. Η υπόθεσή αυτή επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον mtERβ η δράση αυτή είναι ενισχυμένη σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 2 με 3 φορές στα επίπεδα mRNA των μορίων 12S rRNA, COX I και ND 4 της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA των ιδίων μορίων της κυτταρικής σειράς N2AmtGFP. Η δράση αυτή παραμένει και αναδεικνύεται περαιτέρω υπό συνθήκες ενεργοποίησης των κυττάρων με E2. Ειδικότερα, παρουσία α -αμανιτίνης αναστέλλεται η επαγόμενη από την E2 ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής σε κύτταρα N2AmtGFP, όχι όμως και στα κύτταρα N2AmtGFPERβ, που υπερεκφράζουν το μιτοχονδριακό υποδοχέα (Εικόνα 19Γ). Αναλυτικότερα, σε κύτταρα N2AmtGFPERβ

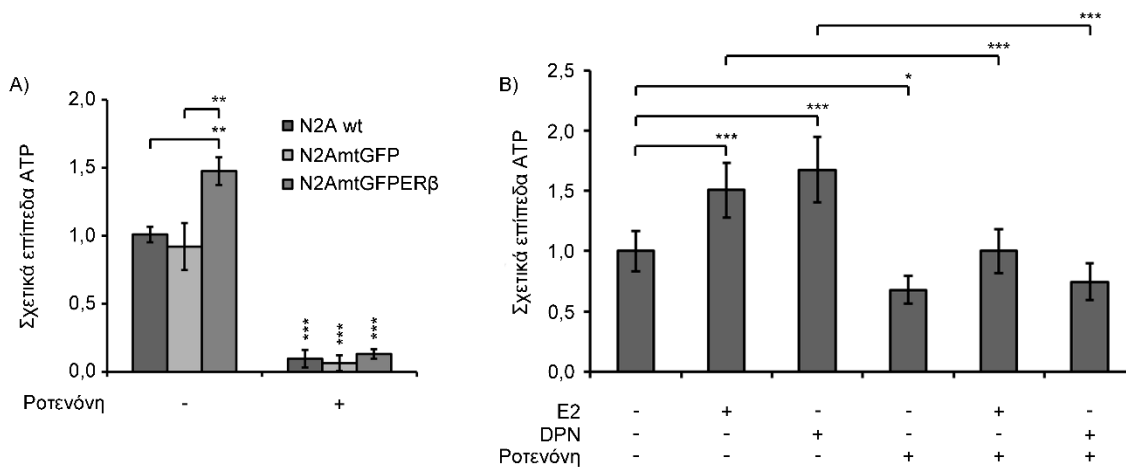
παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 3 με 4 φορές των επιπέδων των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων NDI, COX I, ATP6, και ND4 σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του πυρηνικά κωδικοποιούμενου COX IV της ίδιας κυτταρικής σειράς, N2AmtGFPERβ (Εικόνα 19Γ). Κατά συνέπεια, παρατηρούμε 2 με 4 φορές στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA των μορίων ND 1, COX I, ATP 6 και ND 4 της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA των ιδίων μορίων της κυτταρικής σειράς N2AmtGFP (Εικόνα 19Γ).

3.1.3. Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στα μιτοχονδριακά επίπεδα της ATP

Η μιτοχονδριακή βιογένεση και η κυτταρική διαφοροποίηση συνδέονται άρρηκτα με την παραγωγή ATP (Marin-Vicente, Guerrero-Valero et al. 2011, Agostini, Romeo et al. 2016), για το λόγο αυτό ελέγχθηκε η πιθανή συμμετοχή του mtERβ στη ρύθμιση της παραγωγής ενέργειας. Κύτταρα N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία 0,2M ροτενόνης για 16 ώρες και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων και απομόνωση και μέτρηση της ATP, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.15. Η ροτενόνη αποτελεί αναστολέας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας (Li, Ragheb et al. 2003, Psarra and Sekeris 2011, Han, Casson et al. 2014) και χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας της μιτοχονδριακής προέλευσης της ATP. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 20Α τα κύτταρα N2AmtGFPERβ εμφανίζουν 1,5 φορές υψηλότερα επίπεδα ATP σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς, υποδεικνύοντας την επαγόμενη από τον mtERβ αύξηση των επιπέδων της ATP. Η παρουσία ροτενόνης ανέστειλε την παραγωγή της ATP και στις 3 σταθερές κυτταρικές σειρές, υποδηλώνοντας τη μιτοχονδριακή προέλευσή του (Tsialtas, Georgantopoulos et al. 2021).

Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπόψη τον αυξημένο μιτοχονδριακό εντοπισμό του ERβ στα κύτταρα SH-SY5Y παρουσία των αγωνιστών του E2 ή DPN, ελέγχθηκε η επίδραση τους στη ρύθμιση της παραγωγής ενέργειας σε κύτταρα SH-SY5Y, παρουσία ή απουσία 0,2M ροτενόνης για 16 ώρες. Στην Εικόνα 20B παρατηρούμε ότι τόσο η E2 όσο και το DPN προκάλεσαν περίπου 50-75% αύξηση των επιπέδων του ATP, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς. Η παρουσία ροτενόνης μείωσε κατά 40-50% την παραγωγή της ATP στα κύτταρα

SH-SY5Y, υποδηλώνοντας τη μιτοχondριακή προέλευση του εναπομείναντος ποσοστού του παραγόμενου ATP.



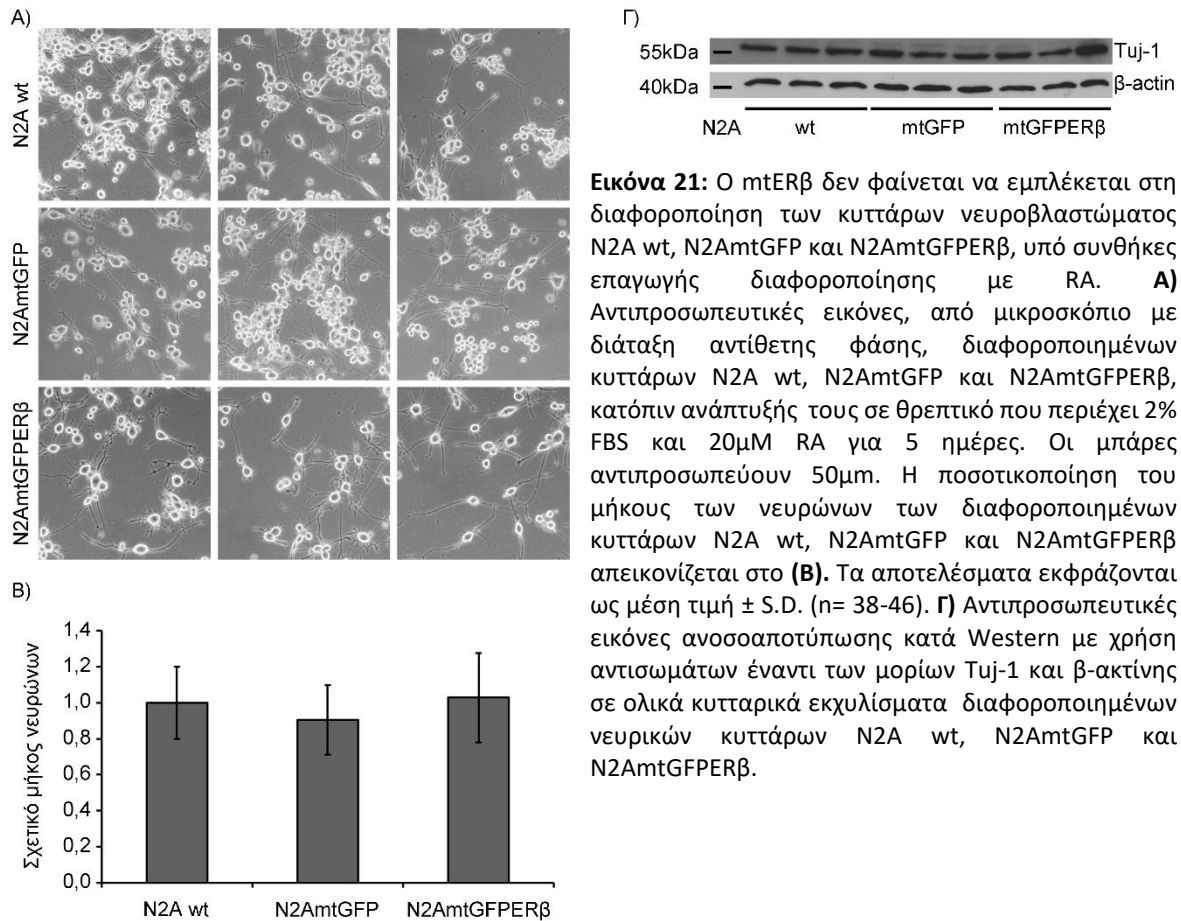
Εικόνα 20: Αυξημένα επίπεδα της μιτοχondριακής ATP στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον mtERβ, N2AmtGFPERβ, καθώς και παρουσία E2 ή DPN στα κύτταρα SH-SY5Y. **A)** Αποτίμηση των επιπέδων ATP σε κύτταρα N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, αφού είχαν προηγουμένως επωαστεί ή μη με 0,2M ροτενόνης, η οποία αποτελεί αναστολέας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας. **B)** Επίδραση των αγωνιστών του ERβ, E2 και DPN, στα επίπεδα της ATP σε κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία επωάστηκαν με 10^{-9} M E2, 10^{-8} M DPN ή 0,2M ροτενόνης, καθώς και με συνδυασμό αυτών, για 16 ώρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ο λόγος των RLU (Relative Light Units) ως προς τα σχετικά επίπεδα πρωτεϊνών των κυτταρικών εκχυλισμάτων και παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm S.D. (n=3), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Τα επίπεδα ATP των μη κατεργασμένων με ροτενόνη κυττάρων N2A wt και των μη κατεργασμένων με καμία από τις παραπάνω ουσίες κυττάρων SH-SY5Y ορίστηκαν ως 1. Όσον αφορά τα πειράματα στις κυτταρικές σειρές N2A, οι κάθετοι αστερίσκοι αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των κυττάρων που έχουν υποστεί κατεργασία με ροτενόνη σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς, μη κατεργασμένα με ροτενόνη, της κάθε κυτταρικής σειράς, ενώ οι οριζόντιες γραμμές και οι αντίστοιχοι αστερίσκοι υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων των διαφορετικών κυτταρικών σειρών.

3.1.4. Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στην κυτταρική διαφοροποίηση

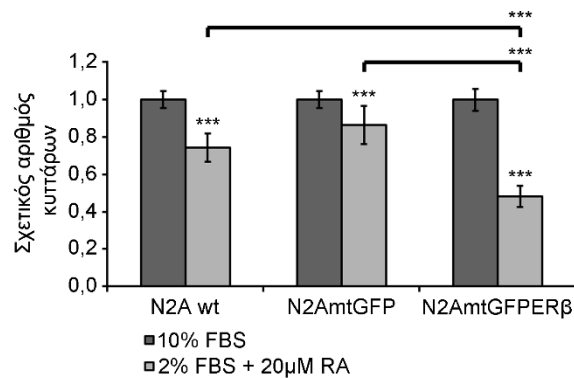
Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του mtERβ στην κυτταρική διαφοροποίηση, κύτταρα N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ επωάστηκαν για 5 ημέρες με 20μM RA σε θρεπτικό μέσο DMEM χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (1mg/ml), στο οποίο είχε προστεθεί 2% FBS, έτσι ώστε να ενεργοποιηθεί η διαδικασία διαφοροποίησης αυτών σε νευρικά κύτταρα. Ύστερα από παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο (Εικόνα 21A) δεν διαπιστώθηκαν διαφορές μεταξύ των κυττάρων των τριών κυτταρικών σειρών, όσον αφορά τις επαγόμενες αλλαγές στη μορφολογία και στο μήκος των νευρώνων τους (Εικόνα 21B).

Στη συνέχεια αξιολογήθηκαν με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western τα πρωτεϊνικά επίπεδα της βIII τουμπουλίνης (βIII-tubulin, Tuj-1), που αποτελεί δείκτης διαφοροποίησης νευρικών κυττάρων (Li, Ragheb et al. 2003, Georgoroulou, Hurel et al. 2006,

Hsu, Liu et al. 2014, Zhang, Ma et al. 2019), και όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στην Εικόνα 21Γ δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών συνθηκών όσον αφορά τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Tuj-1.



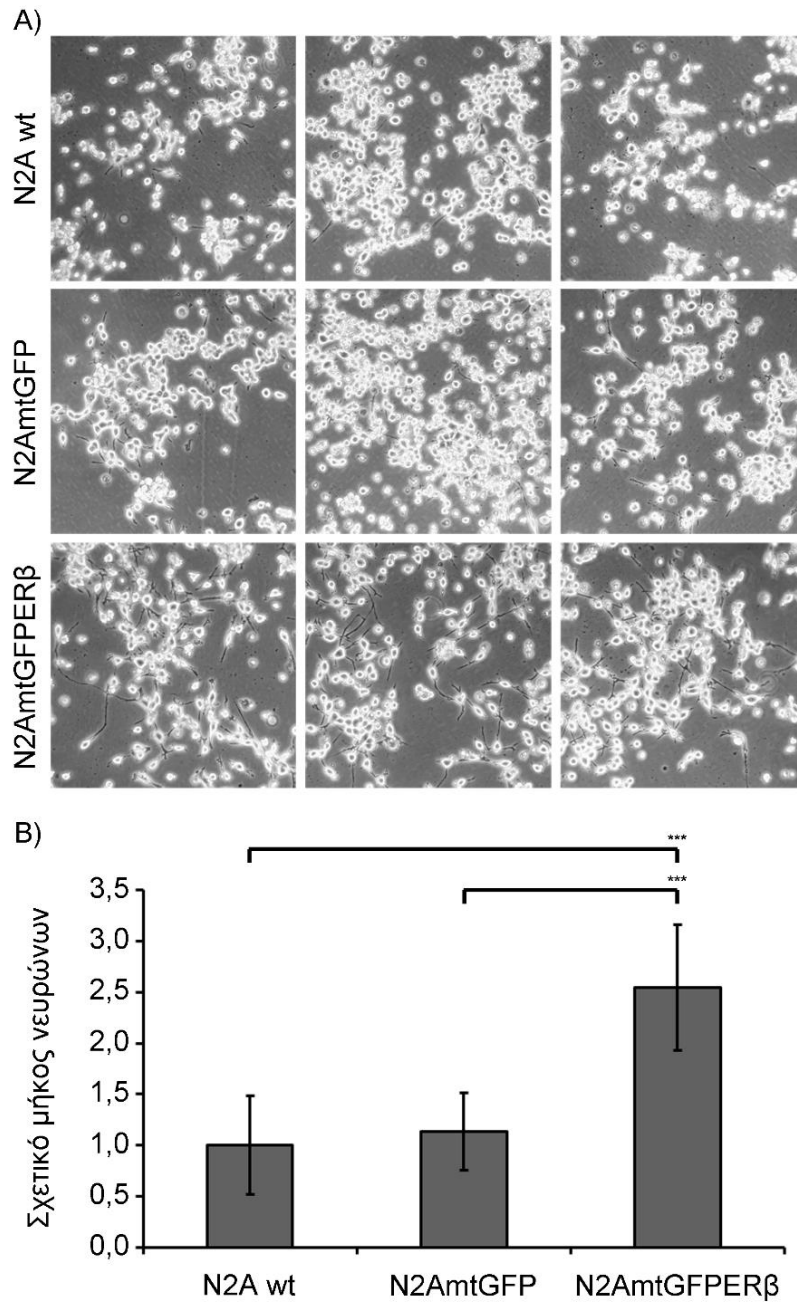
Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι κατά τη διεξαγωγή των δύο παραπάνω πειραμάτων τα κύτταρα N2AmtGFPERβ παρουσίασαν σχετικά μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τα κύτταρα N2A wt και N2AmtGFP, κάτι το οποίο απεικονίζεται ως ένα βαθμό και στην Εικόνα 21Α. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε δοκιμασία MTT ώστε να εξεταστεί ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων των τριών κυτταρικών σειρών. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 22, ύστερα από καλλιέργεια των κυττάρων με θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, τα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον mtERβ, N2AmtGFPERβ, εμφανίζουν μείωση κατά περίπου 50% της ανάπτυξής τους σε σύγκριση με τα κύτταρα N2A wt και N2AmtGFP. Όπως και είναι αναμενόμενο παρατηρείται και στις τρεις κυτταρικές σειρές στατιστικά σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες διαφοροποίησης σε σύγκριση με τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε κανονικές συνθήκες καλλιέργειας.



Εικόνα 22: Μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των διαφοροποιημένων νευρικών κυττάρων N2A, υπό συνθήκες υπερέκφρασης του mtERβ. Εκτίμηση του σχετικού ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ με εφαρμογή δοκιμασιών ελέγχου κυτταροτοξικότητας MTT, μετά από ανάπτυξή τους σε θρεπτικό μέσο που περιέχει 10% FBS ή 2% FBS και 20μM RA για 5 ημέρες. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με two-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 12), *** p < 0.001. Οι οριζόντιες γραμμές και οι αντίστοιχοι αστερίσκοι υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, ενώ οι αστερίσκοι πάνω απ' τις αντίστοιχες μπάρες αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές του αριθμού των κυττάρων μεταξύ των δύο συνθηκών καλλιέργειας των κυττάρων της ίδιας κυτταρικής σειράς.

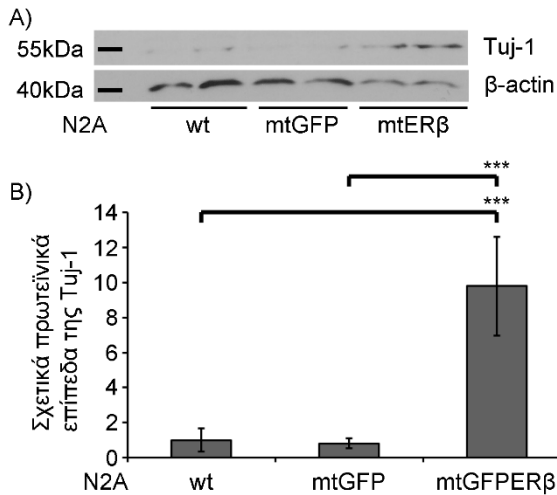
Συνοψίζοντας εκτός της αλλαγής του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων δεν παρατηρήθηκε κάποια άλλη πιθανή συμμετοχή του mtERβ στην κυτταρική διαφοροποίηση κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας. Όπως γνωρίζουμε απ' την βιβλιογραφία (Wu, Lin et al. 2009, Tremblay, Sikorska et al. 2010, Korecka, van Kesteren et al. 2013, Janesick, Wu et al. 2015) και παρατηρούμε από τα αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών που απεικονίζονται στην Εικόνα 21, η παρουσία του RA παίζει καθοριστικό ρόλο στην διαφοροποίηση των κυττάρων εμποδίζοντάς μας ίσως να διερευνήσουμε την εμπλοκή του mtERβ σε αυτή την κυτταρική διεργασία. Λόγω των παραπάνω καλλιεργήθηκαν κύτταρα N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ για 5 ημέρες σε θρεπτικό χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (1mg/ml), στο οποίο είχε προστεθεί 2% FBS και απουσίαζε το RA, και στη συνέχεια εφαρμόστηκε μικροσκοπία με διάταξη αντίθετης φάσης, ανοσοαποτύπωση κατά Western και Real time PCR.

Στις Εικόνες 23A και B παρατηρούμε κατά 2 με 3 φορές στατιστικά σημαντική αύξηση του μήκους των νευρώνων στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον mtERβ σε σύγκριση με τα κύτταρα N2A wt και N2AmtGFP υποδεικνύοντας πιθανή εμπλοκή του υποδοχέα στη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων.



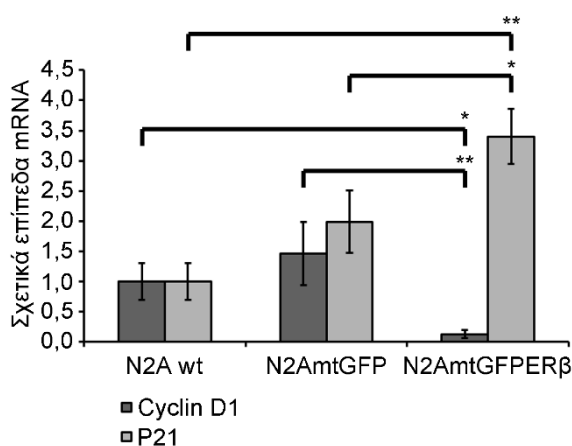
Εικόνα 23: Αύξηση του μήκους των νευρώνων των διαφοροποιημένων, ύστερα από καλλιέργειά με 2% FBS και απουσία RA, κυττάρων N2A, υπό συνθήκες υπερέκφρασης του mtERβ. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες, από μικροσκόπιο με διάταξη αντίθετης φάσης, διαφοροποιημένων κυττάρων N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, κατόπιν ανάπτυξής τους, για 5 ημέρες, σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 2% FBS και απουσίαζε το RA. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 50μm. Η ποσοτικοποίηση του μήκους των νευρώνων των κυττάρων N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ απεικονίζεται στο **(B)**. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 25-40), *** p < 0.001.

Από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισώματος έναντι της Tuj-1, που ακολούθησε, προκύπτει ότι ο δείκτη διαφοροποίησης Tuj-1 εμφανίζει 10 φορές υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα N2AmtGFPERβ σε σύγκριση με τα κύτταρα N2AmtGFP και N2A wt (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Tuj-1 στα διαφοροποιημένα, ύστερα από καλλιέργεια με 2% FBS και απουσία RA, κύτταρα N2A, υπό συνθήκες υπερέκφρασης του mtERβ. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των μορίων Tuj-1 και β-ακτίνης σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, που είχαν καλλιεργηθεί με 2% FBS και απουσία RA για 5 ημέρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Tuj-1 κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. **B)** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, τα οποία αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 3), *** p < 0.001. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Tuj-1 στα κύτταρα N2A wt ορίστηκαν ως 1.

Τέλος με εφαρμογή Real time PCR αξιολογήθηκαν τα επίπεδα mRNA της Cyclin D1 και του αναστολέα της CDK P21 με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης του mtERβ στον κυτταρικό κύκλο κατά τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε νευρικά. Στην Εικόνα 25 παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση, της τάξης του 90%, των επιπέδων mRNA της Cyclin D1 και 20 με 30% στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του P21 στα κύτταρα N2AmtGFPERβ σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς, N2AmtGFP και N2A wt. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν έξοδο των κυττάρων N2AmtGFPERβ από τον κυτταρικό κύκλο, (Georgoroulou, Hurel et al. 2006, Marzinke and Clagett-Dame 2012, Tsiaras, Papastefanaki et al. 2013, Gaitanou, Segklia et al. 2019), και ενισχύουν την υπόθεση εμπλοκής του mtERβ στην επαγωγή της διαφοροποίησης των N2A κυττάρων.



Εικόνα 25: Μείωση των επιπέδων mRNA της κυκλίνης D1 και αύξηση των επιπέδων mRNA του P21, υπό συνθήκες υπερέκφρασης του mtERβ. Αποτίμηση των σχετικών επιπέδων mRNA της κυκλίνης D1 και του P21 σε κύτταρα N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, τα οποία αφού καλλιεργήθηκαν με 2% FBS και απουσία RA για 5 ημέρες, ακολούθησε απομόνωση ολικού RNA, κατασκευή cDNA και εφαρμογή Real time PCR χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές έναντι της β-ακτίνης. Τα επίπεδα mRNA του εκάστοτε μορίου στα κύτταρα N2A wt ορίστηκαν ως 1. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n=3), * p < 0.05, ** p < 0.01.

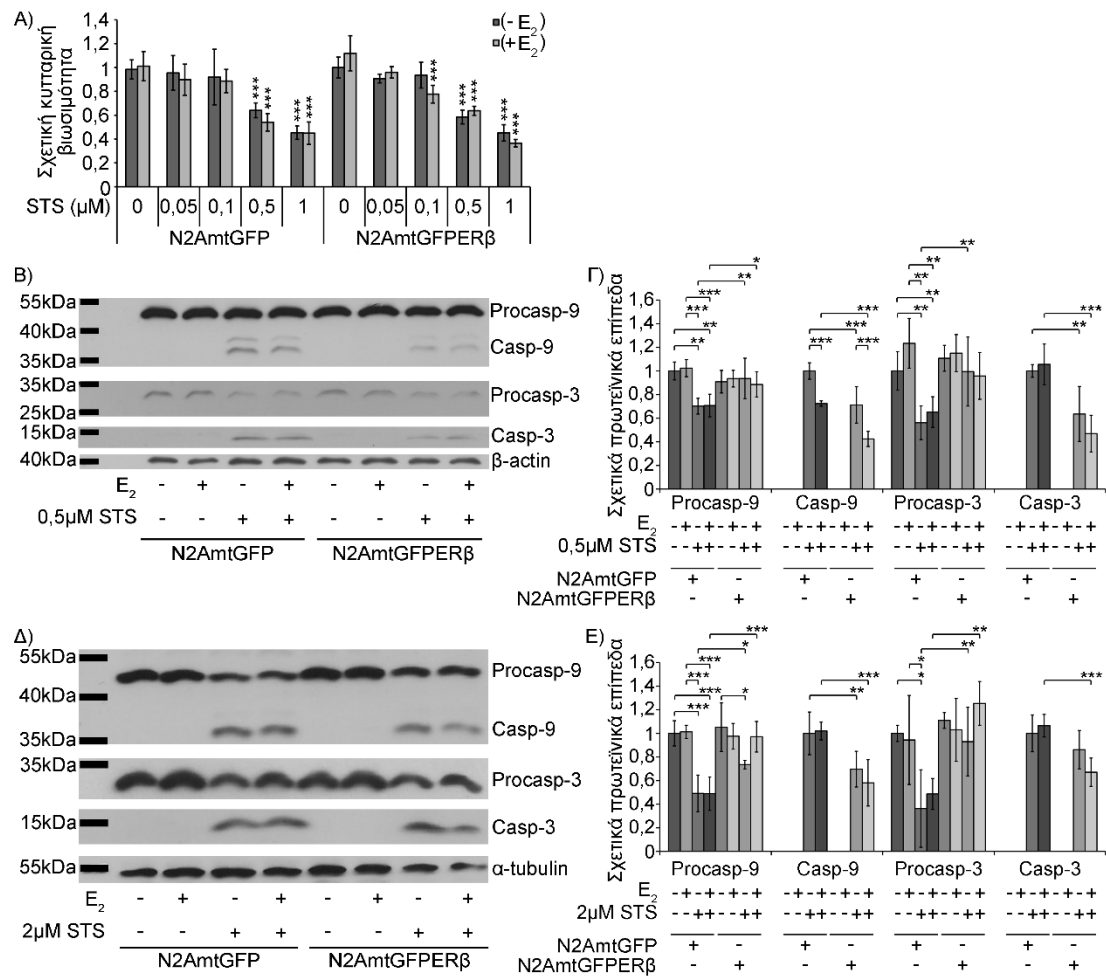
3.1.5. Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στην επαγόμενη από τη σταυροσπορίνη απόπτωση

Η εμπλοκή του mtERβ στη ρύθμιση αντιαποπτωτικών διεργασιών αξιολογήθηκε με εφαρμογή μιας σειράς πειραματικών διαδικασιών που πραγματοποιήθηκαν στις σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν τις πρωτεΐνες mtGFPERβ και mtGFP, ύστερα από επώαση των κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις του παράγοντα επαγωγής απόπτωσης σταυροσπορίνη (STS) παρουσία ή απουσία E2. Οι πειραματικές διαδικασίες που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής: α) δοκιμασίες ελέγχου κυτταροτοξικότητας MTT, κατά τις οποίες τα κύτταρα των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών επώαστηκαν με ένα εύρος συγκεντρώσεων STS, 0,05 έως 1μM, παρουσία ή απουσία 10^{-9} M E2 για 12 ώρες και β) ανοσοαποτύπωση κατά Western σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των κυττάρων των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών και χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων για τον έλεγχο της επίδρασης του mtERβ στα πρωτεϊνικά επίπεδα των (προ)κασπασών -9 και -3 παρουσία 0,5 ή 2μM STS για 12 ώρες και παρουσία ή απουσία 10^{-9} M E2. Το εύρος των συγκεντρώσεων της STS που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η κατεργασία των κυττάρων N2A με 1μM STS για 24 ώρες ενεργοποιεί την επαγωγή απόπτωσης (Li, Wang et al. 2007).

Στην Εικόνα 26A δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή όσον αφορά την κυτταρική βιωσιμότητα των δύο κυτταρικών σειρών, μετά από κατεργασία αυτών με ένα εύρος συγκεντρώσεων STS από 0,05 έως 1μM για 12 ώρες. Όμως παρουσία 0,5 και 1μM STS παρατηρείται 30-60% μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων και στις δύο κυτταρικές σειρές ανεξαρτήτως της παρουσίας της E2 (Tsialtas, Georgantopoulos et al. 2021).

Όσον αφορά τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρουσία τόσο 0,5μM όσο και 2μM STS παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των προκασπασών -9 και -3 στα κύτταρα N2AmtGFP σε σχέση με τα κύτταρα N2AmtGFPERβ (Εικόνα 26B, Γ και Δ, Ε αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύονται και από τη στατιστικά σημαντική αύξηση που παρατηρήθηκε στα πρωτεϊνικά επίπεδα των κασπασών -9 και -3 (πρωτεολυμένων, ενεργοποιημένων κασπασών) στα κύτταρα N2AmtGFP σε σχέση με τα κύτταρα N2AmtGFPERβ παρουσία 0,5μM STS (Εικόνα 26B, Γ). Στα ίδια συμπεράσματα καταλήγουμε όσον αφορά και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της κασπάσης 9 ύστερα από κατεργασία των κυττάρων με 2μM STS (Εικόνα 26Δ, Ε). Όμως, κατά

την κατεργασία των κυττάρων με 2μM STS, μόνο παρουσία E2 παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της κασπάσης 3 στα κύτταρα N2AmtGFP σε σύγκριση με τα κύτταρα N2AmtGFPERβ (Εικόνα 26Δ, Ε). Τέλος παρουσία E2 παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της κασπάσης 9 στα κύτταρα που



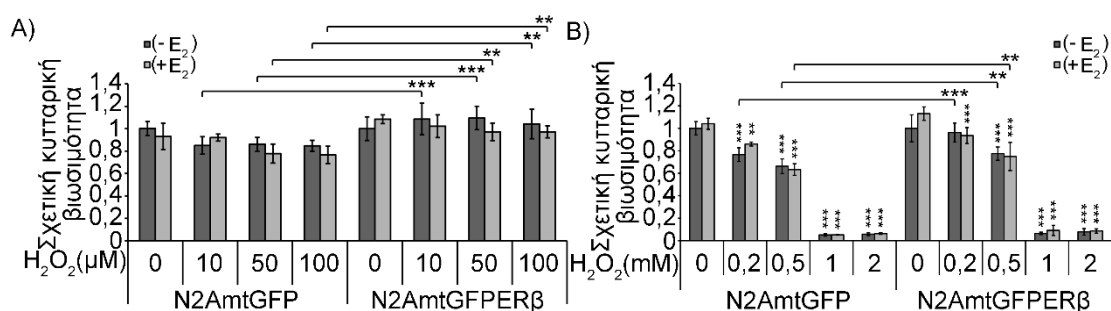
Εικόνα 26: Αντίσταση στην επαγόμενη από τη σταυροσπορίνη απόπτωση, υπό συνθήκες υπερέκφρασης του mtERβ. **(Α)** Εκτίμηση της σχετικής βιωσιμότητας των κυττάρων των κυτταρικών σειρών N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ με εφαρμογή δοκιμασιών ελέγχου κυτταροτοξικότητας MTT, ύστερα από κατεργασία των κυττάρων με ένα εύρος συγκεντρώσεων STS από 0,05 έως 1μM για 12 ώρες και παρουσία ή απουσία 10⁻⁹M E2. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με two-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 4-6), *** p < 0.001, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς (μη κατεργασμένα με STS) της εκάστοτε συνθήκης (παρουσία ή απουσία E2) της κάθε κυτταρικής σειράς.

Β,Δ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των μορίων (προ)κασπάση -9 και -3 σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των κυττάρων N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, τα οποία είχαν κατεργαστεί με 0,5μM **(Β)** και 2μM **(Δ)** STS, παρουσία ή απουσία 10⁻⁹M E2, για 12 ώρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των (προ)κασπασών -9 και -3 κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης ή της α-τουμπουλίνης. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στο **(Γ)** και **(Ε)** αντίστοιχα. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υπό μελέτη μορίων ορίστηκαν ως 1 στα κύτταρα αναφοράς, δηλαδή στα μη κατεργασμένα με ουσίες κύτταρα N2AmtGFP, όσον αφορά τα επίπεδα των προκασπασών -9 και -3, και στα κύτταρα N2AmtGFP που κατεργάστηκαν με STS, όσον αφορά τα επίπεδα των κασπασών -9 και -3. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με two-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 3-4), * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

έχουν συνεπωαστεί με 0,5μM STS και 10⁻⁹M E2, σε σύγκριση με τα κύτταρα που έχουν επωαστεί μόνο με 0,5μM STS απουσία E2. Η δράση αυτή παρατηρήθηκε και στις δύο κυτταρικές σειρές, μόνο όμως όταν επώαστηκαν με χαμηλές συγκεντρώσεις STS (0,5μM) (Εικόνα 26B, Γ) (Tsialtas, Georgantopoulos et al. 2021).

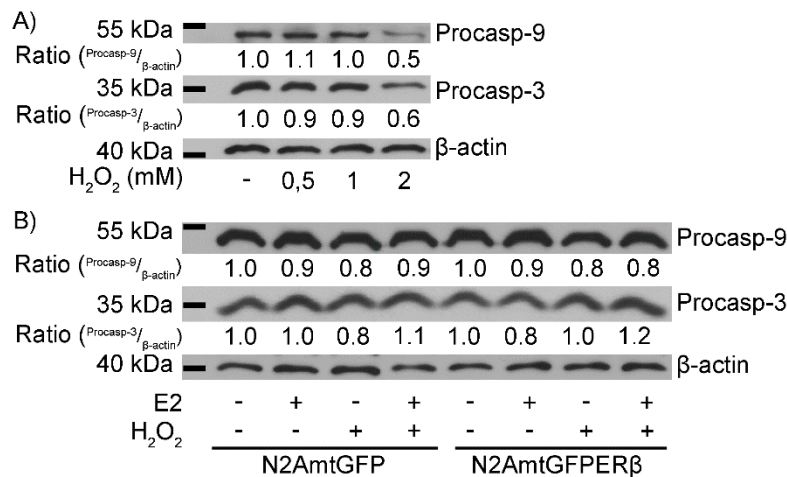
3.1.6. Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στην επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση

Στο ίδιο πλαίσιο, με την ενότητα 3.1.5., μελετήθηκε ο ρόλος του mtERβ στην επαγόμενη από το H₂O₂ μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας και απόπτωση. Όπως παρατηρούμε στην Εικόνα 27A και B, ύστερα από επώαση των κυττάρων με ένα εύρος συγκεντρώσεων H₂O₂, από 10 έως 500μM για 12 ώρες, και με εφαρμογή δοκιμασιών ελέγχου κυτταροτοξικότητας MTT, τα κύτταρα N2AmtGFPERβ εμφανίζουν αυξημένη αντίσταση (της τάξης του 20-30%) έναντι του οξειδωτικού παράγοντα H₂O₂ σε σύγκριση με τα κύτταρα N2AmtGFP. Όταν όμως τα κύτταρα επώαστηκαν για 12 ώρες με υψηλότερες συγκεντρώσεις H₂O₂, 1 και 2mM, επάχθηκε 90% μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας και στις δύο κυτταρικές σειρές, χωρίς να παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Εικόνα 27B). Η παρουσία της E2 δεν φάνηκε να επηρέασε την επίδραση του H₂O₂ στην κυτταρική βιωσιμότητα τόσο των κυττάρων N2AmtGFPERβ όσο και των κυττάρων N2AmtGFP (Εικόνα 27A, B) (Tsialtas, Georgantopoulos et al. 2021).



Εικόνα 27: Αντίσταση στην επαγόμενη από το H₂O₂ μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, υπό συνθήκες υπερέκφρασης του mtERβ. Εκτίμηση της σχετικής βιωσιμότητας των κυττάρων των κυτταρικών σειρών N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ με εφαρμογή δοκιμασιών ελέγχου κυτταροτοξικότητας MTT, ύστερα από κατεργασία των κυττάρων με ένα εύρος συγκεντρώσεων H₂O₂ από 10 έως 100μM (**A**) και από 0,2 έως 2mM (**B**) για 12 ώρες, παρουσία ή απουσία 10⁻⁹M E2. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με two-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 4-6), ** p < 0.01, *** p < 0.001. Οι κάθετοι αστερίσκοι αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων που έχουν κατεργαστεί με το H₂O₂ σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς (μη κατεργασμένα με H₂O₂) της εκάστοτε συνθήκης (παρουσία ή απουσία E2) της κάθε κυτταρικής σειράς, ενώ οι οριζόντιες γραμμές και οι αντίστοιχοι αστερίσκοι υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών σειρών που έχουν κατεργαστεί με τις ίδιες συγκεντρώσεις H₂O₂ και απουσία ή παρουσία E2.

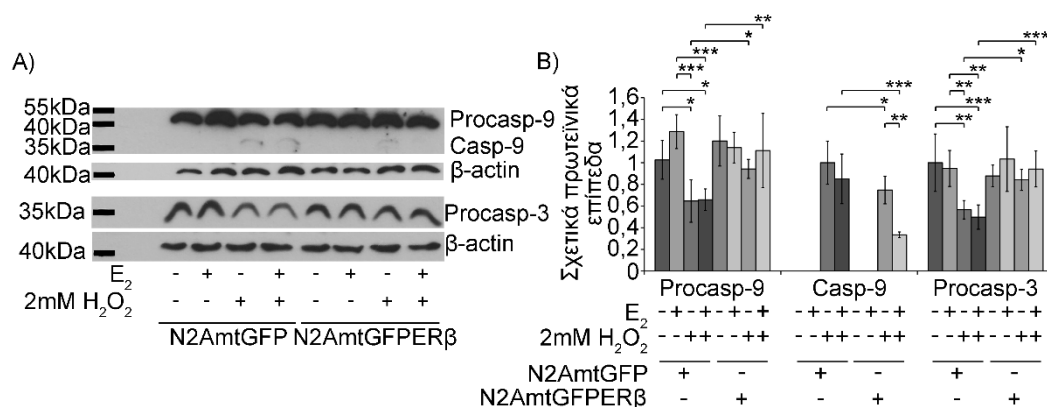
Στην Εικόνα 28 απεικονίζονται τα δοκιμαστικά πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, που διεξήχθησαν προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες επαγωγής απόπτωσης παρουσία H_2O_2 , ώστε να καθίσταται στη συνέχεια εφικτός ο συγκριτικός έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων μορίων, που εμπλέκονται στην απόπτωση, μεταξύ των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών. Στην Εικόνα 28A παρατηρούμε ενεργοποίηση των προκασπασών -9 και -3 στα κύτταρα N2A wt που είχαν επωαστεί με 2mM H_2O_2 για 2,5 ώρες. Το γεγονός αυτό υποδεικνύεται από τη 40-50% μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων τους στη συνθήκη αυτή. Επίσης δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα των προκασπασών -9 και -3 στα κύτταρα N2AmtGFPERβ και N2AmtGFP παρουσία 1mM H_2O_2 για 2,5 ώρες (Εικόνα 28B).



Εικόνα 28: Δοκιμαστικά πειράματα για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών επαγωγής απόπτωσης παρουσία H_2O_2 σε κύτταρα N2A. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ύστερα από εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρήση κατάλληλων αντισωμάτων για την αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των προκασπασών -9 και -3 σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα που προέκυψαν ύστερα από κατεργασία των κυττάρων N2A wt με 0,5, 1 και 2mM H_2O_2 (A) και των κυττάρων N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ με 1mM H_2O_2 (B) για 2,5 ώρες. Οι τιμές Ratio (λόγος) προέκυψαν μετά από την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών των υπό μελέτη μορίων με τις αντίστοιχες πρωτεϊνικές ζώνες της β-ακτίνης και εκφράζονται ως σχετικές τιμές σε σύγκριση με αυτές των κυττάρων αναφοράς.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, επιλέχθηκαν ως συνθήκες πειράματος η κατεργασία των N2AmtGFPERβ και N2AmtGFP κυττάρων με 2mM H_2O_2 για 2,5 ώρες. Στη συνέχεια ακολούθησε λύση των κυττάρων και εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα αυτών με σκοπό τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών επιπέδων των (προ)κασπασών -9 και -3 (Εικόνα 29), καθώς και των προαποπτωτικών, Bcl-xL και Bcl-2, και αντιαποπτωτικών, BAX και BAD, μορίων της οικογένειας Bcl-2 (Εικόνα 30).

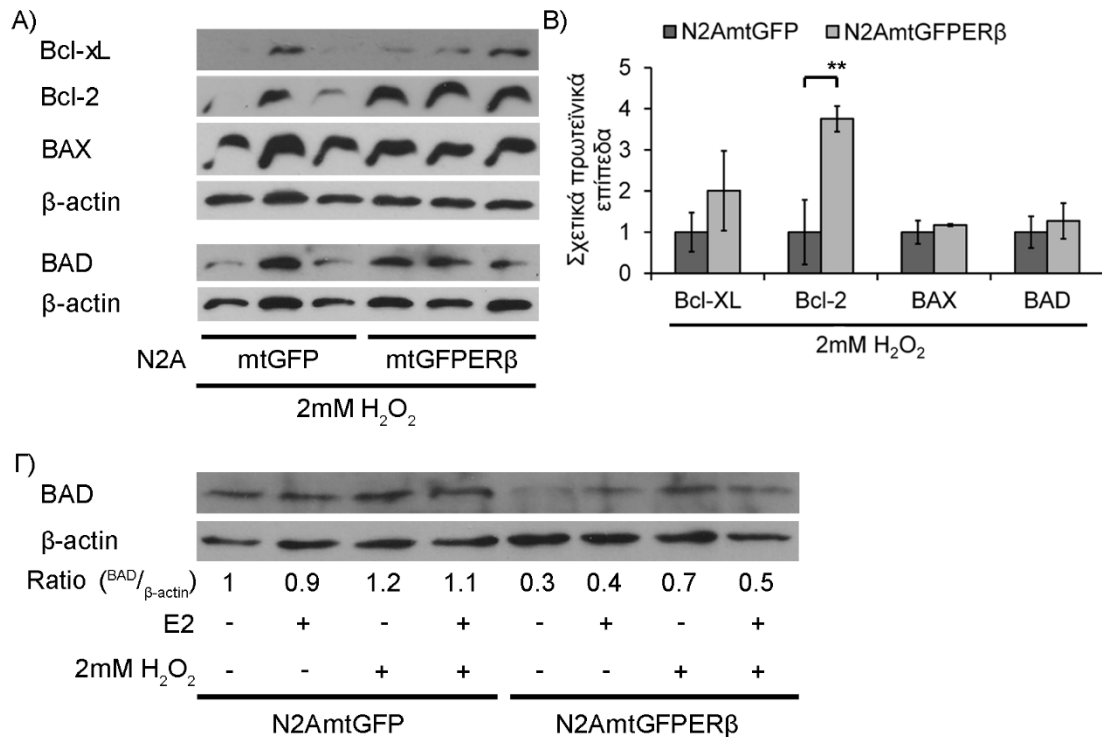
Στην Εικόνα 29A και B παρατηρούμε 40-50% στατιστικά σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των προκάσπασών -9 και -3 και 20-60% στατιστικά σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κασπάσης 9 στα κύτταρα N2AmtGFP σε σύγκριση με τα κύτταρα N2AmtGFPERβ, αποτελέσματα ανάλογα με αυτά της Ενότητας 3.1.5.. Επιπλέον η προστατευτική δράση του mtERβ, έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ απόπτωσης, ενισχύεται από την E2. Το συμπέρασμα αυτό διεξάγεται από το γεγονός ότι η E2 επάγει στατιστικά σημαντική μείωση της επαγόμενης από το H₂O₂ αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της κασπάσης 9 στα κύτταρα N2AmtGFPERβ, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε στα κύτταρα N2AmtGFP (Εικόνα 29) (Tsialtas, Georgantopoulos et al. 2021).



Εικόνα 29: Αντίσταση στην επαγόμενη από το H₂O₂ απόπτωση, υπό συνθήκες υπερέκφρασης του mtERβ. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των μορίων (προ)κασπάση -9 και -3 σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των κυττάρων N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, τα οποία κατεργάστηκαν με 2mM H₂O₂, παρουσία ή απουσία 10⁻⁹M E₂, για 2,5 ώρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των (προ)κασπασών -9 και -3 κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στο **(B)**. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υπό μελέτη μορίων ορίστηκαν ως 1 στα κύτταρα αναφοράς, δηλαδή στα μη κατεργασμένα με ουσίες κύτταρα N2AmtGFP, όσον αφορά τη μελέτη της μεταβολής των επιπέδων των προκάσπασών -9 και -3, και στα αντίστοιχα κατεργασμένα με H₂O₂ N2AmtGFP κύτταρα, όσον αφορά την εκτίμηση της μεταβολής των επιπέδων της κασπάσης 9. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με two-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 3-5), * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Όσον αφορά την επίδραση του mtERβ στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων της οικογένειας Bcl-2 δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα πρωτεϊνικά επίπεδα του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-xL και των προαποπτωτικών μορίων BAX και BAD μεταξύ των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών, υπό την επίδραση 2mM H₂O₂ για 2,5 ώρες (Εικόνα 30A, B). Αντιθέτως παρατηρούμε κατά 4 φορές στατιστικά σημαντική αύξηση του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2 στα κύτταρα N2AmtGFPERβ σε σύγκριση με τα κύτταρα N2AmtGFP, ύστερα από επώαση αυτών με 2mM H₂O₂ για 2,5 ώρες (Εικόνα 30A, B). Για επιπλέον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων του προαποπτωτικού μορίου BAD εφαρμόστηκε

ανοσοαποτύπωση κατά Western σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ που είχαν επωαστεί με 2mM H₂O₂ ή / και 10⁻⁹M E2 για 2,5 ώρες. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 30Γ τα πρωτεϊνικά επίπεδα του BAD παρουσιάζουν μείωση της τάξης του 50 με 70%, στα κύτταρα N2AmtGFPERβ σε σύγκριση με τα κύτταρα N2AmtGFP, ανεξαρτήτως της επίδρασης των ουσιών E2 ή/και H₂O₂.

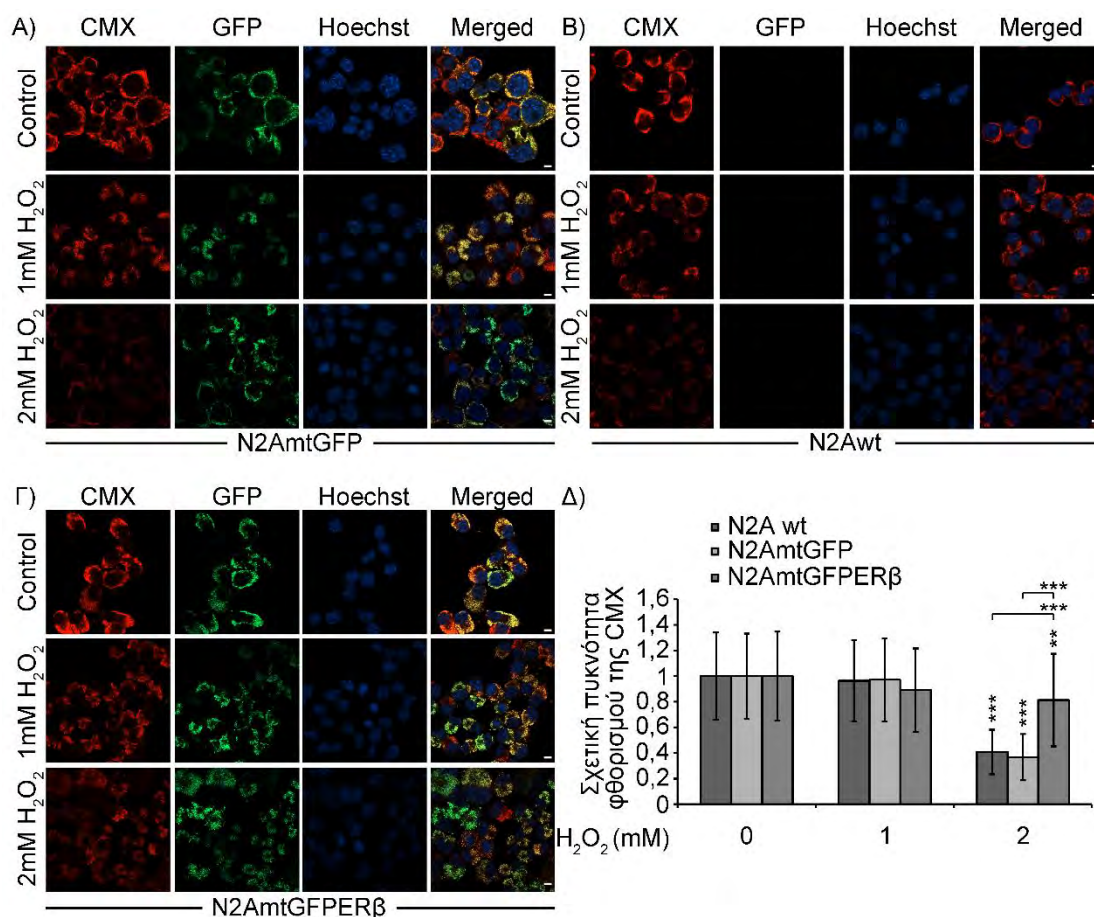


Εικόνα 30: Αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2 και μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του προαποπτωτικού μορίου BAD, υπό συνθήκες υπερέκφρασης του mtERβ. **Α)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι τεσσάρων μορίων της οικογένειας Bcl-2 (Bcl-XI, Bcl-2, BAX και BAD) σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των κυττάρων N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, τα οποία επώαστηκαν με 2mM H₂O₂ για 2,5 ώρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων της οικογένειας Bcl-2 κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στο **(B)**. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με two-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 3-5), ** p < 0.01. **Γ)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των μορίων BAD και β-ακτίνης σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των κυττάρων N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, τα οποία είχαν επωαστεί με 2mM H₂O₂, παρουσία ή απουσία 10⁻⁹M E2, για 2,5 ώρες. Οι τιμές Ratio (λόγος) προέκυψαν μετά από την κανονικοποίηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του BAD με τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης και εκφράζονται ως σχετικές τιμές σε σχέση με αυτές των μη κατεργασμένων με τις ουσίες κυττάρων της κυτταρικής σειράς N2AmtGFP.

3.1.7. Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στην επαγόμενη από το H₂O₂ διατάραξη της μιτοχονδριακής λειτουργίας

Η επίδραση του mtERβ στην επαγόμενη από το H₂O₂ διατάραξη της μιτοχονδριακής λειτουργίας αξιολογήθηκε, εφαρμόζοντας μικροσκοπία φθορισμού, με μέτρηση της πυκνότητας φθορισμού της χρωστικής CMX σε κύτταρα N2A wt, N2AmtGFP και

N2AmtGFPERβ ύστερα από επώαση των κυττάρων με 1 και 2mM H₂O₂ για 2,5 ώρες. Ο δείκτης φθορισμού CMX (απεικονίζεται με κόκκινο) φθορίζει σε κλειστά περιβάλλοντα όπου λαμβάνουν χώρα οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις (Chiaradonna, Gaglio et al. 2006, Wang, Li et al. 2006, Maharjan, Oku et al. 2014). Έτσι το CMX εμφανίζεται μόνο σε μιτοχόνδρια ζωντανών κυττάρων και η συσσώρευσή του εξαρτάται από το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Στην Εικόνα 31 παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση της πυκνότητας φθορισμού της CMX στα κύτταρα N2A wt και N2AmtGFP σε σύγκριση με τα κύτταρα N2AmtGFPERβ παρουσία 2mM H₂O₂ για 2,5 ώρες, υποδηλώνοντας την προστατευτική δράση του mtERβ έναντι της επαγόμενης από το H₂O₂ αποπόλωσης της μιτοχονδριακής μεμβράνης και διατάραξης της μιτοχονδριακής λειτουργίας (Tsialtas, Georgantopoulos et al. 2021).



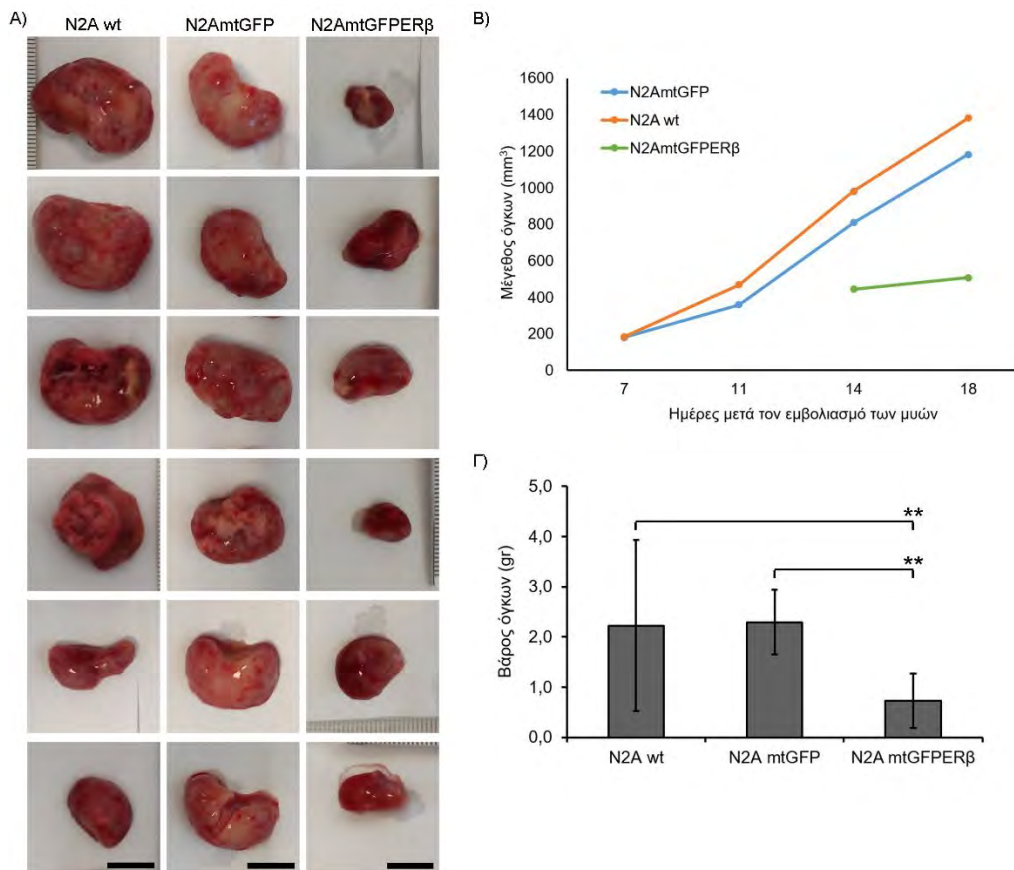
Εικόνα 31: Αντίσταση στην επαγόμενη από το H₂O₂ διατάραξη της μιτοχονδριακής λειτουργίας, υπό συνθήκες υπερέκφρασης του mtERβ. Αντιπροσωπευτικές εικόνες, από συνεστιακό μικροσκόπιο, με απεικόνιση των χρώσεων GFP, CMX (μιτοχονδριακός δείκτης) και Hoechst 33342 (πυρηνικός δείκτης) σε κύτταρα N2AmtGFP (A), N2Awt (B), και N2AmtGFPERβ (Γ), που είχαν επωαστεί με 1 και 2mM H₂O₂ για 2,5 ώρες. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 10μm. Δ) Ποσοτικοποίηση της σχετικής πυκνότητας φθορισμού της CMX. Η πυκνότητα φθορισμού της CMX στα μη κατεργασμένα με H₂O₂ κύτταρα της κάθε κυτταρικής σειράς ορίστηκε ως 1. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με two-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n=30-50), ** p < 0.01, *** p < 0.001. Οι κάθετοι αστερίσκοι αντιπροσωπεύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των κυττάρων που κατεργάστηκαν με το H₂O₂ σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς (μη κατεργασμένα με H₂O₂) της εκάστοτε κυτταρικής σειράς, ενώ οι οριζόντιες γραμμές και οι αντίστοιχοι αστερίσκοι υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων των διαφορετικών κυτταρικών σειρών, που κατεργάστηκαν με την υποδεικνυόμενη (2mM) συγκέντρωση H₂O₂.

3.2. Διερεύνηση του ρόλου του mtERβ στην καρκινογένεση

Θηλυκοί μύες στελέχους 1303 και ηλικίας 6 - 8 εβδομάδων εμβολιάστηκαν με τις σταθερές κυτταρικές σειρές N2AmtGFPERβ και N2AmtGFP και την κυτταρική σειρά N2A wt. Για κάθε συνθήκη χρησιμοποιήθηκαν 7 μύες και πραγματοποιήθηκαν 2 εμβολιασμοί στην πίσω μασχαλιαία χώρα υποδόρια σε κάθε μυ, ένας εμβολιασμός σε κάθε πόδι, δηλαδή συνολικά πραγματοποιήθηκαν 14 εμβολιασμοί ανά κυτταρική σειρά. Ο κάθε εμβολιασμός περιείχε 500.000 κύτταρα υπό μορφή εναιωρήματος σε θρεπτικό DMEM χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη. Οι κυτταρικές σειρές N2A wt και N2AmtGFP χρησιμοποιήθηκαν ως συνθήκες αναφοράς. Αφού αναπτύχθηκαν οι όγκοι, αφαιρέθηκαν και ομογενοποιήθηκαν. Σε 4 - 5 όγκους από κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκε μιτοχονδριακή κλασμάτωση και ακολούθησε βιοχημική ανάλυση των παραγόμενων όγκων με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western, τόσο στα ολικά ομογενοποιημένα των όγκων όσο και στα εμπλουτισμένα κυτταροπλασματικά (Post-mito, PM) και μιτοχονδριακά (Mito) κλάσματα αυτών. Με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρήση κατάλληλων αντισωμάτων αξιολογήθηκαν διάφορα μόρια, που συμμετέχουν σε μια πληθώρα κυτταρικών βιοχημικών διεργασιών, όπως στο μιτοχονδριακό ενεργειακό μεταβολισμό, στην αυτοφαγία, στην απόπτωση και στον κυτταρικό κύκλο, με σκοπό τη διερεύνηση της εμπλοκής του mtERβ στις διεργασίες αυτές κατά την καρκινογένεση.

3.2.1. In vivo πειράματα καρκινογένεσης σε μύες (xenograft mouse model)

Στην Εικόνα 32A απεικονίζονται ενδεικτικά κάποιοι από τους όγκους που αναπτύχθηκαν σε κάθε κατηγορία πειραματόζωων. Στην Εικόνα 32B παρατηρούμε ότι οι πρώτοι όγκοι εμφανίστηκαν την 7^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό των μυών με τα κύτταρα αναφοράς, ενώ λίγο πριν την 14^η ημέρα μετά τον εμβολιασμό των μυών με τα κύτταρα N2AmtGFPERβ. Απ' την πρώτη εμφάνιση των όγκων στους μύες της κάθε κατηγορίας μέχρι και την ευθανασία των μυών πραγματοποιήθηκαν, με χρήση παχύμετρου, μετρήσεις των διαστάσεων των όγκων. Όπως και αναμενόταν απ' την εικόνα των όγκων (Εικόνα 32A), οι παραπάνω μετρήσεις έδειξαν ότι οι όγκοι που προέκυψαν απ' τα κύτταρα N2AmtGFP και N2A wt απέκτησαν έως και 3 φορές μεγαλύτερο μέγεθος σε σύγκριση με τους όγκους που προήλθαν από τα κύτταρα N2AmtGFPERβ (Εικόνα 32B).



Εικόνα 32: Μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των όγκων, υπό συνθήκες υπερέκφρασης του mtERβ. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες των όγκων που αναπτύχθηκαν σε θηλυκούς μύες 1303 ύστερα από εμβολιασμό τους με τις κυτταρικές σειρές N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 1cm. **B)** Διάγραμμα που απεικονίζει το ρυθμό ανάπτυξης των όγκων από την ημέρα εμφάνισής τους μέχρι και την ευθανασία των μυών. Το μέγεθος των όγκων υπολογίστηκε από την εξίσωση $(\alpha\beta^2)/2$, όπου α =μήκος, β =πλάτος του κάθε όγκου. **Γ)** Διαγραμματική απεικόνιση των Μ.Ο του βάρους των όγκων της κάθε συνθήκης. Το βάρος των όγκων μετρήθηκε μετά την ευθανασία των μυών και την αφαίρεση των όγκων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή \pm S.D. (n=10-13), ** p < 0.01.

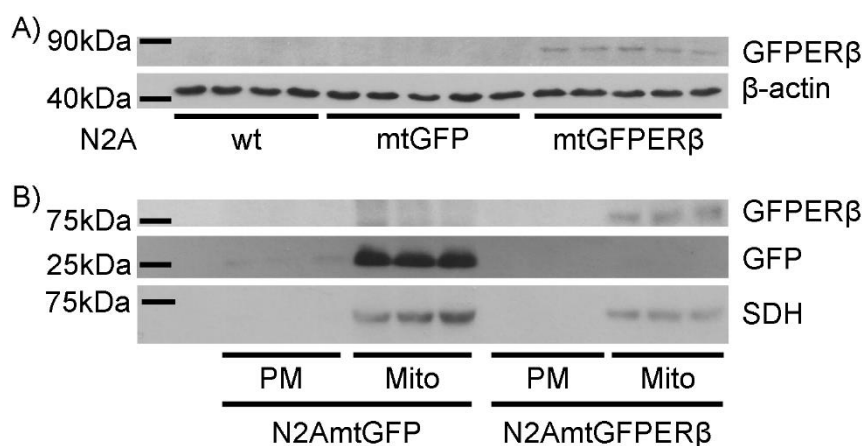
Μετά την ευθανασία των μυών, 19 ημέρες απ' τον εμβολιασμό, οι όγκοι αφού αφαιρέθηκαν ζυγίστηκαν. Στην εικόνα 32Γ παρατηρούμε κατά 2 με 4 φορές μείωση του βάρους των όγκων που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα N2AmtGFPERβ σε σύγκριση με το βάρος των όγκων των κυττάρων αναφοράς N2AmtGFP και N2A wt.

Απ' όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η κυτταρική σειρά που υπερεκφράζει τον mtERβ, N2AmtGFPERβ, αναστέλλει την καρκινογένεση καθώς εμφανίζει μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης και μικρότερο μέγεθος και βάρος όγκων σε σύγκριση με τις κυτταρικές σειρές N2AmtGFP και N2A wt.

3.2.2. Διερεύνηση του μηχανισμού μέσω του οποίου ο mtERβ αναστέλλει την καρκινογένεση

Προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου ο mtERβ αναστέλλει την ανάπτυξη των όγκων μελετήθηκε, όπως προαναφέρθηκε, η επίδραση της υπερέκφρασης του υποδοχέα σε αποπτωτικούς μηχανισμούς, στον κυτταρικό κύκλο, στην αυτοφαγία και στον ενεργειακό μεταβολισμό.

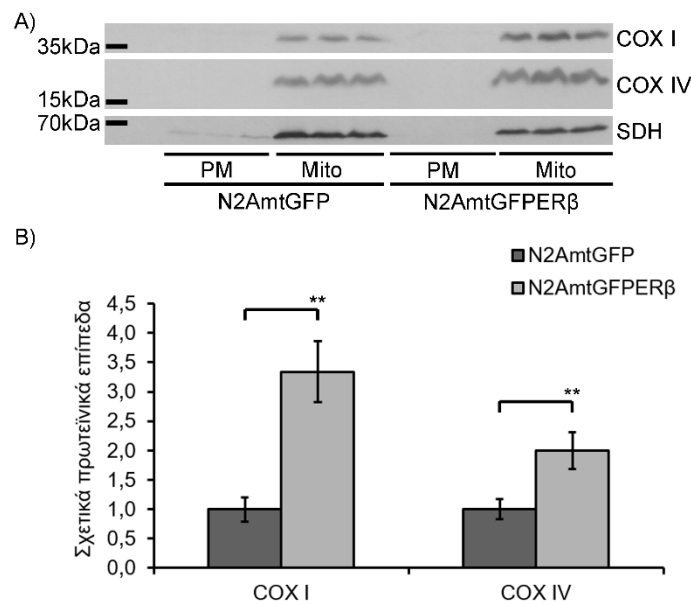
Αρχικά επιβεβαιώθηκε η υπερέκφραση των πρωτεϊνών mtGFP και mtGFPERβ στους όγκους που προέκυψαν από τις κυτταρικές σειρές N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ. Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 33, τα αποτελέσματα ύστερα από εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της GFP, σε ολικά ομογενοποιηήματα όγκων και σε εμπλουτισμένα κυτταροπλασματικά (Post-mito, PM) και μιτοχονδριακά (Mito) κλάσματα αυτών, ανέδειξαν την υπερέκφραση της πρωτεΐνης mtGFPERβ τόσο σε ολικά ομογενοποιηήματα (Εικόνα 33A) όσο και σε μιτοχονδριακά κλάσματα (Εικόνα 33B) όγκων που προέκυψαν από τα κύτταρα N2AmtGFPERβ. Επιπρόσθετα, στην Εικόνα 33B απεικονίζεται η υπερέκφραση της πρωτεΐνης mtGFP στα μιτοχονδριακά κλάσματα των όγκων που αναπτύχθηκαν ύστερα από τον εμβολιασμό των μυών με την κυτταρική σειρά N2AmtGFP.



Εικόνα 33: Επιβεβαίωση της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών mtGFP και mtGFPERβ στους όγκους που αναπτύχθηκαν ύστερα απ' τον εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, αντίστοιχα. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισώματος έναντι της GFP σε **(A)** ολικά ομογενοποιηήματα όγκων, που προέκυψαν απ' τις κυτταρικές σειρές N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ και **(B)** σε μιτοχονδριακά κλάσματα όγκων, που προέκυψαν απ' τις κυτταρικές σειρές N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ.

3.2.2.1. Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στη ρύθμιση της βιοσύνθεσης των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την καρκινογένεση

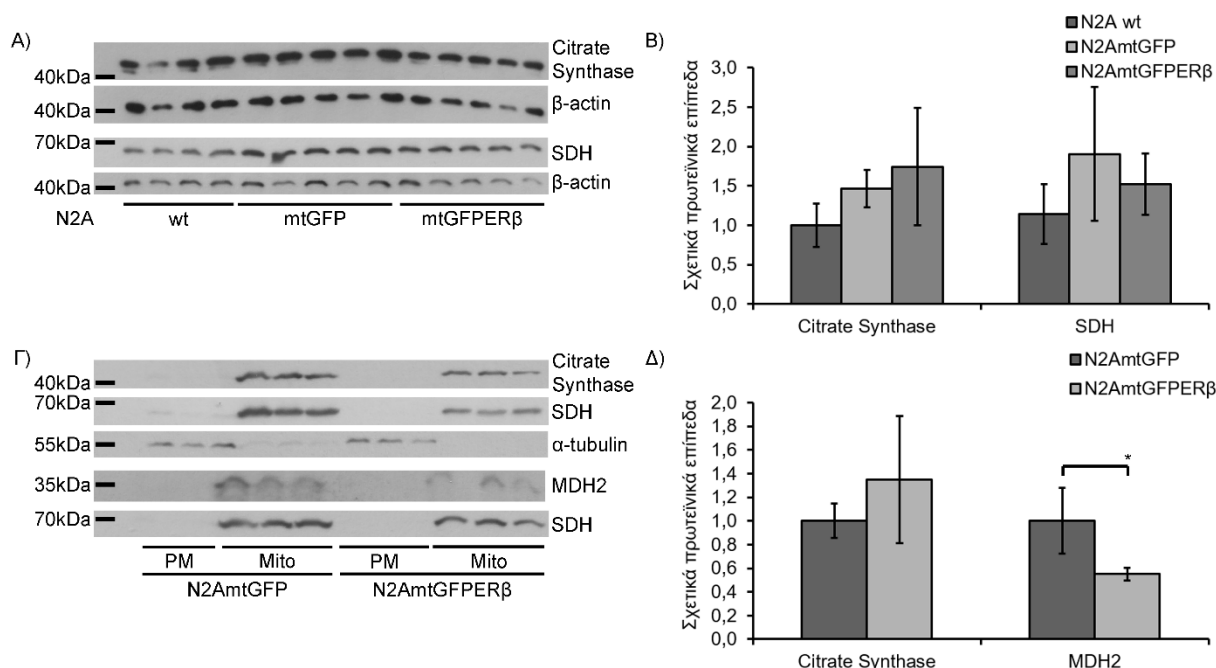
Η εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των COX I και COX IV OXPHOS υπομονάδων σε μιτοχονδριακά κλάσματα όγκων που αναπτύχθηκαν ύστερα από τον εμβολιασμό των μυών με τις δύο σταθερές κυτταρικές σειρές έδειξε ότι η υπερέκφραση του mtERβ προκαλεί κατά 3 και 2 φορές, αντίστοιχα, αύξηση των μιτοχονδριακών επιπέδων της μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενης OXPHOS υπομονάδας COX I και της πυρηνικά κωδικοποιούμενης OXPHOS υπομονάδας COX IV (Εικόνα 34).



Εικόνα 34: Η υπερέκφραση του mtERβ συντελεί στην αύξηση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνικών επιπέδων των υπομονάδων της αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορυλίωσης COX I και COX IV, κατά την ογκογένεση και ανάπτυξη όγκων. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western των ενζύμων COX I και COX IV σε μιτοχονδριακά (Mito) κλάσματα όγκων, που αναπτύχθηκαν ύστερα από τον εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ. Τα επίπεδα των COX I και COX IV κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της SDH. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απεικονίζεται στο **(B)**. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 3), ** p < 0.01.

3.2.2.2. Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενζύμων της μεταβολικής οδού του κύκλου του κιτρικού οξέος κατά την καρκινογένεση

Τα μόρια που μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη ενότητα αφορούν ένζυμα που εμπλέκονται στο κύκλο του κιτρικού οξέος και από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι η υπερέκφραση του mtERβ δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της συνθάσης του κιτρικού (Citrate Synthase) και της SDH (Εικόνα 35). Καθώς δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές των πρωτεϊνικών επιπέδων της SDH μεταξύ των τριών τύπων όγκων, που αναπτύχθηκαν, η SDH χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνικών επιπέδων των υπό μελέτη μορίων της παρούσας εργασίας. Σε αντίθεση με τα παραπάνω παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση, της τάξης του 50%, των μιτοχονδριακών πρωτεϊνικών επιπέδων της ισομορφής 2 της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος (Malate DeHydrogenase 2, MDH2) σε μιτοχονδριακά κλάσματα όγκων που προέκυψαν από τα κύτταρα N2AmtGFPERβ, σε σύγκριση με τα επίπεδα αυτής σε μιτοχονδριακά κλάσματα όγκων που προέκυψαν από τα κύτταρα N2AmtGFP (Εικόνα 35Γ και Δ).

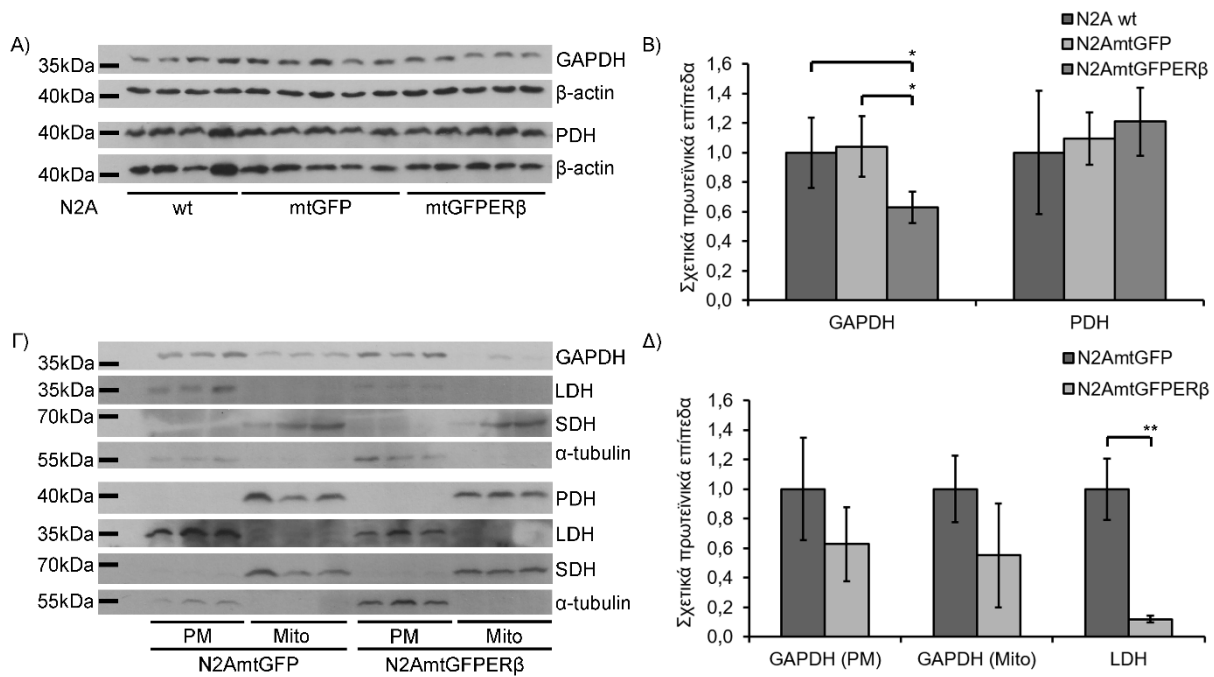


Εικόνα 35: Η υπερέκφραση του mtERβ συντελεί στη μείωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνικών επιπέδων της MDH2, κατά την ογκογένεση και ανάπτυξη όγκων. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι της **Α)** κιτρικής συνθάσης και SDH σε ολικά ομογενοποιημένα όγκων, που αναπτύχθηκαν ύστερα από τον εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ, και **Γ)** κιτρικής συνθάσης και MDH2 σε μιτοχονδριακά (Mito) κλάσματα όγκων, που αναπτύχθηκαν ύστερα από τον εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ. Τα επίπεδα των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, καθώς και των πρωτεϊνών που προήλθαν από τα ολικά ομογενοποιημένα όγκων κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της εκάστοτε SDH και β-ακτίνης,

αντίστοιχα. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απεικονίζεται στο **(B)** και **(Δ)** αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή \pm S.D. (n= 3-5), * p < 0.05.

3.2.2.3. Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στα πρωτεϊνικά επίπεδα κομβικών μορίων ελέγχου του μεταβολισμού κατά την καρκινογένεση

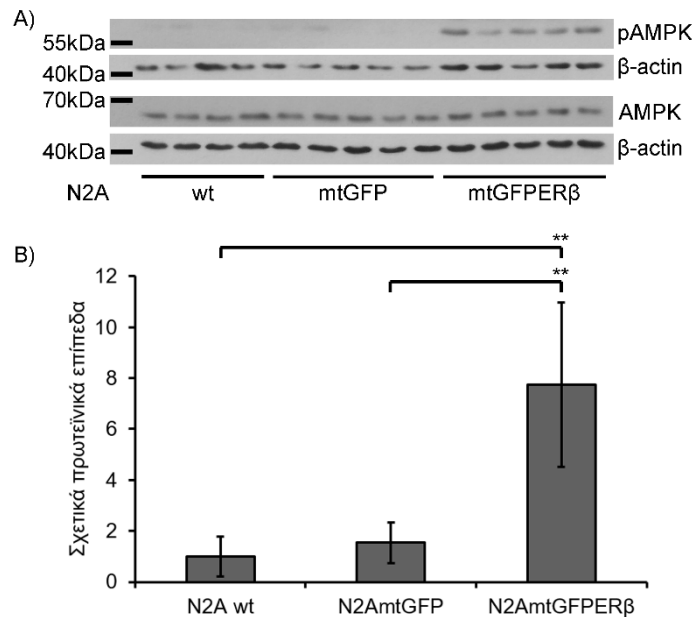
Για την αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στα πρωτεϊνικά επίπεδα κομβικών μορίων ελέγχου του μεταβολισμού κατά την καρκινογένεση, διερευνήθηκαν τα πιθανά διαφορικά επίπεδα έκφρασης των ενζύμων αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος (Pyruvate DeHydrogenase, PDH), αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase, GAPDH) και αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος (Lactate DeHydrogenase, LDH), στους τρεις τύπους όγκων που παράχθηκαν. Στην Εικόνα 36 παρατηρούμε ότι ανιχνεύτηκαν παρόμοια επίπεδα της PDH, τόσο στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα όσο και στα μιτοχονδριακά κλάσματα των όγκων όλων των συνθηκών που μελετήθηκαν, υποδηλώνοντας τη μη εμπλοκή του mtERβ στη ρύθμιση των επιπέδων της. Αντίθετα, ο mtERβ φαίνεται να επάγει έως και 40% στατιστικά σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της GAPDH, όπως παρατηρούμε ύστερα από αξιολόγηση και σύγκριση των επιπέδων της στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των όγκων των τριών συνθηκών (Εικόνα 36A, B). Αντίστοιχη τάση μείωσης εμφανίζεται και στα αντίστοιχα κυτταροπλασματικά (PM) και μιτοχονδριακά (Mito) κλάσματα, χωρίς όμως αυτή να είναι στατιστικά σημαντική (Εικόνα 36Γ, Δ). Τέλος ο mtERβ επάγει στατιστικά σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της LDH, της τάξης του 90%, γεγονός που υποδηλώνεται από τη μειωμένη ανίχνευση των επιπέδων της στα κυτταροπλασματικά κλάσματα (PM) των όγκων που υπερεκφράζουν τον mtGFPERβ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κλάσματα των όγκων που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα αναφοράς (Εικόνα 36Γ, Δ).



Εικόνα 36: Η υπερέκφραση του mtER β συντελεί στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων GAPDH και LDH, κατά την ογκογένεση και ανάπτυξη όγκων. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι της Α) GAPDH και PDH σε ολικά ομογενοποιημένα όγκων, που αναπτύχθηκαν ύστερα από τον εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPER β , και Γ) GAPDH, PDH και LDH σε κυτταροπλασματικά (PM) και μιτοχονδριακά (Mito) κλάσματα όγκων, που αναπτύχθηκαν ύστερα από τον εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές N2AmtGFP και N2AmtGFPER β . Τα επίπεδα των κυτταροπλασματικών και μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, καθώς και των πρωτεϊνών που προήλθαν από τα ολικά ομογενοποιημένα όγκων κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της εκάστοτε α -τουμπουλίνης, SDH και β -ακτίνης, αντίστοιχα. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απεικονίζεται στο (B) και (Δ) αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή \pm S.D. (n= 3-5), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.2.2.4. Αξιολόγηση της επίδρασης του mtERβ στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της AMPK στο αμινοξύ Thr 172 κατά την καρκινογένεση

Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 37, στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των όγκων που προέκυψαν από τα κύτταρα N2AmtGFPERβ παρατηρείται 4 με 10 φορές στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της AMPK (phospho AMPK, pAMPK) στο αμινοξύ θρεονίνη 172 (Threonine 172, Thr172) σε σύγκριση με επίπεδα αυτής σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των όγκων που προέκυψαν από τα κύτταρα αναφοράς. Δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της AMPK στους τρεις τύπους όγκων.

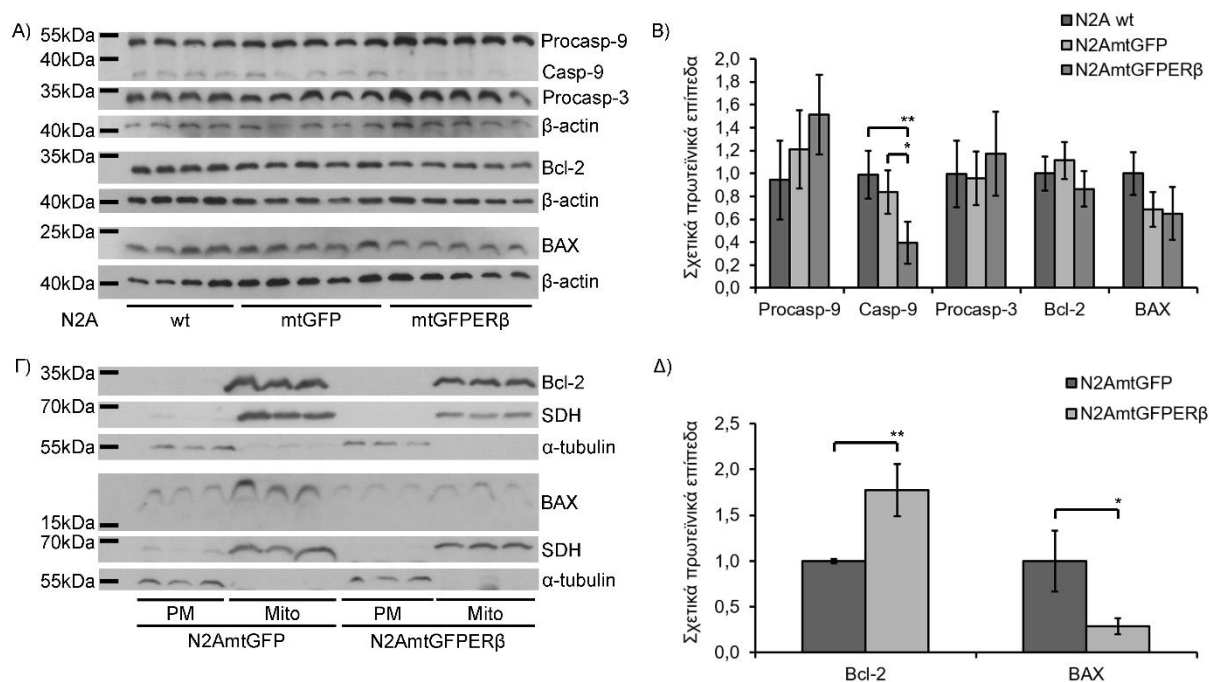


Εικόνα 37: Η υπερέκφραση του mtERβ συντελεί στην αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της AMPK στο αμινοξύ Thr172, κατά την ογκογένεση και ανάπτυξη όγκων. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των μορίων pAMPK (Thr172) και AMPK σε ολικά ομογενοποιημένα όγκων, που αναπτύχθηκαν ύστερα από τον εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ. **(B)** Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων προέκυψε ύστερα από κανονικοποίηση του λόγου της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων pAMPK / AMPK, εφόσον είχε προηγηθεί η κανονικοποίηση του κάθε μορίου ως προς την πυκνότητα των αντίστοιχων πρωτεϊνικών ζωνών της εκάστοτε β-ακτίνης. Ο παραπάνω λόγος ορίστηκε ως 1 στα κύτταρα αναφοράς. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή \pm S.D. (n= 4-5), ** p < 0.01.

3.2.2.5. Αξιολόγηση της εμπλοκής του mtERβ σε αποπτωτικούς μηχανισμούς κατά την καρκινογένεση

Προκειμένου να διερευνηθεί η εμπλοκή του mtERβ σε αποπτωτικούς μηχανισμούς κατά την καρκινογένεση αξιολογήθηκε η επίδραση του υποδοχέα στα πρωτεϊνικά επίπεδα των (προ)κασπασών -9 και -3, του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2 και του προαποπτωτικού μορίου BAX, τόσο σε ολικά ομογενοποιημένα, όσο και σε εμπλουτισμένα κυτταροπλασματικά (PM) και μιτοχονδριακά (Mito) κλάσματα όγκων, που αναπτύχθηκαν ύστερα από εμβολιασμό των μυών με τις τρεις κυτταρικές σειρές N2A.

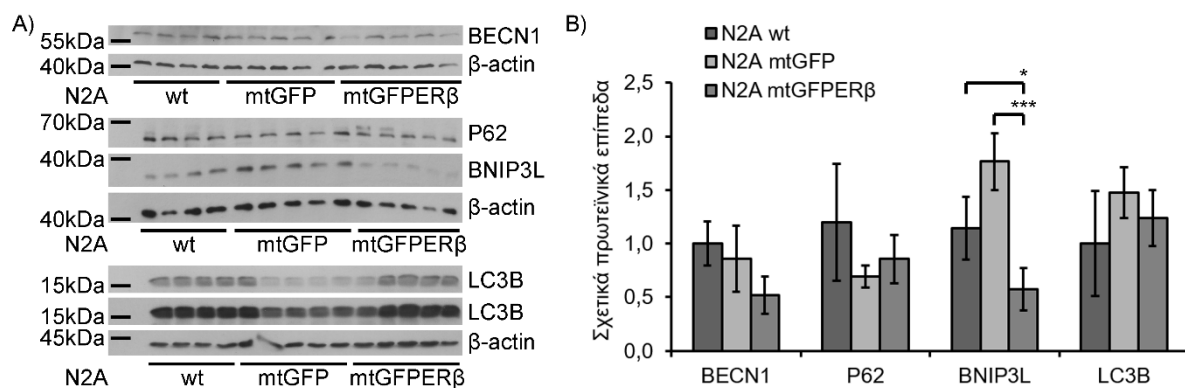
Στην Εικόνα 38A δεν παρατηρούμε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων BAX, Bcl-2, προκασπάση -9 και -3 ανάμεσα στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των όγκων των τριών συνθηκών. Αντίθετα, παρατηρούμε 1,5 με 2 φορές αύξηση των επιπέδων της κασπάσης 9 σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα όγκων που προέκυψαν από τα κύτταρα αναφοράς, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδά της σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα όγκων που υπερεκφράζουν τον mtERβ. Επιπλέον παρατηρούμε αύξηση των μιτοχονδριακών επιπέδων της πρωτεΐνης Bcl-2 κατά 1,5 με 2 φορές και μείωση των μιτοχονδριακών επιπέδων της πρωτεΐνης BAX κατά 2 φορές σε μιτοχονδριακά κλάσματα όγκων, που αναπτύχθηκαν από τον εμβολιασμό των μυών με τα κύτταρα N2AmtGFPERβ, κατά τη σύγκριση τους με τα αντίστοιχα επίπεδα των μορίων σε μιτοχονδριακά κλάσματα όγκων, που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα N2AmtGFP (Εικόνα 38B).



Εικόνα 38: Η υπερέκφραση του mtERβ συντελεί στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της κασπάσης 9, στη μείωση των μιτοχονδριακών επιπέδων της πρωτεΐνης BAX και στην αύξηση των μιτοχονδριακών επιπέδων της πρωτεΐνης Bcl-2, κατά την ογκογένεση και ανάπτυξη όγκων. Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των μορίων (προ)κασπάση -9 και -3, Bcl-2 και BAX σε **(Α)** ολικά ομογενοποιημένα όγκων, που αναπτύχθηκαν ύστερα από τον εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ και **(Γ)** σε μιτοχονδριακά κλάσματα όγκων, που αναπτύχθηκαν ύστερα από τον εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ. Τα επίπεδα των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, καθώς και των πρωτεϊνών που προήλθαν από τα ολικά ομογενοποιημένα όγκων κανονικοποιήθηκαν ως προς τα πρωτεϊνικά επίπεδα της εκάστοτε SDH και β-ακτίνης, αντίστοιχα. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απεικονίζεται στο **(Β)** και **(Δ)** αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 3-5), * p < 0.05, ** p < 0.01.

3.2.2.6. Αξιολόγηση της εμπλοκής του mtERβ στην αυτοφαγία κατά την καρκινογένεση

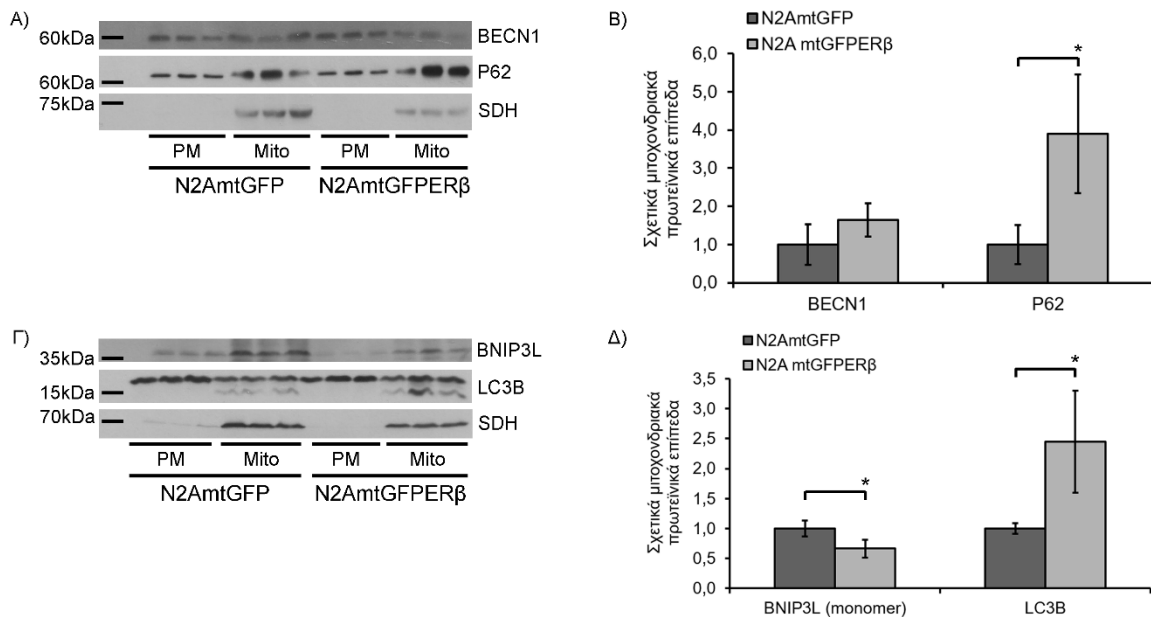
Στην ενότητα αυτή μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα κομβικών μορίων ελέγχου της αυτοφαγίας/μιτοφαγίας (Εικόνα 39). Εφαρμόζοντας ανοσοαποτύπωση κατά Western στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των όγκων που προέκυψαν και από τις τρεις κυτταρικές σειρές, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα των πρωτεϊνών P62, BECN1 και LC3B. Αντίθετα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης BNIP3L παρουσία του mtERβ (Εικόνα 39).



Εικόνα 39: Η υπερέκφραση του mtERβ συντελεί στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του BNIP3L, κατά την ογκογένεση και ανάπτυξη όγκων. **Α)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των BECN1, P62, BNIP3L και LC3B σε ολικά ομογενοποιημένα όγκων, που αναπτύχθηκαν ύστερα από τον εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ. Τα επίπεδα των υπό μελέτη πρωτεϊνών κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της εκάστοτε β-ακτίνης. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απεικονίζεται στο **(Β)**. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 4-5), * p < 0.05, *** p < 0.001.

Στη συνέχεια ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων αυτών σε μιτοχονδριακά κλάσματα που απομονώθηκαν από τους όγκους που αναπτύχθηκαν ύστερα από τον

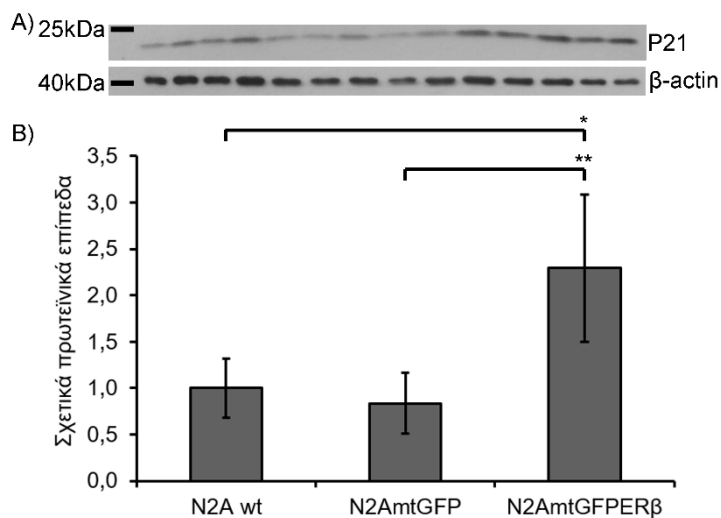
εμβολιασμό των μυών με τις σταθερές κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στην Εικόνα 40, φανερώνουν ότι ο mtERβ επάγει στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων των μιτοχονδριακών P62 και LC3B και στατιστικά σημαντική μείωση του μιτοχονδριακού BNIP3L. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα μιτοχονδριακά επίπεδα του BECN1 ανάμεσα στους δύο τύπους όγκων που αναπτύχθηκαν.



Εικόνα 40: Η υπερέκφραση του mtERβ συντελεί στη μείωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνικών επιπέδων του BNIP3L και αύξηση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνικών επιπέδων των P62 και LC3B, κατά την ογκογένεση και ανάπτυξη όγκων. **Α, Γ** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των BECN1, P62, BNIP3L και LC3B σε μιτοχονδριακά (Mito) κλάσματα όγκων, που αναπτύχθηκαν από τον εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ. Τα επίπεδα των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της εκάστοτε SDH. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απεικονίζεται στο **(B, Δ)**. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 3), * p < 0.05.

3.2.2.7. Αξιολόγηση της εμπλοκής του mtERβ στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου κατά την καρκινογένεση

Στη μελέτη αυτή ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του αναστολέα της CDK P21 και αποκαλύφθηκε η στατιστικά σημαντική αύξηση αυτών, κατά 1,5 με 3 φορές, στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των όγκων που υπερεκφράζουν τον mtERβ, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα των όγκων που αναπτύχθηκαν ύστερα από εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές αναφοράς (Εικόνα 41).



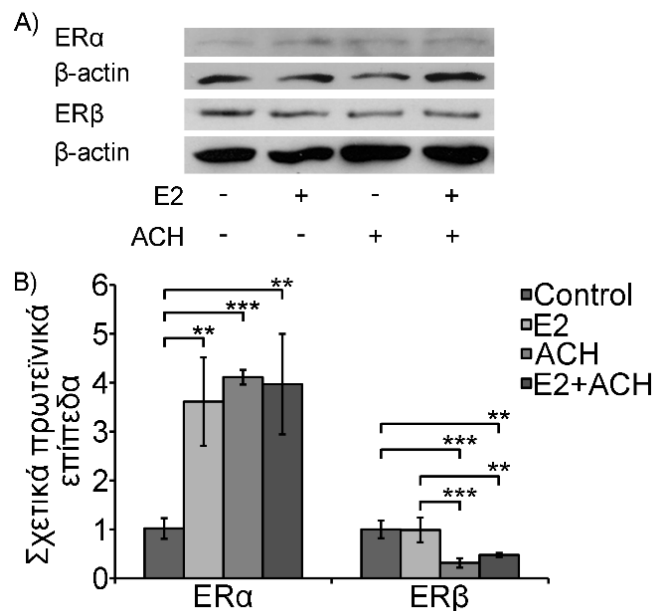
Εικόνα 41: Η υπερέκφραση του mtERβ συντελεί στην αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του P21, κατά την ογκογένεση και ανάπτυξη όγκων. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισώματος έναντι του P21 σε ολικά ομογενοποιημένα όγκων, που αναπτύχθηκαν ύστερα από τον εμβολιασμό των μυών με τις κυτταρικές σειρές N2A wt, N2AmtGFP και N2AmtGFPERβ. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του P21 κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απεικονίζεται στο **(B)**. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n= 4-5), * p < 0.05, ** p < 0.01.

3.3. Διερεύνηση της εμπλοκής του αργιλίου στην οιστρογονική σηματοδότηση σε νευρικά κύτταρα

Από προηγούμενες μελέτες, τόσο της ερευνητικής μας ομάδας όσο και άλλων ερευνητικών ομάδων, έγινε γνωστό ότι οι ενώσεις αργιλίου επηρεάζουν την οιστρογονική σηματοδότηση, σε κύτταρα που προέρχονται από ορμονοεξαρτώμενο καρκίνο του μαστού, μέσω αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων (Gorgogietas, Tsialtas et al. 2018) αλλά και της μεταγραφικής δραστηριότητας του ER α (Darbre 2005, Gorgogietas, Tsialtas et al. 2018). Στη παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η επίδραση του αργιλίου (Al), χρησιμοποιώντας ιόντα αργιλίου υπό τη μορφή υδροξυχλωριούχο αργίλιο (ACH), στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ERs, στην κατάσταση φωσφορυλίωσης του ER α στο αμινοξύ σερίνη 118, στην υποκυτταρική εντόπιση του ER β , στην παραγωγή ROS καθώς και στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης νευρικών κυττάρων και συγκεκριμένα κυττάρων νευροβλαστώματος SH-SY5Y. Όπως διαπιστώσαμε στην ενότητα 3.1.2. (Εικόνα 17) και γνωρίζουμε και από τη βιβλιογραφία (Liang, Xie et al. 2015, Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020), ο ER β εκφράζεται φυσιολογικά στα κύτταρα SH-SY5Y και εντοπίζεται σε σημαντικό βαθμό στα μιτοχόνδρια αυτών, για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν τα κύτταρα SH-SY5Y για τη διεξαγωγή των πειραματικών διεργασιών και της παρούσας ενότητας. Σημαντικός λόγος όμως επιλογής της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς αποτέλεσε και η γνωστή από τη διεθνή βιβλιογραφία αντιοξειδωτική και νευροπροστατευτική δράση που ασκούν οι ERs, και ειδικότερα ο ER β , στα νευρικά κύτταρα και κατ' επέκταση στο νευρικό ιστό (Simpkins, Yi et al. 2010). Επιπλέον η κυτταρική σειρά SH-SY5Y χρησιμοποιείται κατά κόρον για την εκτίμηση των νευροτοξικών δράσεων διαφόρων ενώσεων (Valdiglesias, Costa et al. 2013, Maddirala, Tobwala et al. 2015, Morales-Hernandez, Corrales-Redondo et al. 2016). Βάσει των παραπάνω η κυτταρική σειρά SH-SY5Y κρίθηκε κατάλληλη τόσο για τη μελέτη της εμπλοκής του Al στην οιστρογονική σηματοδότηση όσο και για τη συσχέτιση της πιθανής αυτής δράσης με τις επαγόμενες από το Al νευροτοξικές δράσεις.

3.3.1. Αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα των ERs (ERα και ERβ) σε κύτταρα SH-SY5Y

Με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρησιμοποιώντας κατάλληλα αντισώματα έναντι των μορίων ERα (Santa Cruz Biotechnology), ERβ (H-150, Santa Cruz Biotechnology) και β-ακτίνης (Sigma) αξιολογήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ERs σε κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία είχαν επωαστεί με 10^{-4} M ACH ή/και 10^{-9} M E2 για 3 ημέρες. Στην Εικόνα 42 παρατηρούμε 3 με 5 φορές στατιστικά σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα στα κύτταρα SH-SY5Y παρουσία ACH (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020), κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες μας που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα MCF-7 (Gorgogietas, Tsialtas et al. 2018). Επίσης και η E2 επάγει την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα, αλλά όταν χορηγηθεί μαζί με το ACH δεν παρατηρείται κάποια αθροιστική δράση αυτών. Τέλος ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι το ACH, είτε χορηγηθεί μόνο του σε κύτταρα SH-SY5Y είτε χορηγηθεί μαζί με την E2, επάγει 2-3 φορές στατιστικά σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς (Εικόνα 42) (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020).



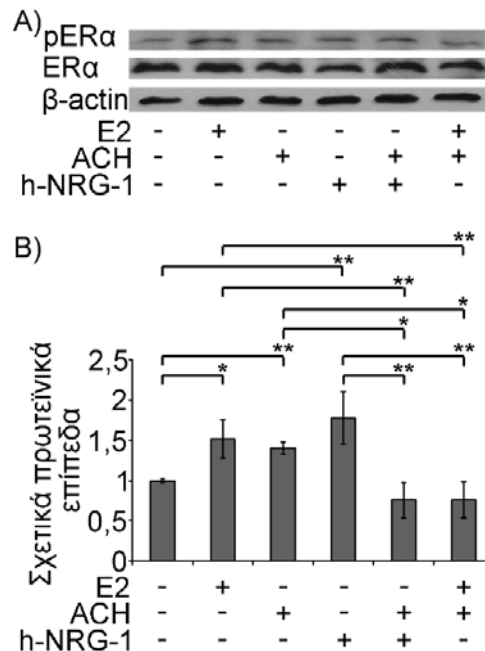
Εικόνα 42: Αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα και μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ σε κύτταρα SH-SY5Y, υπό την επίδραση του ACH. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των μορίων ERα (Santa Cruz Biotechnology), ERβ (H-150, Santa Cruz Biotechnology) και β-ακτίνης σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία είχαν επωαστεί με 10^{-4} M ACH ή/και 10^{-9} M E2 για 3 ημέρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ERs κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απεικονίζεται στο **(B)**. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ERs ορίστηκαν ως 1 στα κύτταρα αναφοράς. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή \pm S.D. (n=3), ** p < 0.01, *** p < 0.001.

3.3.2. Αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στην κατάσταση φωσφορυλίωσης του ERα στο αμινοξύ Ser 118 σε κύτταρα SH-SY5Y

Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα επίπεδα του ERβ ελέγχονται από τα επίπεδα του ERα (Nomura, Korach et al. 2003), του οποίου η σταθερότητα σχετίζεται με την κατάσταση φωσφορυλίωσής του (Tecalco-Cruz and Ramirez-Jarquin 2017). Η φωσφορυλίωση του ERα (phospho ERα, pERα) στο αμινοξύ σερίνη 118 (Serine 118, Ser 118, S118) αναστέλλει την επαγόμενη από την ουβικιτίνη πρωτεολυτική του αποικοδόμηση (Totta, Busonero et al. 2016, Tecalco-Cruz and Ramirez-Jarquin 2017). Προκειμένου να διερευνηθεί εάν το ACH επηρεάζει την κατάσταση φωσφορυλίωσης του ERα ελέγχθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα τόσο του pERα (S118) όσο και του ERα, με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western, σε κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία είχαν επωαστεί με 10^{-9} M E2, 10^{-4} M ACH, ή 100 ng/ml ανθρώπινης νευρορεγουλίνης 1b (human neuregulin 1b, h-NRG-1), καθώς και με συνδυασμό αυτών των ουσιών, για 30 λεπτά. Για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων pERα (S118) και ERα χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα αντισώματα που προμηθευτήκαμε από τις εταιρείες Cell Signaling και Santa Cruz Biotechnology, αντίστοιχα. Τα κύτταρα που επώαστηκαν με h-NRG-1 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικός μάρτυρας καθώς η h-NRG-1, ανεξαρτήτως προσδέτη, επάγει τη φωσφορυλίωση του ERα στη S118, μέσω ενεργοποίησης της σηματοδότησης του EGF (McGlynn, Tovey et al. 2013, Anbalagan and Rowan 2015). Η επιλογή των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν οι παραπάνω ουσίες (E2, ACH και h-NRG-1) βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες (Goldshmit, Erlich et al. 2001, Darbre 2005, Simmons, Surles-Zeigler et al. 2016, Gorgogietas, Tsialtas et al. 2018).

Στην Εικόνα 43 παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση, κατά 1,5 έως 2 φορές, των επιπέδων του pERα (S118) στα κύτταρα SH-SY5Y που είχαν επωαστεί με E2, ACH ή h-NRG-1, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς. Όταν όμως οι ουσίες E2 και h-NRG-1 χορηγήθηκαν μαζί με το ACH, παρατηρήθηκε αναίρεση αυτής της δράσης. Συγκεκριμένα το ACH προκάλεσε 2 με 3 φορές στατιστικά σημαντική μείωση της επαγόμενης από την E2 και την h-NRG-1 αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του pERα (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας που έδειξαν ότι το ACH επάγει μείωση της επαγόμενης από την E2 αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων του pERα στα κύτταρα MCF-7 (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020). Όπως και είναι αναμενόμενο στο μικρό χρονικό διάστημα, 30 λεπτά, επώασης των κυττάρων SH-

SY5Y με τις προαναφερθείσες ουσίες ανιχνεύονται μόνο μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και όχι αλλαγές στην παραγωγή των πρωτεϊνών. Αυτό αποδεικνύεται από τα σταθερά πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα που παρατηρήθηκαν σε όλες τις συνθήκες του πειράματος.



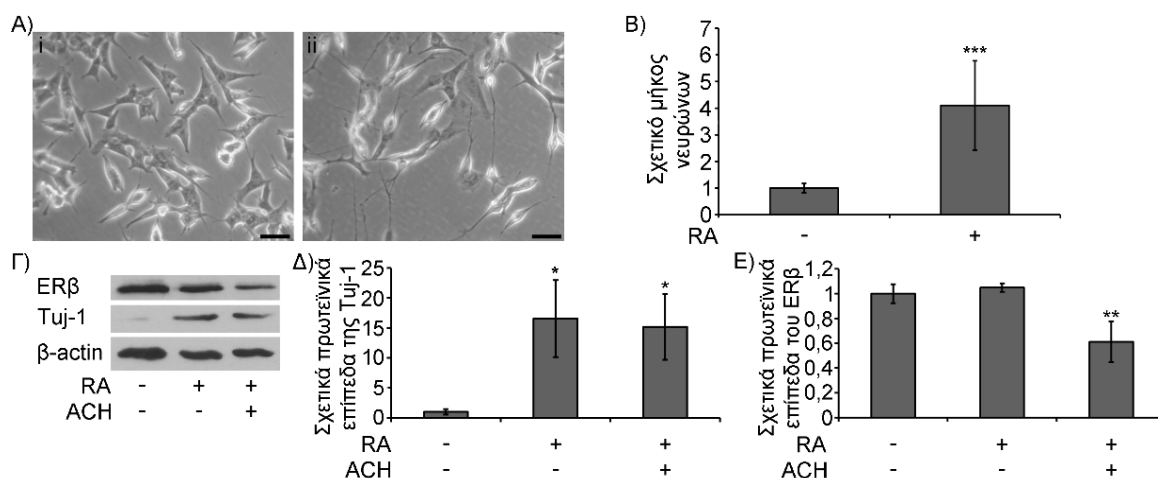
Εικόνα 43: Αναστολή της επαγόμενης από την E2 φωσφορυλίωσης του ERα στο αμινοξύ S118 σε κύτταρα SH-SY5Y, υπό την επίδραση του ACH. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των μορίων pERα (Cell Signalling) και ERα (Santa Cruz Biotechnology) σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία είχαν επωαστεί με 10^{-9} M E2, 10^{-4} M ACH, ή 100 ng/ml h-NRG-1, αλλά και με συνδυασμό αυτών των ουσιών, για 30 λεπτά. Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της β-ακτίνης. **B)** Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων προέκυψε ύστερα από κανονικοποίηση του λόγου της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων pERα / ERα ως προς την πυκνότητα των αντίστοιχων πρωτεϊνικών ζωνών της β-ακτίνης. Ο παραπάνω λόγος ορίστηκε ως 1 στα κύτταρα αναφοράς. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή \pm S.D. (n=3), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.3.3. Αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y

Τα κύτταρα SH-SY5Y επώαστηκαν για 8-10 ημέρες με 10μM RA σε θρεπτικό μέσο χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (1mg/ml), στο οποίο είχε προστεθεί 1% FBS, έτσι ώστε να ενεργοποιηθεί η διαδικασία διαφοροποίησή τους σε νευρικά κύτταρα. Η διαφοροποίηση των κυττάρων SH-SY5Y επιβεβαιώθηκε τόσο από τις επαγόμενες αλλαγές στη μορφολογία τους όσο και από την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Tuj-1 σε σύγκριση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε κανονικό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Η Tuj-1 αποτελεί ένα εξειδικευμένο μόριο – δείκτης διαφοροποίησης νευρικών

κυττάρων (Li, Ragheb et al. 2003, Georgoroulou, Hurel et al. 2006, Hsu, Liu et al. 2014, Zhang, Ma et al. 2019). Αναλυτικότερα στην Εικόνα 44A παρατηρούμε τις μορφολογικές διαφορές που εμφανίζουν τα διαφοροποιημένα (Εικόνα 44Aii) σε σύγκριση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y (Εικόνα 44Ai). Επίσης στην Εικόνα 44B παρατηρούμε στατιστικά σημαντική αύξηση του μήκους των νευρώνων στα διαφοροποιημένα κύτταρα έως και 4 φορές περισσότερο σε σύγκριση με τα μη διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα. Επιπρόσθετα, με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρήση αντισώματος έναντι της Tuj-1 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Tuj-1 στα κύτταρα SH-SY5Y που επώαστηκαν με RA σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς, τα οποία εμφανίζουν σχεδόν μη ανιχνεύσιμα επίπεδα της Tuj-1, (Εικόνες 44Γ και 44Δ) επιβεβαιώνοντας την επίτευξη της διαφοροποίησης των SH-SY5Y κυττάρων (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020).

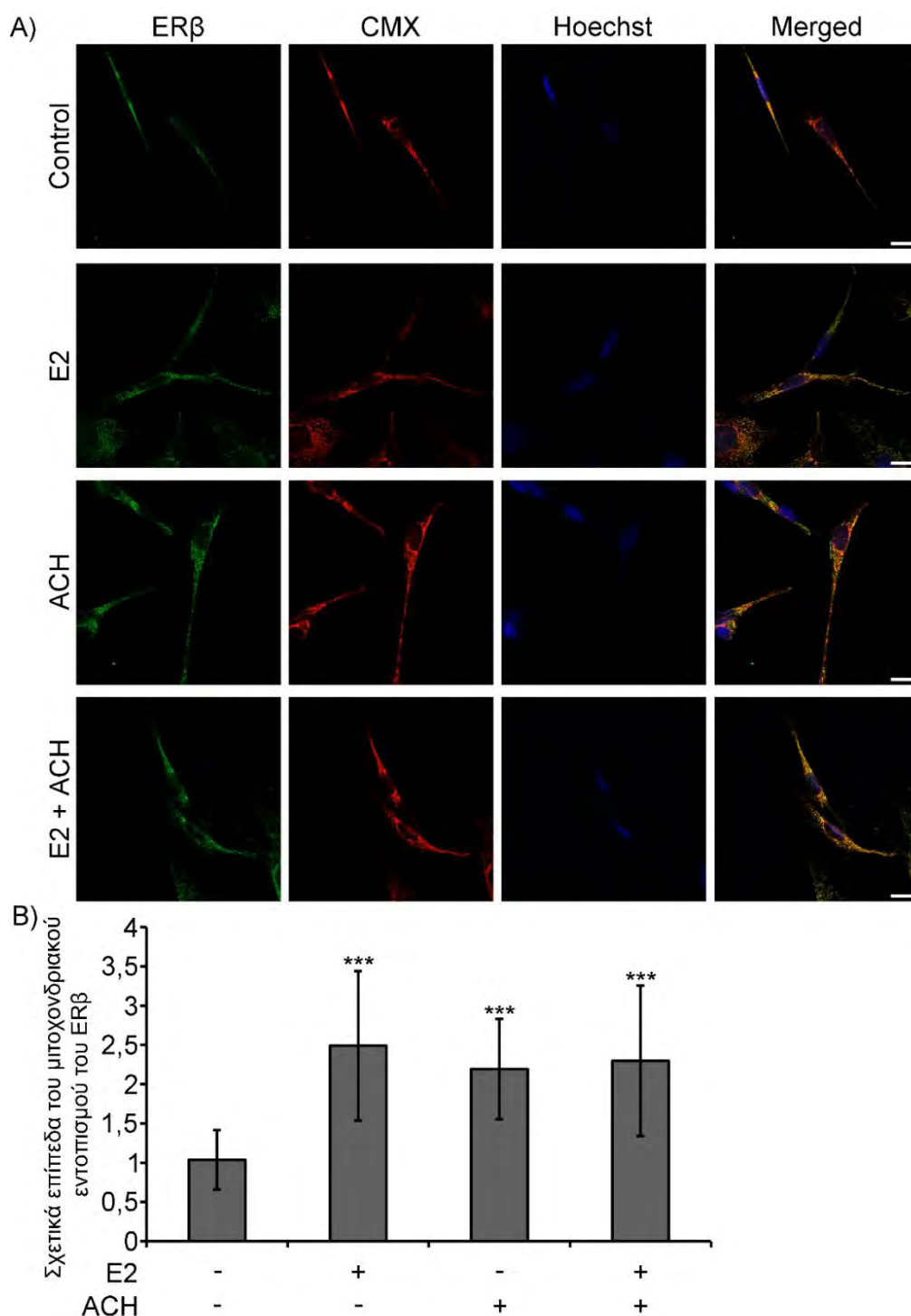
Με εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα από μη διαφοροποιημένα αλλά και διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία είχαν κατεργαστεί με $10^{-4}M$ ACH για 3 ημέρες σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης απαλλαγμένο από ορμόνες, αξιολογήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ με χρήση αντισώματος έναντι του ERβ (ERβ-MCA, Serotec). Όπως φαίνεται στις Εικόνες 44Γ και 44Ε το ACH επάγει 40% μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς (διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y που δεν επώαστηκαν με το ACH) (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020). Παρόμοια μείωση των επιπέδων του ERβ παρουσία ACH παρατηρήσαμε και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y (Εικόνα 42).



Εικόνα 44: Μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y, υπό την επίδραση του ACH. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες, που ελήφθησαν με εφαρμογή μικροσκοπίας με διάταξη αντίθετης φάσης, από κύτταρα SH-SY5Y σε καλλιέργεια **(i)** παρουσία θρεπτικού μέσου ανάπτυξης, και **(ii)** παρουσία θρεπτικού μέσου διαφοροποίησης (θρεπτικό μέσο που περιέχει 1% FBS και 10μM RA). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 50μm. **B)** Αξιολόγηση της επίτευξης της διαφοροποίησης μέσω ποσοτικοποίησης του μήκους των νευρώνων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n=20), *** p < 0.001 σε σύγκριση με τα μη κατεργασμένα με RA κύτταρα. **Γ)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση αντισωμάτων έναντι των μορίων Tuj-1 και ERβ (ERβ-MCA, Serotec) σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα διαφοροποιημένων και μη κυττάρων SH-SY5Y, που επώαστηκαν με 10⁻⁴M ACH για 3 ημέρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των Tuj-1 και ERβ κανονικοποιήθηκαν ως προς τα αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα της β-ακτίνης. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων απεικονίζεται στο (Δ) και (Ε) αντίστοιχα. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των παραπάνω μορίων ορίστηκαν ως 1 στα μη διαφοροποιημένα και μη κατεργασμένα με ACH κύτταρα SH-SY5Y. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέση τιμή ± S.D. (n=3), * p < 0.05 σε σύγκριση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y και ** p < 0.01 σε σύγκριση με τα κύτταρα, διαφοροποιημένα ή μη, που δεν έχουν κατεργαστεί με το ACH.

3.3.4. Αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στην υποκυτταρική εντόπιση του ERβ σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y

Με εφαρμογή ανοσοφθορισμού και χρήση αντισώματος έναντι του ERβ (H-150, Santa Cruz Biotechnology) αξιολογήθηκε η υποκυτταρική εντόπιση του ERβ σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y, μετά την επώασή τους με 10⁻⁹M E2 ή / και 10⁻⁴M ACH για 2 ώρες σε θρεπτικό διαφοροποίησης απαλλαγμένο από ορμόνες. Τα αποτελέσματα, που αναπαρίστανται στην Εικόνα 45, φανερώνουν ότι το ACH αυξάνει κατά 2,5 φορές τη μιτοχονδριακή εντόπιση του ERβ. Αυξημένη μιτοχονδριακή εντόπιση του ERβ φαίνεται να επάγει και η E2 (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και ενισχύουν αποτελέσματα προηγούμενων μελετών μας σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y, όπου παρατηρήσαμε σε όμοιες πειραματικές συνθήκες ότι το ACH και η E2 επάγουν κατά 2 φορές την αύξηση της μιτοχονδριακής εντόπισης του ERβ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα κύτταρα αναφοράς (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020).

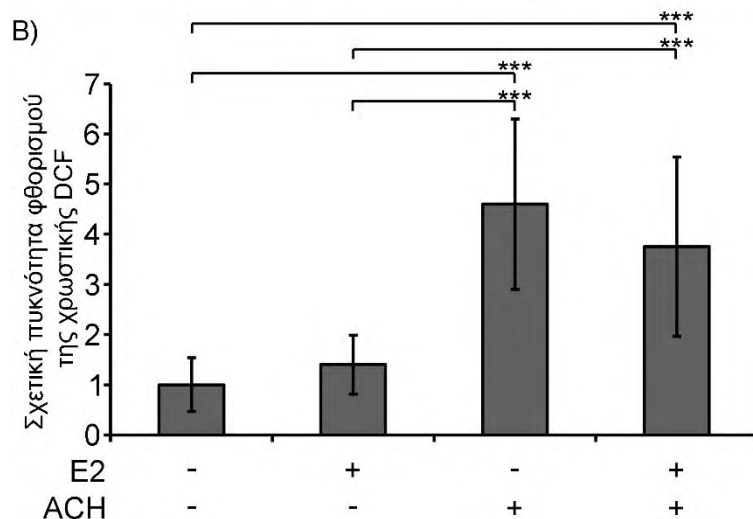
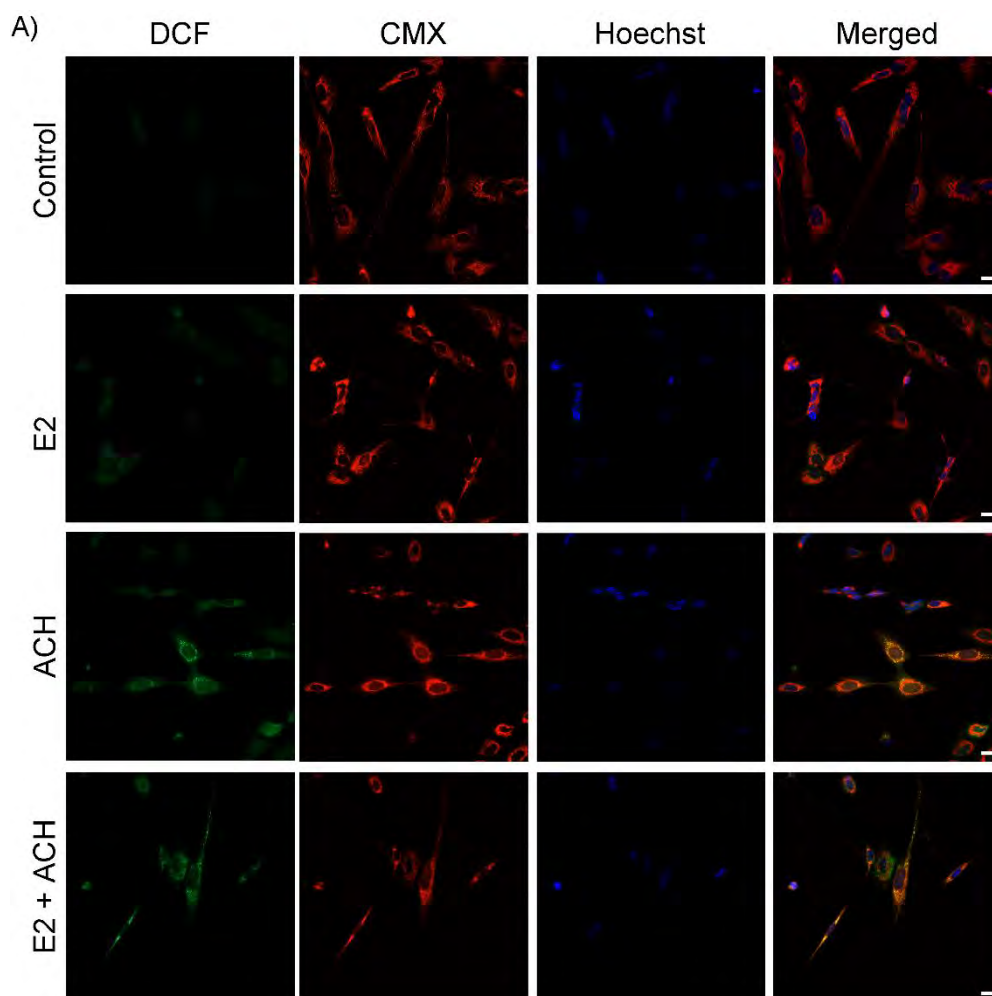


Εικόνα 45: Επαγωγή της μετατόπισης του ERβ στα μιτοχόνδρια διαφοροποιημένων κυττάρων SH-SY5Y, υπό την επίδραση του ACH. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες της επίδρασης του ACH στην υποκυτταρική εντόπιση του ERβ. Με εφαρμογή ανοσοφθορισμού σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y, που είχαν επωαστεί με 10^{-9} M E2 ή/και με 10^{-4} M ACH για 2 ώρες, και με χρήση πρωτογενούς αντισώματος έναντι του ERβ (H-150, Santa Cruz Biotechnology) και δευτερογενούς αντισώματος σημασμένου με Alexa 488 (πράσινο) πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση του ERβ. Οι εικόνες ελήφθησαν με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Οι χρωστικές CMX και Hoechst 33342 χρησιμοποιήθηκαν για τη σήμανση των μιτοχονδρίων και των πυρήνων αντίστοιχα. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 20μm. **B)** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων ύστερα από αξιολόγηση του συνεντοπισμού του ERβ με την χρωστική CMXRos. Η πυκνότητα του πράσινου φθορισμού στα κύτταρα αναφοράς ορίστηκε ως 1. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή \pm S.D. (n=20), *** p < 0.001 σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς, τα οποία δεν έχουν κατεργαστεί με τις προαναφερθείσες ουσίες.

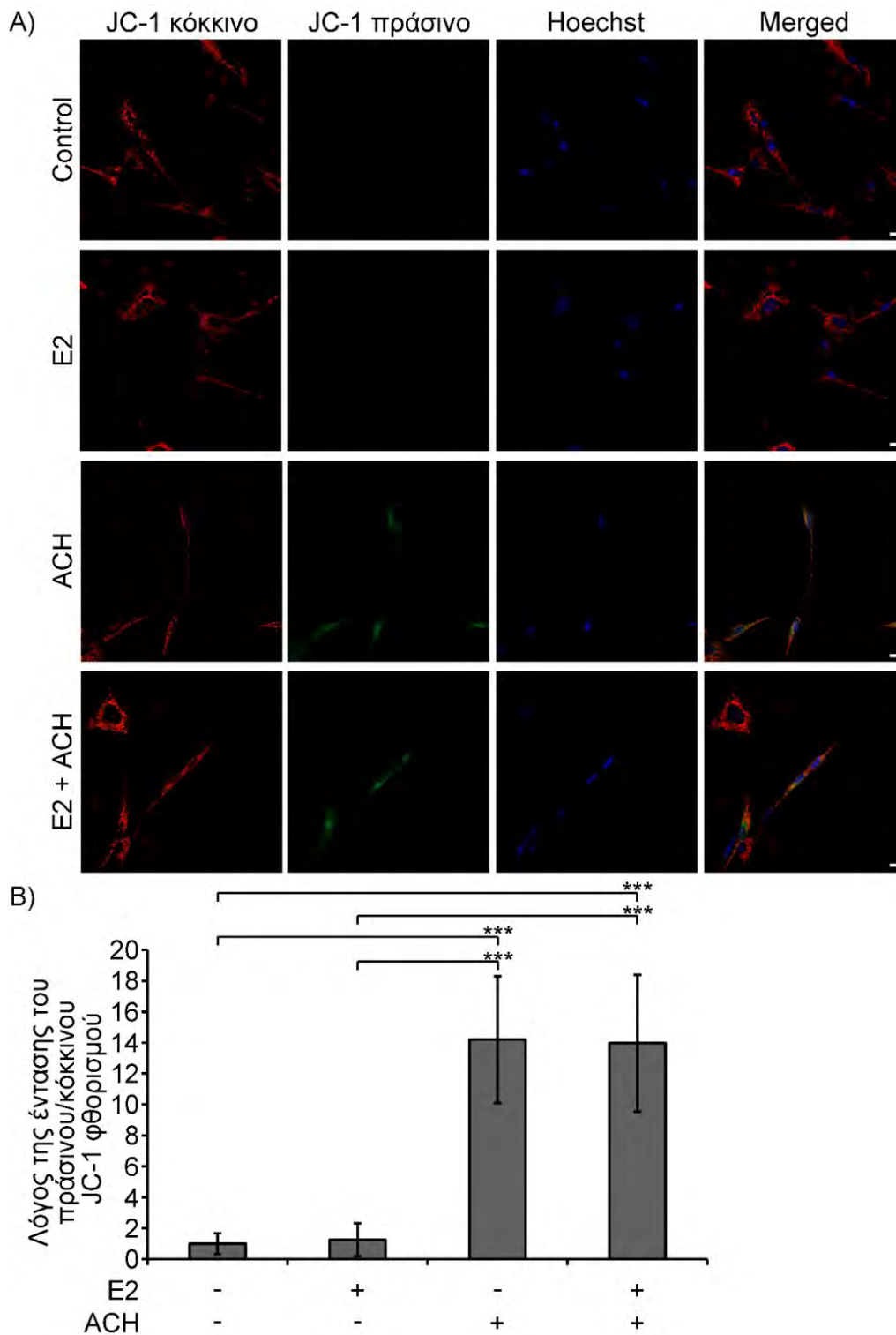
3.3.5. Αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στην παραγωγή ROS καθώς και στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y

Διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y επώαστηκαν για 70-74 ώρες με 10^{-9} M E2 ή / και 10^{-4} M ACH σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης απαλλαγμένο από ορμόνες. Στη συνέχεια επώαστηκαν για 30 λεπτά σε θρεπτικό μέσο DMEM απουσία του δείκτη κόκκινο της φαινόλης, στο οποίο είχαν προστεθεί είτε οι χρωστικές CMX, Hoechst 33342 και DCF για την αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στην παραγωγή ROS, είτε οι χρωστικές Hoechst 33342 και JC-1 για την αξιολόγηση της επίδρασης του ACH στη μεταβολή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης.

Στην Εικόνα 46 παρατηρούμε ότι τα διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y που επώαστηκαν με το ACH εμφάνισαν αυξημένα κατά 2 με 6 φορές επίπεδα φθορισμού της οξειδωμένης χρωστικής DCF (πράσινο) (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020), υποδεικνύοντας έτσι αυξημένα επίπεδα ROS σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς. Επίσης στην Εικόνα 47 παρατηρούμε ότι ο λόγος της έντασης του πράσινου / κόκκινου JC-1 φθορισμού αυξάνεται 10 με 18 φορές στα διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y που επώαστηκαν με το ACH, σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς, υποδηλώνοντας ότι το ACH επάγει την εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020). Όλες οι παραπάνω δράσεις του ACH συμβαίνουν ανεξαρτήτως της δράσης της E2 και συνεπώς και των επαγόμενων από την E2 δράσεων που επιτελούνται μέσω των ERs.



Εικόνα 46: Αύξηση της παραγωγής ROS σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y υπό την επίδραση του ACH. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες της επίδρασης του ACH στην παραγωγή ROS, οι οποίες ελήφθησαν με εφαρμογή συνεστιακής μικροσκοπίας σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y, που είχαν επωαστεί με 10^{-9} M E2 ή/και με 10^{-4} M ACH για 70-74 ώρες. Η οξείδωση της χρωστικής DCF από τα παραγόμενα ROS σημαίνεται με πράσινο χρώμα. Οι χρωστικές CMX και Hoechst 33342 χρησιμοποιήθηκαν για τη σήμανση των μιτοχονδρίων και των πυρήνων αντίστοιχα. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 20μm. **B)** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων ύστερα από αξιολόγηση της σχετικής πυκνότητας φθορισμού της χρωστικής DCF. Η πυκνότητα του πράσινου φθορισμού στα κύτταρα αναφοράς ορίστηκε ως 1. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή \pm S.D. (n=30), *** p < 0.001.



Εικόνα 47: Εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y υπό την επίδραση του ACH. **A)** Αντιπροσωπευτικές εικόνες της επίδρασης του ACH στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, οι οποίες ελήφθησαν με εφαρμογή συνεστιακής μικροσκοπίας σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y, που είχαν επωαστεί με 10^{-9} M E2 ή/και με 10^{-4} M ACH για 70-74 ώρες. Το ACH επάγει αύξηση του λόγου της έντασης του πράσινου / κόκκινου JC-1 φθορισμού, υποδηλώνοντας την εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η χρωστική Hoechst 33342 χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση των πυρήνων. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 20μm. **B)** Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με υπολογισμό του λόγου της πυκνότητας του πράσινου / κόκκινου JC-1 φθορισμού. Ο παραπάνω λόγος ορίστηκε ως 1 στα κύτταρα αναφοράς. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με one-way ANOVA και εκφράζονται ως μέση τιμή \pm S.D. (n=20-25), *** $p < 0.001$.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα οιστρογόνα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στο ανθρώπινο αναπαραγωγικό σύστημα, καθώς ρυθμίζουν την ανάπτυξη και τη φυσιολογία του. Ωστόσο παίζουν σημαντικό ρόλο και σε μια πληθώρα άλλων συστημάτων, όπως του νευρικού, του ανοσοποιητικού και του καρδιαγγειακού. Η οιστρογονική σηματοδότηση αποτελεί μια ισορροπία μεταξύ των δράσεων των δύο κύριων υποδοχέων οιστρογόνων, ERα και ERβ, καθώς και των ισομορφών αυτών στους ιστούς στόχους (Olefsky 2001, Deroo and Korach 2006, Heldring, Pike et al. 2007). Οι ERα και ERβ, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και ιστό, εμφανίζουν διαφορετικό προφίλ έκφρασης, ρυθμίζουν την έκφραση ίδιων αλλά και διαφορετικών γονιδίων και οι δράσεις τους επιτελούνται τόσο προς την ίδια όσο και προς αντίθετες κατευθύνσεις (Heldring, Pike et al. 2007, Thomas and Gustafsson 2011, Dey, Barros et al. 2013, Planey, Kumar et al. 2014, Warner, Huang et al. 2017). Ο μηχανισμός δράσης των ERs περιλαμβάνει άμεσες και έμμεσες γενωμικές δράσεις, κατά τις οποίες οι ERs εισέρχονται στον πυρήνα και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, και άμεσες μη γενωμικές δράσεις, στις οποίες οι μεμβρανικοί ERs ενεργοποιούν έναν καταρράκτη σηματοδότησης, μέσω ενεργοποίησης ενδιάμεσων κυτταροπλασματικών στόχων και ρυθμιστικών μορίων (Heldring, Pike et al. 2007, Gupte, Pownall et al. 2015, Hewitt and Korach 2018). Επιπλέον οι ERs, μέσω των παραπάνω μηχανισμών δράσης τους, επηρεάζουν έμμεσα τις μιτοχονδριακές λειτουργίες (Gupte, Pownall et al. 2015, Klinge 2017, Klinge 2020), αλλά και άμεσα, καθώς έχουν εντοπιστεί στα μιτοχόνδρια μιας πληθώρας κυττάρων (Chen, Yager et al. 2005, Solakidi, Psarra et al. 2005, Klinge 2017).

Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η εύρυθμη λειτουργία των νευρώνων εξαρτάται από τη διατήρηση της μιτοχονδριακής λειτουργίας προκειμένου να εξασφαλιστεί η επιτέλεση των πολύπλοκων διεργασιών τους, όπως η νευροδιαβίβαση και η πλαστικότητα. Μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες, που συσχετίζονται με αυξημένη παραγωγή ROS και οξειδωτική βλάβη συνδέονται με πολυάριθμες νευροεκφυλιστικές διαταραχές (Kann and Kovacs 2007, Johnson, Mercado-Ayon et al. 2021). Πληθώρα πειραματικών δεδομένων υποστηρίζουν ότι τα οιστρογόνα ασκούν προστατευτική δράση στον εγκέφαλο και ρυθμίζουν τις μιτοχονδριακές λειτουργίες στους νευρώνες (Dykens, Moos et al. 2005, Stanojlovic, Gusevac et al. 2016, Azcoitia, Barreto et al. 2019, Lu, Sareddy et al. 2020, Wang, Sareddy et al. 2020). Οι δράσεις αυτές των οιστρογόνων επιτελούνται μέσω πυρηνικών και μεμβρανικών

ERs (Mattingly, Ivanova et al. 2008, Psarra and Sekeris 2008), αλλά και ανεξαρτήτως των ERs (Azcoitia, Barreto et al. 2019, Guo, Liu et al. 2020). Τελευταία αναδεικνύεται και η νευροπροστατευτική δράση των μιτοχονδριακών ERs, και κυρίως του μιτοχονδριακού ERβ, όμως ελάχιστα δεδομένα είναι γνωστά όσον αφορά τον ακριβή μηχανισμό δράσης του στο οργανίδιο αυτό (Yang, Liu et al. 2004, Psarra and Sekeris 2008, Chen, Cammarata et al. 2009, Simpkins, Yi et al. 2010).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση του ρόλου του mtERβ στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας νευρικών κυττάρων, καθώς και των διαφόρων κυτταρικών διεργασιών που σχετίζονται με αυτή, τόσο υπό φυσιολογικές όσο και παθολογικές συνθήκες. Στο πλαίσιο αυτό, μελετήθηκε ο ρόλος του mtERβ στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, της παραγωγής ενέργειας, της αντιοξειδωτικής άμυνας και της σχετιζόμενης με το μιτοχόνδριο απόπτωσης, καθώς και οι επιπτώσεις αυτών στην καρκινογένεση και στη διαφοροποίηση νευρικών κυττάρων. Επιπλέον μελετήθηκε ο ρόλος του ERβ, αλλά και η αλληλεπίδραση των δύο υποτύπων του ER στην επαγόμενη από αργίλιο νευροτοξικότητα. Με βάση τα παραπάνω η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελείται από τρεις διακριτές ενότητες εργασίας. Στη συνέχεια παρατίθενται οι στόχοι, το πλάνο εργασίας, συνοπτική περιγραφή των αποτελεσμάτων και ο σχολιασμός αυτών για κάθε μία από αυτές τις ενότητες.

Στόχος της πρώτης ενότητας της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση της εμπλοκής του mtERβ στη ρύθμιση μιτοχονδριακών λειτουργιών όπως μιτοχονδριακή μεταγραφή, παραγωγή ενέργειας, διαφοροποίηση, απόπτωση και οξειδωτικό στρες.

Η μελέτη του ERβ ενέχει βασικές δυσκολίες, δεδομένης της έλλειψης αξιόπιστων και αποτελεσματικών εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων (Nelson, Groen et al. 2017, Gustafsson, Strom et al. 2019). Το γεγονός αυτό δυσκολεύει τόσο την ανίχνευση και αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ όσο και τη διερεύνηση των δράσεών του. Για την αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος θεωρήθηκε κρίσιμη η κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών που θα υπερεκφράζουν τον υποδοχέα στα μιτοχόνδρια. Για την κατασκευή των σταθερών κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος ποντικού Neuro-2a (N2A), η οποία εμφανίζει μειωμένα ενδογενή επίπεδα του ERβ, σε σύγκριση με άλλα κύτταρα νευροβλαστώματος και μη (Mendez and

Garcia-Segura 2006, Su, Rybalchenko et al. 2012, Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020). Συγκεκριμένα κατασκευάστηκε μια κυτταρική σειρά που υπερεκφράζει σταθερά τον ERβ ως χιμαιρική πρωτεΐνη με τη GFP με μιτοχονδριακή στόχευση «N2AmtGFPERβ», και μια δεύτερη κυτταρική σειρά, που χρησιμοποιήθηκε ως κυτταρική σειρά αναφοράς και υπερεκφράζει τη GFP με μιτοχονδριακή στόχευση «N2AmtGFP».

Συνοπτικά για την κατασκευή των σταθερών κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων N2A με κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς pmEGFPC2ERβ και pmEGFPC2 και ακολούθησε επιλογή των θετικά διαμολυσμένων κυττάρων της κάθε κυτταρικής σειράς, ύστερα από καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο στο οποίο είχε προστεθεί 1,5mg/mL αντιβιοτικού G418. Η μιτοχονδριακή εντόπιση των πρωτεϊνών GFPERβ και GFP, καθώς και η παραγωγή της χιμαιρικής πρωτεΐνης GFPERβ, στις επιλεγμένες ανθεκτικές στο G418 αποικίες, επιβεβαιώθηκε με μελέτες συνεντοπισμού των πρωτεϊνών GFP και ERβ, τόσο μεταξύ τους όσο και με τη χρωστική CMX, που αποτελεί μιτοχονδριακό δείκτη, εφαρμόζοντας μικροσκοπία φθορισμού, ανοσοφθορισμό με χρήση ειδικού αντισώματος έναντι του ERβ και συνεστιακή μικροσκοπία. Η υπερέκφραση των πρωτεϊνών mtGFPERβ και mtGFP επιβεβαιώθηκε με μικροσκοπία φθορισμού και ανοσοαποτύπωση κατά Western και χρήση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών GFP και ERβ. Τέλος τα αποτελέσματα της υπερέκφρασης του ERβ επαληθεύτηκαν και σε επίπεδο mRNA με εφαρμογή Real time PCR και χρησιμοποιώντας εξειδικευμένους εκκινητές έναντι του ERβ. Οι αποικίες που εμφάνισαν τα υψηλότερα επίπεδα των πρωτεϊνών mtGFPERβ και mtGFP καλλιεργήθηκαν περαιτέρω και χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες που ακολούθησαν.

Είναι ευρέως γνωστό ότι η μιτοχονδριακή μεταγραφή ρυθμίζεται από τον πυρήνα καθώς πολλά μόρια που εμπλέκονται σε αυτή, όπως η μιτοχονδριακή πολυμεράση και οι μεταγραφικοί παράγοντες TFAM και TFB2M κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα (Gustafsson, Falkenberg et al. 2016). Επιπλέον γνωρίζουμε ότι η πλειονότητα των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, συμπεριλαμβανομένου και του ERβ, ελέγχουν έμμεσα τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Συγκεκριμένα ο πυρηνικός αλλά και ο μεμβρανικός ERβ ρυθμίζουν την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων TFAM, PGC-1α και NRF1, οι οποίοι ρυθμίζουν με τη σειρά τους άμεσα είτε έμμεσα την έκφραση πυρηνικά και μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS (Scheller and Sekeris 2003, Hsieh, Yang et al. 2005, Hsieh, Choudhry et al. 2006, Klinge 2008, Mattingly, Ivanova et al. 2008, Chen, Cammarata et

al. 2009, Klinge 2017). Επιπρόσθετα, πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν θέσεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, που εμφανίζουν ομοιότητα με τα στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες HREs (Demonacos, Karayanni et al. 1996, Chen, Eshete et al. 2004, Psarra and Sekeris 2009), καθώς και τη μιτοχονδριακή εντόπιση υποδοχέων στεροειδών ορμονών, συμπεριλαμβανομένου και του ERβ, σε διάφορους τύπους κυττάρων (Chen, Eshete et al. 2004, Solakidi, Psarra et al. 2005, Psarra and Sekeris 2008). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, διατυπώθηκε αρχικά από τον αείμνηστο καθηγητή Κωνσταντίνο Σέκερη, η υπόθεση της άμεσης ρύθμισης της μιτοχονδριακής μεταγραφής από τους μιτοχονδριακούς ERs (Psarra and Sekeris 2009).

Προκειμένου να διερευνηθεί και επιβεβαιωθεί η προαναφερθείσα δράση σε νευρικά κύτταρα, κύτταρα νευροβλαστώματος ανθρώπου SH-SY5Y και κύτταρα των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών νευροβλαστώματος ποντικού κατεργάστηκαν με E2 και/ή με τον αναστολέα της πυρηνικής μεταγραφής α-αμανιτίνη (Seifart and Sekeris 1969, Lindell, Weinberg et al. 1970). Στη συνέχεια με εφαρμογή Real time PCR ελέγχθηκαν τα επίπεδα mRNA μιας πληθώρας μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων, όπως διαφόρων υπομονάδων OXPHOS και των 12S και 16S rRNAs, καθώς και της πυρηνικά κωδικοποιούμενης υπομονάδας COX IV, που χρησιμοποιήθηκε ως μόριο αναφοράς.

Τα κύτταρα SH-SY5Y επιλέχθηκαν δεδομένης της μιτοχονδριακής εντόπισης του ERβ σε αυτά (Liang, Xie et al. 2015, Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020), πληροφορία η οποία επαληθεύτηκε και στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Αναλυτικότερα, με εφαρμογή μιτοχονδριακής κλασμάτωσης και ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ανιχνεύτηκε ο ERβ στα μιτοχόνδρια SH-SY5Y κυττάρων, και επιπλέον η παρουσία E2 ή του ειδικού προσδέτη του ERβ DPN (Marzagalli, Casati et al. 2015), ύστερα από επώαση ή μη των κυττάρων με τις ουσίες αυτές για 3 ώρες, οδήγησε σε αύξηση των μιτοχονδριακών επιπέδων του υποδοχέα.

Τα πειράματα Real time PCR, που διεξήχθησαν στα κύτταρα SH-SY5Y, επιβεβαίωσαν την αρχική υπόθεση, καθώς παρατηρήσαμε αύξηση κατά 1,5 με 4 φορές των επιπέδων mRNA αρκετών μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων, όπως 16S rRNA, COX I, ATP 6, ND 4L, ND 4, ND 5 και Cyt b, τόσο παρουσία E2 όσο και παρουσία α-αμανιτίνης, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του πυρηνικά κωδικοποιούμενου μορίου COX IV. Όταν συνεπώαστηκαν τα κύτταρα και με τις δύο ουσίες, E2 και α-αμανιτίνη, παρατηρήσαμε 1,5 με

3,5 φορές στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA σχεδόν όλων των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του COX IV.

Όμοιες μελέτες, που διεξήχθησαν στα κύτταρα των σταθερών κυτταρικών σειρών, ενισχύουν τα παραπάνω ευρήματα, καθώς κατά την επώαση των κυττάρων N2AmtGFP με E2 επάγεται αύξηση των επιπέδων mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων 16S rRNA, ND 1, ATP 6 και Cyt b. Οι παρατηρήσεις αυτές στα κύτταρα N2AmtGFP πιθανόν να οφείλονται στις δράσεις της E2 που επιτελούνται μέσω πυρηνικών ή μεμβρανικών ERs, παρόντων σε χαμηλά επίπεδα στα κύτταρα N2A (Su, Rybalchenko et al. 2012, Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020) ή ακόμα και μέσω ενδογενών επιπέδων mtERβ. Αντίθετα παρουσία E2 στα κύτταρα N2AmtGFPERβ δεν εμφανίζονται διαφορές στα επίπεδα mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του πυρηνικά κωδικοποιούμενου μορίου COX IV της ίδιας κυτταρικής σειράς, N2AmtGFPERβ. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι ο mtERβ στην κυτταρική σειρά N2AmtGFPERβ αφού υπερεκφραστεί μετατοπίζεται στα μιτοχόνδρια και επιτελεί τις δράσεις του ανεξαρτήτως της παρουσίας προσδέτη, ρυθμίζοντας έτσι άμεσα τη μιτοχονδριακή μεταγραφή και συμμετέχοντας παράλληλα στο συγχρονισμό μιτοχονδριακής και πυρηνικής μεταγραφής (Scheller and Sekeris 2003). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρουσία α-αμανιτίνης, όπου αναστέλλεται η πυρηνική μεταγραφή, παρατηρείται, τόσο στα κύτταρα N2AmtGFP όσο και στα κύτταρα N2AmtGFPERβ, στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 2 με 5 φορές των επιπέδων mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων 16S rRNA, ND1, ATP6 και Cyt b, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του COX IV της κάθε κυτταρικής σειράς. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μιτοχονδριακή μεταγραφή παραμένει ενεργοποιημένη ανεξαρτήτως της δράσης πυρηνικά κωδικοποιούμενων συνρρυθμιστών και μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων, και το γεγονός αυτό υποδεικνύει την παρουσία τοπικών ενεργοποιητών της μιτοχονδριακής μεταγραφής στο μιτοχόνδριο, συμπεριλαμβανομένου και του mtERβ. Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώθηκε από την παρατηρούμενη, παρουσία α-αμανιτίνης, στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA των μορίων 12S rRNA, COX I και ND 4 της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA των ιδίων μορίων της κυτταρικής σειράς N2AmtGFP. Επιπλέον η ορθότητα της υπόθεσης της άμεσης δράσης του υποδοχέα στη

ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής υποστηρίζεται και κατά τη μελέτη της άμεσης δράσης της E2 στη ρύθμιση αυτής. Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μεταβολών των επιπέδων mRNA του εκάστοτε μορίου κατά την επώαση των κυττάρων με E2 και α-αμανιτίνη ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA του ίδιου μορίου κατά την επώαση των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο παρουσία E2. Όπως προαναφέρθηκε, και σε αυτή την περίπτωση, οι μεταβολές των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων κανονικοποιούνται ως προς τις αντίστοιχες μεταβολές στα επίπεδα mRNA του πυρηνικού COX IV της εκάστοτε κυτταρικής σειράς. Από τη συγκεκριμένη έκφραση των αποτελεσμάτων προκύπτει στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 2 με 4 φορές των επιπέδων mRNA των μορίων ND 1, COX I, ATP 6 και ND 4 της κυτταρικής σειράς N2AmtGFPERβ σε σύγκριση τόσο με τα επίπεδα mRNA του μορίου COX IV της ίδιας κυτταρικής σειράς όσο και με τα αντίστοιχα επίπεδα mRNA των ιδίων μορίων της κυτταρικής σειράς N2AmtGFP.

Παρόμοιες μελέτες της βιβλιογραφίας κατέληξαν επίσης στο συμπέρασμα ότι ο mtERβ ενεργοποιεί τη μιτοχονδριακή μεταγραφή, καθώς ύστερα από υπερέκφραση του σε κύτταρα MDA-MB-231 και -436 TNBC, που στερούνται ενδογενών επιπέδων του ERβ, και εφαρμογής Real time PCR παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων OXPHOS, όπως των ND1, ND2, COX II, COX III και άλλων. Η δράση αυτή αποδίδεται σε σύνδεση του mtERβ σε mtEREs της ρυθμιστικής περιοχής D-Loop του μιτοχονδριακού DNA (Song, Jeong et al. 2019). Θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να μελετηθεί εκτενώς ο μηχανισμός μέσω του οποίου ο υποδοχέας μπορεί να πραγματοποιήσει την παραπάνω δράση του, καθώς εκτός της πιθανής δέσμευσής του σε mtEREs στη ρυθμιστική περιοχή D-Loop του μιτοχονδριακού DNA (Sekeris 1990, Song, Jeong et al. 2019), μελέτες υποστηρίζουν την πιθανή αλληλεπίδρασή του και με άλλους πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες, που έχουν εντοπιστεί στο μιτοχόνδριο και ρυθμίζουν τη μιτοχονδριακή μεταγραφή, π.χ. ο μεταγραφικός παράγοντας CREB (Cue, Diaz et al. 2015).

Η επιβίωση των νευρώνων και η αποφυγή εκφυλιστικών διεργασιών και κατ' επέκταση νευροεκφυλιστικών ασθενειών σχετίζεται άμεσα με τη διατήρηση λειτουργικών μιτοχονδρίων ικανών να καλύπτουν τις ενεργειακές απαιτήσεις των νευρικών κυττάρων (Johnson, Mercado-Ayón et al. 2021). Οι νευρώνες έχουν πολύ υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις σε σύγκριση με άλλους τύπους κυττάρων. Για παράδειγμα, οι νευρώνες του ανθρώπινου εγκεφάλου μπορούν να καταναλώσουν έως και το 20% της συνολικής

ημερήσιας παραγωγής ενέργειας του οργανισμού, παρόλο που αποτελούν μόλις το 2% της συνολικής σωματικής του μάζας. Αυτές οι ασυνήθιστες και εκτεταμένες ενεργειακές απαιτήσεις επιβάλλονται για τη νευροδιαβίβαση και τις σχετικές με αυτή κυτταρικές διεργασίες και καλύπτονται κυρίως από την παραγωγή ATP μέσω του κύκλου του Krebs και της ΟΧΡΗΟΣ (Agostini, Romeo et al. 2016, Princz, Kounakis et al. 2018, Son and Han 2018). Τα πειράματα μέτρησης της παραγόμενης ATP, που διεξήχθησαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ανέδειξαν ότι τα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον mtERβ, N2AmtGFPERβ, εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα ATP σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς, N2A wt και N2AmtGFP. Ομοίως, σε κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία όπως προαναφέρθηκε εμφανίζουν αυξημένο μιτοχονδριακό εντοπισμό του ERβ παρουσία των αγωνιστών του E2 ή DPN, παρατηρήσαμε αύξηση των επιπέδων ATP στα κύτταρα που επώαστηκαν τόσο με την E2 όσο και με το DPN σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς, υποδηλώνοντας την επαγόμενη από τον ERβ αύξηση των επιπέδων της ATP. Δεδομένου ότι η κατεργασία των κυττάρων και των τεσσάρων κυτταρικών σειρών με ροτενόνη, η οποία όπως αναφέρθηκε είναι αναστολέας του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας, ανέστειλε την παραγωγή της ATP, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα της μιτοχονδριακής προέλευσης του ATP και της πιθανής εμπλοκής του mtERβ σε αυτή τη διαδικασία. Από τα αποτελέσματά μας συνεπάγεται ότι ο mtERβ αποτελεί ένας ζωτικής σημασίας ρυθμιστής τόσο της βιωσιμότητας όσο και της λειτουργίας των νευρώνων.

Από τη διεθνή βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι η ενεργοποίηση των μηχανισμών διαφοροποίησης νευρικών κυττάρων συνοδεύεται από αυξημένη μιτοχονδριακή βιογένεση, δεδομένου ότι και κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης των κυττάρων σε νευρικά απαιτείται ενέργεια που παρέχεται με ενεργοποίηση της αναπνευστικής αλυσίδας - ΟΧΡΗΟΣ (Agostini, Romeo et al. 2016, Princz, Kounakis et al. 2018, Son and Han 2018). Συνυπολογίζοντας την επαγόμενη από τον mtERβ ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και παραγωγής ATP μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας - ΟΧΡΗΟΣ γεννιέται το ερώτημα σχετικά με το ρόλο που διαδραματίζει ο υποδοχέας στη διαφοροποίηση των κυττάρων. Από μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας είναι γνωστό ότι ο ERβ εμπλέκεται σε μηχανισμούς διαφοροποίησης νευρικών κυττάρων μέσω ρύθμισης των επιπέδων των αναστολέων της CDK p21 και p27, καθώς και μέσω ρύθμισης των επιπέδων και της δράσης μορίων που εμπλέκονται στην κυτταρική προσκόλληση, στη δημιουργία των αξόνων και στα σηματοδοτικά μονοπάτια των

υποδοχέων Notch και GABA (Varshney, Inzunza et al. 2017). Αναμένεται να διερευνηθεί η πιθανή εμπλοκή του mtERβ σε μηχανισμούς ρύθμισης της διαφοροποίησης.

Επιπροσθέτως λαμβάνοντας υπόψη ότι το νευροβλάστωμα αποτελεί την πιο κοινή μορφή νεοπλασίας σε παιδιά κάτω των 7 ετών και ευθύνεται για το 7% περίπου των παιδικών καρκίνων η διερεύνηση του mtERβ στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης και καρκινογένεσης καθίσταται ύψιστης σημασίας. Μια κοινή θεραπεία που συνταγογραφείται εδώ και πάνω από μια δεκαετία, για την αντιμετώπιση της νόσου είναι τα ρετινοϊδή (π.χ. all-trans ρετινοϊκό οξύ, ATRA, RA) (Illendula, Fultang et al. 2020), καθώς αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και επάγουν την ανάπτυξη νευρώνων (Marzinke and Clagett-Dame 2012). Οι κύριες δράσεις των ρετινοϊδων επιτελούνται μέσω της δέσμευσής τους στον υποδοχέα ρετινοϊκού οξέος (Retinoic Acid Receptor, RAR) ή / και στον υποδοχέα ρετινοϊδών X (Retinoid X Receptor, RXR), ακολουθεί ο ομο- ή ετεροδιμερισμός των υποδοχέων, η μετακίνησή τους στον πυρήνα και τέλος η μεταγραφή των γονιδίων στόχων τους (Illendula, Fultang et al. 2020, Bayeva, Coll et al. 2021). Επίσης η σηματοδότηση των ρετινοϊδών αλληλεπιδρά και με άλλα μονοπάτια σηματοδότησης, όπως PI3K, MAPK, JNK και PKA/PLC/PKC (Namsi, Nury et al. 2018, Illendula, Fultang et al. 2020, Bayeva, Coll et al. 2021), όμως δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος ο πλήρης μηχανισμός δράσης τους (Illendula, Fultang et al. 2020). Στον ερευνητικό κλάδο το RA χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες που έχουν ως στόχο τη διερεύνηση μηχανισμών διαφοροποίησης νευρικών κυττάρων (Lone, Dar et al. 2016) και τα κύτταρα νευροβλαστώματος N2A χρησιμοποιούνται κατά κόρον ως μοντέλα για μελέτες νευρογένεσης (Riboni, Prinetti et al. 1995, Marzinke and Clagett-Dame 2012, Lone, Dar et al. 2016, Namsi, Nury et al. 2018).

Συνοπλογίζοντας το ρόλο του ERβ στην κυτταρική διαφοροποίηση, το ρόλο του mtERβ στην ενεργοποίηση της παραγωγής μιτοχονδριακής ATP και την εκτεταμένη χρήση του RA και των κυττάρων N2A σε ερευνητικές μελέτες διαφοροποίησης, καλλιεργήθηκαν κύτταρα N2AmtGFPERβ, N2AmtGFP και N2A wt για 5 ημέρες σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης (DMEM χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη εμπλουτισμένου με 2% FBS και 20μM RA). Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι ο mtERβ δεν επηρεάζει την επαγόμενη από το RA διαφοροποίηση των κυττάρων σε νευρικά καθώς δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη μορφολογία των κυττάρων, στη μορφολογία και στο μήκος των νευρώνων και στα πρωτεϊνικά επίπεδα του δείκτη διαφοροποίησης νευρικών κυττάρων Tuj-1 (Li, Ragheb et al. 2003,

Georgopoulou, Hurel et al. 2006, Tsiaras, Papastefanaki et al. 2013, Hsu, Liu et al. 2014, Zhang, Ma et al. 2019), μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών. Η μοναδική διαφορά που παρατηρήθηκε, ύστερα από καλλιέργεια των κυττάρων κάτω από αυτές τις συνθήκες και με εφαρμογή MTT, ήταν ότι τα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον mtERβ εμφανίζουν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τα κύτταρα N2A wt και N2AmtGFP. Όπως γνωρίζουμε απ' τη βιβλιογραφία σε συνθήκες διαφοροποίησης η μειωμένη κυτταρική ανάπτυξη είναι δείκτης της διαφοροποίησης των κυττάρων (Wesley, Hatcher et al. 2015) και έτσι οδηγηθήκαμε στην υπόθεση ότι ο mtERβ ενδεχομένως να ελέγχει μηχανισμούς στα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης. Λόγω του καθοριστικού ρόλου που διαδραματίζει το RA στην διαφοροποίηση των κυττάρων, επικαλύπτοντας πιθανώς αντίστοιχες δράσεις του mtERβ στη διεργασία αυτή, ακολούθησε κατεργασία των κυττάρων για 5 ημέρες σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο μόνο με 2% FBS και απουσία RA. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαίωσαν την αρχική μας υπόθεση καθώς παρατηρήσαμε μορφολογικές διαφορές και στατιστικά σημαντική αύξηση τόσο του μήκους των νευρώνων όσο και των πρωτεϊνικών επιπέδων του δείκτη διαφοροποίησης νευρικών κυττάρων Tuj-1 στα κύτταρα N2AmtGFPERβ σε σύγκριση με τα κύτταρα N2A wt και N2AmtGFP.

Για περαιτέρω επιβεβαίωση και ενίσχυση των παραπάνω αποτελεσμάτων μελετήθηκε η επίδραση του mtERβ στην έκφραση μορίων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς για να επαχθεί διαφοροποίηση πρέπει τα κύτταρα να *εξέλθουν* απ' τον κυτταρικό κύκλο (Cell cycle exit) (Georgopoulou, Hurel et al. 2006, Marzinke and Clagett-Dame 2012, Tsiaras, Papastefanaki et al. 2013, Gaitanou, Segklia et al. 2019). Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία αρκετά μόρια εμπλέκονται στη διεργασία αυτή. Για παράδειγμα το μόριο Cend1 (cell cycle exit and neuronal differentiation) παίζει ένα καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του ΚΝΣ καθώς εμπλέκεται στο συντονισμό της *εξόδου* του κυτταρικού κύκλου και της νευρικής διαφοροποίησης στα νευρικά βλαστοκύτταρα (Tsiaras, Papastefanaki et al. 2013, Gaitanou, Segklia et al. 2019). Η αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης P21 και η μείωση των επιπέδων της κυκλίνης D1 αποτελούν έναν απ' τους κύριους μηχανισμούς δράσης τόσο αυτού του μορίου όσο και άλλων μορίων, π.χ. του μορίου Calm1 που αυξάνεται παρουσία του RA, προκειμένου τα *εξέλθουν* τα κύτταρα απ' τον κυτταρικό κύκλο και να διαφοροποιηθούν (Marzinke and Clagett-Dame 2012, Gaitanou, Segklia et al. 2019). Με εφαρμογή Real time PCR παρατήσαμε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA της

κυκλίνης D1 και αύξηση των επιπέδων mRNA του P21 στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον mtERβ σε σύγκριση με τις κυτταρικές σειρές αναφοράς, συμπεραίνοντας ότι ο mtERβ εμπλέκεται σε μηχανισμούς που οδηγούν στην έξοδο των κυττάρων απ' τον κυτταρικό κύκλο, υπό συνθήκες διαφοροποίησης των κυττάρων. Τα προαναφερθέντα προκαταρκτικά ευρήματα αναδεικνύουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο του mtERβ στη ρύθμιση της διαφοροποίησης νευρικών κυττάρων και χρήζουν περαιτέρω επαλήθευση σε *ex vivo* και *in vivo* συστήματα διαφοροποίησης νευρικού συστήματος.

Στη συνέχεια, γνωρίζοντας από τη διεθνή βιβλιογραφία τη στενή συσχέτιση μεταξύ της μιτοχονδριακής παραγωγής ROS και της επαγωγής απόπτωσης σε πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Kent, El Baradie et al. 2021, Lee, He et al. 2021, Wang, Huang et al. 2021), διερευνήθηκε η εμπλοκή του mtERβ σε σχετιζόμενους με το μιτοχόνδριο αποπτωτικούς μηχανισμούς. Από τη μελέτη αυτή αναδείχτηκε η εξαρτώμενη από τον mtERβ αντίσταση στην επαγόμενη από τη σταυροσπορίνη (STS) ή το H₂O₂ απόπτωση. Η αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των κασπασών -9 και -3, εφαρμόζοντας ανοσοαποτύπωση κατά Western, έδειξε μειωμένα επίπεδα και των δύο κασπασών καθώς και μειωμένη πρωτεολυτική αποικοδόμηση, και κατά συνέπεια ενεργοποίηση, των προκασπασών -9 και -3 στα κύτταρα N2AmtGFPERβ σε σύγκριση με τα κύτταρα N2AmtGFP, μετά από κατεργασία αυτών με 0,5 και 2μM σταυροσπορίνη ή 2mM H₂O₂ και απουσία E2. Επίσης, στην παρούσα μελέτη, επιβεβαιώθηκε η αντιαποπτωτική δράση της E2 και διερευνήθηκε η δράση αυτής σε σχέση με τον mtERβ. Συγκεκριμένα στα κύτταρα N2AmtGFPERβ, παρατηρήθηκε ενίσχυση της μείωσης της επαγόμενης από τη STS (0,5μM) και το H₂O₂ (2mM) αύξησης των επιπέδων της ενεργής κασπάσης 9, παρουσία E2, υποδεικνύοντας ότι η E2 ενισχύει την εξαρτώμενη από τον mtERβ αντίσταση στην επαγωγή απόπτωσης. Παρόμοια δράση της E2 στα επίπεδα της κασπάσης 9 παρατηρήθηκε και στα κύτταρα N2AmtGFP που επώαστηκαν με 0,5μM STS. Η αντιοξειδωτική και αντιαποπτωτική δράση των οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια προκύπτει και από άλλες μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας, οι οποίες υποστηρίζουν ότι η δράση αυτή των οιστρογόνων επιτελείται είτε μέσω των ERs είτε ανεξαρτήτως υποδοχέα (Green and Simpkins 2000, McEwen 2001, Wise, Dubal et al. 2001, Chainy and Sahoo 2020). Οι ανεξαρτήτως υποδοχέα δράσεις της E2 μπορούν να αποδοθούν στην επαγόμενη από την E2 σύνθεση πολλών πυρηνικά κωδικοποιούμενων αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η

υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η MnSOD και η θειορεδοξίνη (Chiueh, Lee et al. 2003, Strehlow, Rotter et al. 2003, Klinge 2008, Liu, Gou et al. 2014).

Με βάση τα παραπάνω, ακολούθησε διερεύνηση της επίδρασης του mtERβ στα επίπεδα των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν αύξηση των επιπέδων της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 στα κύτταρα N2AmtGFPERβ σε σχέση με τα κύτταρα N2AmtGFP, ύστερα από εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε ολικά εκχυλίσματα από κύτταρα των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών που είχαν επωαστεί με 2mM H₂O₂. Επιπλέον παρατηρήσαμε μείωση των επιπέδων της προαποπτωτικής πρωτεΐνης BAD στα κύτταρα N2AmtGFPERβ, σε σχέση με τα κύτταρα N2AmtGFP, ανεξαρτήτως της επίδρασης κάποιας ουσίας. Οι δράσεις αυτές μπορούν να συσχετιστούν με την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με άλλα μόρια ρυθμιστές της μιτοχονδριακά επαγόμενης απόπτωσης. Για παράδειγμα πολλές μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας υποστηρίζουν ότι ο mtERβ μπορεί να αλληλεπιδράσει άμεσα και ανεξαρτήτως προσδέτη με την προαποπτωτική πρωτεΐνη BAD, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στη καταστολή του BAX και της επακόλουθης απελευθέρωσης του Cyt c από το μιτοχόνδριο (Zhang, Yanamala et al. 2010, Liang, Xie et al. 2015, Klinge 2017, Lone, Baghel et al. 2017).

Στη συνέχεια πειράματα προσδιορισμού της βιωσιμότητας των κυττάρων, κατά τα οποία τα κύτταρα των δύο σταθερών κυτταρικών σειρών επώαστηκαν για 12 ώρες με ένα εύρος συγκεντρώσεων H₂O₂ από 10 έως 500μM, επιβεβαίωσαν την προστατευτική δράση που ασκεί ο mtERβ ανεξαρτήτως του προσδέτη του, υποδεικνύοντας ότι η δράση αυτή σχετίζεται με το μιτοχονδριακό εντοπισμό του υποδοχέα, ο οποίος επιτελείται μέσω της αλληλουχίας mts στο μόριο της χιμαιρικής mtGFPERβ πρωτεΐνης. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε προστασία των κυττάρων που υπερεκφράζουν τον mtERβ έναντι υψηλότερων συγκεντρώσεων H₂O₂, πιθανώς λόγω αδυναμίας του υποδοχέα να αναστρέψει μια σοβαρή επαγωγή οξειδωτικού στρες, υπό τις συνθήκες του πειράματος. Τέλος, σε μελέτες ελέγχου βιωσιμότητας των κυττάρων, κατόπιν επώασης τους με ένα εύρος συγκεντρώσεων STS από 0,05 έως 1μM δεν ανιχνεύτηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο σταθερών κυτταρικών σειρών. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι το εύρος συγκεντρώσεων της STS που χρησιμοποιήθηκε και ο χρόνος επώασης των κυττάρων με αυτή δεν ήταν επαρκείς ώστε να ανιχνεύσουμε διαφορές σε επίπεδο βιωσιμότητας των κυττάρων.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης διερεύνησης του ρόλου του mtERβ παρουσία αποπτωτικών και οξειδωτικών παραγόντων προκύπτει ότι ο mtERβ δρα προστατευτικά έναντι της δράσης αυτών, και ότι η παρουσία του στα μιτοχόνδρια είναι ικανή και αναγκαία συνθήκη επιτέλεσης αυτής της δράσης. Η προστασία που προσδίδει ο mtERβ έναντι οξειδωτικών παραγόντων επαληθεύτηκε και με εφαρμογή μικροσκοπίας φθορισμού και με χρήση της χρωστικής CMX, η οποία συσσωρεύεται αποκλειστικά σε λειτουργικά ενεργά μιτοχόνδρια ζωντανών κυττάρων (Wang, Li et al. 2006, Maharjan, Oku et al. 2014), καθώς ύστερα από κατεργασία των κυττάρων με 2mM H₂O₂ παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό των λειτουργικά ενεργών μιτοχονδρίων στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον mtERβ σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς.

Συνοψίζοντας από τα αποτελέσματα της πρώτης ενότητας της παρούσας διδακτορικής διατριβής προκύπτει ότι ο mtERβ επάγει την ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και αναπνευστικής αλυσίδας - OXPHOS και της παραγωγής ATP. Οι δράσεις αυτές του υποδοχέα σε συνδυασμό με την εμπλοκή του σε μηχανισμούς αναστολής του κυτταρικού κύκλου και αύξησης των επιπέδων της Tuj-1 και του μήκους των νευρώνων, κάτω από συνθήκες επαγωγής διαφοροποίησης, αναδεικνύουν την εμπλοκή του υποδοχέα σε μηχανισμούς ρύθμισης της διαφοροποίησης. Επιπρόσθετα από τα αποτελέσματα της ενότητας αυτής διαπιστώθηκε ότι ο mtERβ ασκεί αντιαποπτωτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις στα κύτταρα N2A, υπό συνθήκες επαγωγής απόπτωσης και οξειδωτικού στρες. Οι προαναφερθείσες δράσεις του mtERβ, που αποκαλύφθηκαν από τη μελέτη μας σε συνδυασμό με άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα, αποδίδονται πιθανόν στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα με αντιοξειδωτικά ένζυμα ή με σχετιζόμενα με την απόπτωση μόρια, ή ακόμη και στην έμμεση ρύθμιση των επιπέδων αυτών από τον mtERβ, λόγω της εμπλοκής του στη ρύθμιση και ενίσχυση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και παραγωγής ενέργειας, διεγείροντας έτσι το ενδιαφέρον για περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του.

Στόχος της δεύτερης ενότητας της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η διερεύνηση της εμπλοκής του mtERβ στην καρκινογένεση. Στο πλαίσιο αυτό κύτταρα N2AmtGFP, N2AmtGFPERβ και N2A wt εμβολιάστηκαν σε θηλυκούς μύες στελέχους 1303. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του μεγέθους των αναπτυσσόμενων όγκων σε τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι την απόκτηση του επιτρεπτού ορίου και τέλος πραγματοποιήθηκε ευθανασία των μυνών και αφαίρεση των όγκων. Από τα αποτελέσματά

μας προκύπτει ότι η κυτταρική σειρά N2AmtGFPERβ αναστέλλει την καρκινογένεση εμφανίζοντας πολύ μικρότερους σε μάζα και μέγεθος όγκους καθώς και μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης αυτών σε σύγκριση με τους όγκους που προήλθαν απ' τις κυτταρικές σειρές N2AmtGFP και N2A wt. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας που υποστηρίζουν την επαγόμενη από τον mtERβ αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της καρκινογένεσης σε κύτταρα TNBC (Song, Jeong et al. 2019).

Για τη διερεύνηση του μηχανισμού της αντικαρκινικής δράσης του mtERβ οι όγκοι, μετά την αφαίρεσή τους, ομογενοποιήθηκαν και ακολούθησε υποκυτταρική κλασμάτωση και απομόνωση εμπλουτισμένων σε μιτοχόνδρια κλασμάτων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western σε ολικά ομογενοποιημένα όγκων αλλά και σε μιτοχονδριακά και κυτταροπλασματικά κλάσματα αυτών και ακολούθησε η αξιολόγηση μιας σειράς μορίων που εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως στον ενεργειακό μεταβολισμό, στον κυτταρικό κύκλο, στην απόπτωση και στην αυτοφαγία, προκειμένου να διερευνηθεί η συμμετοχή του mtERβ στη ρύθμιση αυτών. Χάριν συντομίας οι όγκοι που αναπτύχθηκαν ύστερα από εμβολιασμό των μυών με τα κύτταρα N2AmtGFPERβ θα αναφέρονται ως «όγκοι *mtGFPERβ*», καθώς τα κύτταρα που απαρτίζουν τον όγκο υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη mtGFPERβ. Το ίδιο ισχύει και για τους όγκους που αναπτύχθηκαν ύστερα από εμβολιασμό των μυών με τα κύτταρα N2AmtGFP και N2A wt, οι οποίοι θα αναφέρονται από εδώ και στο εξής ως «όγκοι *mtGFP*» και «όγκοι *wt*» αντίστοιχα.

Αρχικά, λαμβάνοντας υπόψη τον κομβικό ρόλο που διαδραματίζει ο mtERβ στην ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής, αξιολογήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της μιτοχονδριακά κωδικοποιημένης OXPHOS υπομονάδας COX I καθώς και της πυρηνικά κωδικοποιημένης OXPHOS υπομονάδας COX IV. Παρατηρήθηκε αύξηση αυτών στους mtGFPERβ όγκους σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα τους στους mtGFP όγκους. Το αποτέλεσμα αυτό αναδεικνύει την εμπλοκή του mtERβ τόσο στην ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής όσο και στο συντονισμό της πυρηνικής με τη μιτοχονδριακή μεταγραφή, επιβεβαιώνοντας και ενισχύοντας τα αποτελέσματα της πρώτης ενότητας της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια από τη διεθνή βιβλιογραφία ότι τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν την αναερόβια γλυκόλυση για την παραγωγή ενέργειας έναντι της OXPHOS, που χρησιμοποιείται από τα φυσιολογικά κύτταρα, φαινόμενο γνωστό και ως Warburg

(Warburg 1956). Επειδή στα καρκινικά κύτταρα παρέχεται η απαιτούμενη ενέργεια μέσω αυτής της οδού και ανεξαρτήτως της διαθεσιμότητας οξυγόνου, το φαινόμενο Warburg αναφέρετε συχνά και ως αερόβια γλυκόλυση. Μέσω του υψηλού ρυθμού της αερόβιας γλυκόλυσης παρέχεται στο κύτταρο η επαρκής ποσότητα ATP και παράλληλα μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος παρέχονται ενδιάμεσοι μεταβολίτες που οδηγούν στη σύνθεση νουκλεοτιδίων, λιπιδίων καθώς και αμινοξέων, αναγκαίων συστατικών για την ανάπτυξη του όγκου (Warburg 1956, Vander Heiden, Cantley et al. 2009, Zhang, Zhang et al. 2015). Συνυπολογίζοντας την επαγόμενη από τον mtERβ ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και παραγωγής ενέργειας μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας – OXPHOS γεννιέται το ερώτημα σχετικά με το ρόλο που διαδραματίζει ο mtERβ σε μηχανισμούς που σχετίζονται με τη ρύθμιση της αερόβιας γλυκόλυσης (φαινόμενο Warburg). Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για την κατάλυση της αντίδρασης της μετατροπής του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό (αερόβια γλυκόλυση) είναι η LDH (Vander Heiden, Cantley et al. 2009). Ο προσδιορισμός των επιπέδων της LDH στα in vivo πειράματα καρκινογένεσης σε μύες αποκάλυψε την αύξηση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών επιπέδων της στους mtGFP όγκους σε σύγκριση με τους όγκους mtGFPERβ, υποδηλώνοντας την αυξημένη αερόβια γλυκόλυση, που πραγματοποιείται στους όγκους που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα N2AmtGFP, και ταυτόχρονα την αντίσταση των κυττάρων που υπερεκφράζουν τον mtERβ να οδηγηθούν στο συνηθισμένο *μεταβολικό επαναπρογραμματισμό* που παρατηρείται κατά την καρκινογένεση.

Έπειτα, στο ίδιο πλαίσιο, μελετήθηκε η επίδραση του mtERβ στα επίπεδα των ενζύμων που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος και διαπιστώθηκε ότι τόσο η συνθάση του κιτρικού όσο και η SDH δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσο αφορά τα πρωτεϊνικά τους επίπεδα σε ολικά ομογενοποιημένα όγκων, που προέκυψαν από τον εμβολιασμό των μυών με τις τρεις κυτταρικές σειρές. Αντιθέτως παρατηρήσαμε αύξηση των μιτοχονδριακών επιπέδων της MDH2 στους mtGFP όγκους σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδά της στους mtGFPERβ όγκους. Η παρατηρούμενη αύξηση της MDH2 στους mtGFP όγκους συνάδει με την έντονη επαγωγή καρκινογένεσης που παρατηρείτε σε αυτούς, σε σύγκριση με τους mtGFPERβ όγκους, καθώς πειραματικά δεδομένα μελετών της διεθνούς βιβλιογραφίας υποστηρίζουν την υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής σε καρκίνο του πνεύμονα, του ενδομητρίου και του προστάτη (Liu, Harvey et al. 2013, Zhuang, Xiang et al.

2017, Ma, Tian et al. 2021). Ακόμη η στενή συσχέτιση μεταξύ των αυξημένων επιπέδων της MDH2 και της εμφάνισης καρκίνου αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι λόγω των παρατηρούμενων αυξημένων επιπέδων της, τόσο στα ούρα όσο και στους ιστούς ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα NSCLC (Non-small cell lung cancer), έχει προταθεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την έγκαιρη διάγνωσή του (Ma, Tian et al. 2021). Στο σημείο αυτό να υπενθυμίσουμε ότι η MDH2 βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και καταλύει τη μετατροπή του μηλικού σε οξαλοξικό, και αντίστροφα, χρησιμοποιώντας το σύστημα συνενζύμων NAD⁺/NADH. Επιπλέον εκτός της συμμετοχής της στον κύκλο του κιτρικού οξέος συμβάλει στη μεταφορά του μηλικού-ασπαρτικού κατά μήκος της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Ma, Tian et al. 2021). Με βάση τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι τα αυξημένα επίπεδα του ενζύμου MDH2 στους mtGFP όγκους πιθανόν να είναι αναγκαία για τη μεταφορά του ασπαρτικού, τροφοδοτώντας συνεχώς τα καρκινικά κύτταρα με πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύει τα παραπάνω ευρήματα σχετικά με την εμφάνιση του φαινομένου Warburg στους mtGFP όγκους.

Από την παρούσα μελέτη δεν θα μπορούσε να παραληφθεί η αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της GAPDH, καθώς αποτελεί σημαντικό ένζυμο του ενεργειακού μεταβολισμού και της παραγωγής ATP και πυροσταφυλικού μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης στο κυτταρόπλασμα (Nicholls, Li et al. 2012). Παρόλο που η GAPDH χρησιμοποιείται συχνά ως μόριο κανονικοποίησης, καθώς αποτελεί *housekeeping gene*, δεν θεωρείται αξιόπιστο σε μελέτες που σχετίζονται με καρκίνο (Guo, Liu et al. 2013, Zhang, Zhang et al. 2015). Μελέτες της τελευταίας δεκαετίας υποστηρίζουν ότι η έκφραση της GAPDH απορυθμίζεται σε πολλούς τύπους καρκίνων (Guo, Liu et al. 2013, Zhang, Zhang et al. 2015) και συνήθως η αυξημένη έκφραση της σχετίζεται με αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την ανάπτυξη όγκων (Nicholls, Li et al. 2012, Guo, Liu et al. 2013). Ένας απ' τους λόγους που συμβαίνει αυτό είναι, όπως ειπώθηκε και παραπάνω, το γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στην αερόβια γλυκόλυση για την παραγωγή ATP και τα αυξημένα επίπεδα της GAPDH σχετίζονται άμεσα με την κάλυψη των ενεργειακών τους απαιτήσεων (Nicholls, Li et al. 2012). Προς ενίσχυση των παραπάνω ευρημάτων παρατηρήσαμε ότι η υπερέκφραση του mtERβ προκαλεί στατιστικά σημαντική μείωση των ολικών επιπέδων και τάση για μείωση των κυτταροπλασματικών και μιτοχονδριακών επιπέδων της GAPDH, υποδηλώνοντας τη μειωμένη γλυκόλυση στους mtGFPERβ όγκους. Στο

σημείο αυτό δεν πρέπει να παραληφθεί ότι κάποιες μελέτες προτείνουν έναν εναλλακτικό μηχανισμό αυτοφαγίας στα νευρικά κύτταρα κατά τον οποίο η καταλυτικά ανενεργή GAPDH δεσμεύεται στα μιτοχόνδρια και τα οδηγεί απευθείας στα λυσοσώματα για την αποικοδόμησή τους. Τα πρώτα δεδομένα της πιθανής ύπαρξης του παραπάνω μηχανισμού βασίστηκαν σε πειράματα που έγιναν σε κύτταρα που αποτελούν μοντέλα μελέτης της νόσου του Χάντινγκτον, αλλά χρειάζεται επαλήθευση και περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού και σε άλλα μοντέλα ασθενειών για την αποσαφήνισή του (Hwang, Disatnik et al. 2015, Cummins and Gotz 2018). Ωστόσο η πληροφορία αυτή σε συνδυασμό με τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν την πιθανή εμφάνιση αυτοφαγίας στους όγκους mtGFP, γεγονός που διερευνήθηκε και στην παρούσα μελέτη και θα αναλυθεί παρακάτω.

Επίσης ένα από τα σημαντικότερα μόρια του ενεργειακού μεταβολισμού, που μελετήθηκε και στην παρούσα διδακτορική διατριβή, είναι η AMPK. Η AMPK αποτελεί έναν «ανιχνευτή» των ενεργειακών απαιτήσεων του κυττάρου, καθώς όταν ο λόγος AMP/ATP και ADP/ATP αυξάνεται, το μονοπάτι της AMPK ενεργοποιείται για να αποκαταστήσει την ενεργειακή ομοιόσταση (He and Klionsky 2009, Hardie 2015, Herzig and Shaw 2018). Η φωσφορυλίωση της AMPK στο αμινοξύ Thr172 έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των καταβολικών οδών που παράγουν ATP, όπως είναι οξειδωση λιπαρών οξέων και η μιτοχονδριακή βιογένεση, και παράλληλα την αναστολή των αναβολικών οδών που απαιτούν την κατανάλωση της ATP. Στις αναβολικές οδούς περιλαμβάνονται διαδικασίες απαραίτητες για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως η σύνθεση λιπιδίων, RNA και πρωτεϊνών (Mihaylova and Shaw 2011, Hardie 2015, Li, Saud et al. 2015, Herzig and Shaw 2018). Επιπλέον η AMPK μέσω ενεργοποίησης της μιτοφαγίας και της μιτοχονδριακής βιογένεσης επάγει την απομάκρυνση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων και διασφαλίζει την αποκατάσταση της μιτοχονδριακής μάζας με τη δημιουργία νέων, πιο υγιών μιτοχονδρίων, αντίστοιχα (He and Klionsky 2009, Mihaylova and Shaw 2011, Hardie 2015, Herzig and Shaw 2018, Killackey, Philpott et al. 2020). Τα πειράματα ογκογένεσης, που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ανέδειξαν ότι οι όγκοι που αναπτύχθηκαν από τα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον mtERβ εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της AMPK στο αμινοξύ Thr 172, σε σύγκριση με τους όγκους που προέκυψαν από τα κύτταρα N2AmtGFP και N2A wt. Το εύρημα αυτό δικαιολογεί το μειωμένο μέγεθος των mtGFPERβ όγκων καθώς μέσω της ενεργοποιημένης AMPK αναστέλλονται αρκετές διαδικασίες που απαιτούνται για

την ανάπτυξή τους. Επίσης η πιθανή άμεση ή έμμεση συμβολή της υπερέκφρασης του mtERβ στην ενεργοποίηση της επαγόμενης από την AMPK μιτοφαγίας και μιτοχονδριακής βιογένεσης διασφαλίζει τη σωστή μιτοχονδριακή λειτουργία.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η εμπλοκή του mtERβ στη ρύθμιση αποπτωτικών μηχανισμών κατά την καρκινογένεση. Ύστερα από εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western, τόσο σε ολικά ομογενοποιημένα από τους όγκους mtGFP, mtGFPERβ και wt όσο και σε μιτοχονδριακά κλάσματα από τους όγκους mtGFP και mtGFPERβ, αξιολογήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που εμπλέκονται στην απόπτωση, όπως οι (προ)κασπάσες -9 και -3 καθώς και μέλη της οικογένειας Bcl-2. Παρόλο που δεν ανιχνεύτηκαν διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων Bcl-2 και BAX μεταξύ των τριών κατηγοριών των παραγόμενων όγκων, παρατηρήθηκε αύξηση της μιτοχονδριακής εντόπισης του Bcl-2 και μείωση της μιτοχονδριακής εντόπισης της BAX στα μιτοχονδριακά κλάσματα των mtGFPERβ όγκων, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδά τους στους mtGFP όγκους. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας που υποστηρίζουν ότι ο ERβ και ο mtERβ, κατά την καρκινογένεση, επάγουν την αύξηση των επιπέδων ή/και της δράσης του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2 και αντίστοιχα τη μείωση των προαποπτωτικών μορίων BAX και BAD (Zhang, Yanamala et al. 2010, Liang, Xie et al. 2015, Yang, Yang et al. 2019). Επίσης δεν ανιχνεύτηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα των προκασπασών -9 και -3, μεταξύ των τριών συνθηκών. Αντιθέτως παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της κασπάσης 9 στους όγκους που υπερεκφράζουν τον mtERβ σε σύγκριση με τους όγκους που αναπτύχθηκαν ύστερα από εμβολιασμό των μυών με τα κύτταρα αναφοράς. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι η παρουσία του mtERβ συντελεί στην αναστολή αποπτωτικών μηχανισμών, γεγονός που υποδεικνύει την εμπλοκή του mtERβ στη ρύθμιση άλλων βιοχημικών μηχανισμών που συντελούν στην καταστολή της ανάπτυξης όγκων κατά την καρκινογένεση.

Από παρατηρήσεις παλαιότερων μελετών της βιβλιογραφίας είναι γνωστή η εμπλοκή της κασπάσης 9 στην διεξαγωγή της αυτοφαγίας χωρίς όμως να είναι γνωστός ο μοριακός μηχανισμός δράσης της (Jeong, Choi et al. 2011, Han, Hou et al. 2014). Πειραματικά δεδομένα πρόσφατης μελέτης αποκάλυψαν ότι η εμφάνιση αυξημένων επιπέδων της κασπάσης 9 και όχι της κασπάσης 3 σχετίζονται με ενεργοποίηση μηχανισμών αυτοφαγίας και όχι απόπτωσης (An, Chung et al. 2020). Τα δεδομένα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων της κασπάσης 9 στους όγκους wt και mtGFP, σε

σύγκριση με τους όγκους mtGFPERβ, πιθανόν να μην σχετίζεται απαραίτητα με αποπτωτικούς μηχανισμούς αλλά με μηχανισμούς αυτοφαγίας.

Τα παραπάνω ευρήματα, δηλαδή η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων της κασπάσης 9 και των μιτοχονδριακών επιπέδων της GAPDH στους mtGFP όγκους και η αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της AMPK στο αμινοξύ Thr 172 στους mtGFPERβ όγκους, υποδηλώνουν την εμφάνιση αυτοφαγίας ή / και μιτοφαγίας και στους δύο τύπους όγκων, αντίστοιχα, γεννώντας το ερώτημα σχετικά με το ρόλο που διαδραματίζει ο mtERβ στην αυτοφαγία και μιτοφαγία κατά την καρκινογένεση. Από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι ο ERβ εμπλέκεται στη ρύθμιση της αυτοφαγίας διαδραματίζοντας διττό ρόλο, καθώς υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν τόσο την επαγωγή όσο και την αναστολή της εξαρτώμενης από τον υποδοχέα αυτοφαγίας κατά την καρκινογένεση (Wei and Huang 2019). Όμως δεν υπάρχουν πειραματικά δεδομένα όσον αφορά τους μηχανισμούς μέσω των οποίων ο mtERβ εμπλέκεται στις διεργασίες αυτές.

Προκειμένου να ξεκαθαριστεί ο ρόλος του mtERβ στη ρύθμιση της αυτοφαγίας και / ή της μιτοφαγίας πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων κάποιων κομβικών μορίων ελέγχου των μηχανισμών αυτών. Τα αποτελέσματα, ύστερα από εφαρμογή ανοσοαποτύπωσης κατά Western και χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του LC3 σε ολικά ομογενοποιημένα από τους όγκους mtGFP, mtGFPERβ και wt, έδειξαν ότι πραγματοποιείται αυτοφαγία στους όγκους και των τριών συνθηκών, βάσει του προσδιορισμού του λόγου LC3-II / LC3-I, χωρίς να ανιχνεύονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών κατηγοριών των παραγόμενων όγκων. Ομοίως κατά την αξιολόγηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων P62 και BECN1 δεν ανιχνεύτηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών συνθηκών.

Σε συνέχεια των παραπάνω πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των επιπέδων των ίδιων μορίων σε μιτοχονδριακά κλάσματα που απομονώθηκαν από τους όγκους mtGFP και mtGFPERβ. Τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν την αύξηση της μιτοχονδριακής εντόπισης των πρωτεϊνών P62 και LC3, εκφραζόμενο ως λόγος LC3-II / LC3-I, στους mtGFPERβ όγκους σε σύγκριση με τους mtGFP όγκους, υποδηλώνοντας ότι στους mtGFPERβ όγκους πιθανόν να ενεργοποιείται το μονοπάτι μιτοφαγίας PINK1/Parkin ή αλλιώς η «μεσολαβούμενη από την ουβικιτίνη μιτοφαγία» (Kubli and Gustafsson 2012, Panigrahi, Praharaj et al. 2020). Η πιθανή ενεργοποίηση του παραπάνω μονοπατιού ίσως να σχετίζεται με την επαγόμενη από τον

mtERβ ενεργοποίηση του μονοπατιού της AMPK. Οι παρατηρήσεις αυτές συνάδουν και συμπληρώνουν δεδομένα από ερευνητικές μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας που υποστηρίζουν ότι ο ERβ συμμετέχει στην ενεργοποίηση της AMPK σηματοδότησης και επάγει την αυτοφαγία ρυθμίζοντας τις δράσεις των πρωτεϊνών P62 και LC3 (Yang, Yang et al. 2019).

Αντίθετα όταν ελέγχθηκαν τα επίπεδα του μιτοφαγικού υποδοχέα BNIP3L παρατηρήσαμε ότι η υπερέκφραση του mtERβ συνοδεύεται με στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του BNIP3L, τόσο σε ολικά ομογενοποιημένα όγκων όσο και σε μιτοχονδριακά κλάσματα αυτών, σε σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν την αναστολή του BNIP3L σηματοδοτικού μονοπατιού παρουσία του mtERβ. Πιθανόν η δράση αυτή να σχετίζεται με την εμπλοκή του mtERβ σε μονοπάτια σηματοδότησης που έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού της AMPK και την αύξηση της μιτοχονδριακής εντόπισης του Bcl-2 (Mazure and Pouyssegur 2010, Yang, Yang et al. 2019, Li, Zheng et al. 2021). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας έρχονται δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας που υποστηρίζουν ότι ο ERβ αναστέλλει την επαγόμενη από την υποξία αυτοφαγία, αναστέλλοντας το επαγόμενο από τον HIF-1α σηματοδοτικό μονοπάτι BNIP3 (Wei and Huang 2019). Όσον αφορά τους mtGFP όγκους τα παρατηρούμενα αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα του BNIP3L, σε σύγκριση με τους mtGFPERβ όγκους, υποδηλώνουν την ενεργοποίηση της «μεσολαβούμενης από υποδοχείς μιτοφαγία» (Kubli and Gustafsson 2012, Panigrahi, Praharaaj et al. 2020) στη συνθήκη αυτή. Ωστόσο η παρατηρούμενη αυτή αύξηση σε συνδυασμό με την αύξηση των μιτοχονδριακών επιπέδων της BAX και τη μείωση των μιτοχονδριακών επιπέδων της Bcl-2 στους mtGFP όγκους, σε σύγκριση με τους όγκους mtGFPERβ, πιθανόν να υποδηλώνουν την αναστολή της επαγόμενης από την BNIP3L μιτοφαγίας και την ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών (Mazure and Pouyssegur 2010, Li, Zheng et al. 2021). Η υπόθεση αυτή χρήζει περαιτέρω διερεύνησης προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι ακριβείς μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτελούνται διεργασίες αυτές.

Τέλος, λόγω της διαφοράς του μεγέθους των όγκων mtGFPERβ σε σύγκριση με τους όγκους mtGFP και wt, δεν θα μπορούσε να παραληφθεί η διερεύνηση της εμπλοκής του mtERβ στον κυτταρικό κύκλο κατά την καρκινογένεση. Για το λόγο αυτό αξιολογήθηκαν σε ολικά ομογενοποιημένα όγκων τα πρωτεϊνικά επίπεδα του αναστολέα της CDK, p21. Η πρωτεΐνη p21 εμπλέκεται σε μια πληθώρα μονοπατιών σηματοδότησης αλλά η κύρια δράση της είναι ότι επάγει τον τερματισμό του κυτταρικού κύκλου, αναστέλλοντας τον κυτταρικό

πολλαπλασιασμό (Karimian, Ahmadi et al. 2016) και καταστέλλοντας την καρκινογένεση, αν και κάποιες μελέτες υποστηρίζουν ότι πιθανόν να επάγει υπό προϋποθέσεις την καρκινογένεση (Abbas and Dutta 2009, Georgakilas, Martin et al. 2017). Από τις μελέτες μας διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση του mtERβ συντελεί στην αύξηση των επιπέδων της P21, αποτέλεσμα που συμβαδίζει με τον παρατηρούμενο μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης των όγκων mtGFPERβ.

Συνοψίζοντας ο mtERβ, κατά την καρκινογένεση, επάγει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή και ρυθμίζει το συγχρονισμό της πυρηνικής και μιτοχονδριακής μεταγραφής, όσον αφορά την έκφραση των υπομονάδων OXPHOS, εξασφαλίζοντας στα κύτταρα την απαιτούμενη ενέργεια - ATP μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας – OXPHOS. Η δράση αυτή σε συνδυασμό με την παρατηρούμενη, υπό συνθήκες υπερέκφρασης του mtERβ, μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων LDH, MDH2 και GAPDH συνηγορούν στην επαγόμενη από τον υποδοχέα αναστολή των μηχανισμών επαγωγής της αερόβιας γλυκόλυσης, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ανάπτυξης των όγκων. Επίσης η αύξηση της φωσφορυλίωσης της AMPK (Thr 172), παρουσία του mtERβ, συνάδει με ενεργοποίηση καταβολικών μονοπατιών και όχι αναβολικών και με την επαγωγή μιτοφαγίας και μιτοχονδριακής βιογένεσης, εμποδίζοντας την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και διασφαλίζοντας τη σωστή μιτοχονδριακή λειτουργία, αντίστοιχα. Τέλος, από τις *in vivo* μελέτες καρκινογένεσης αποκαλύφθηκε ότι ο mtERβ εμπλέκεται σε μηχανισμούς σηματοδότησης που οδηγούν σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και της επαγόμενης από το μονοπάτι BNIP3L μιτοφαγίας.

Η τρίτη ενότητα της παρούσας διδακτορικής διατριβής αφορά τη διερεύνηση της εμπλοκής του αργιλίου, και συγκεκριμένα του υδροξυχλωριούχου αργιλίου (ACH), στη ρύθμιση της οιστρογονικής σηματοδότησης και η συσχέτιση των επαγόμενων από το ACH νευροτοξικών δράσεων με τις επαγόμενες από τον ERβ νευροπροστατευτικές δράσεις (Simpkins, Yi et al. 2010). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα νευροβλαστώματος SH-SY5Y, καθώς παρατηρήθηκαν, από προηγούμενες μελέτες μας, αυξημένα επίπεδα του ERβ σε αυτά, σε σύγκριση με άλλες κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος και μη (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020). Η τελική συγκέντρωση του ACH στις μελέτες μας ήταν 10^{-4} M και βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες που διερευνούσαν τόσο τη νευροτοξική (Shi and Haug 1990, Nagasawa, Akagi et al. 2006, Maya, Prakash et al. 2016) όσο και την πιθανή

οιστρογονική δράση του αργιλίου σε κύτταρα καρκίνου του μαστού (Darbre 2005, Gorgogietas, Tsialtas et al. 2018).

Από τις μελέτες της ενότητας αυτής διαπιστώθηκε ότι το ACH ασκεί διαφορετική δράση στη ρύθμιση των επιπέδων των δύο υποτύπων των ERs, ERα και ERβ. Ειδικότερα, το ACH επάγει μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ τόσο σε αδιαφοροποίητα όσο και σε νευρικά διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y. Αντίθετα, τόσο το ACH όσο και η E2 επάγουν αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα, σε αδιαφοροποίητα κύτταρα SH-SY5Y. Η συγχορήγηση των E2 και ACH δεν οδήγησε σε κάποια αθροιστική δράση. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι η διαμόρφωση του ERα όταν η E2 είναι δεσμευμένη σε αυτόν δεν ευνοεί την πρόσδεση του ACH. Η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERα παρουσία ACH παρατηρήθηκε και σε παλιότερες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, που πραγματοποιήθηκαν κάτω απ' τις ίδιες συνθήκες, σε κύτταρα καρκίνου του μαστού MCF-7 (Gorgogietas, Tsialtas et al. 2018).

Μελέτες αποσιώπησης των ERs αποκαλύπτουν ότι ο ERα, παρουσία προσδέτη, ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του ERβ (Nomura, Korach et al. 2003). Στηριζόμενοι σε αυτή την παρατήρηση, υποθέσαμε ότι το ACH πιθανόν να επάγει έμμεσα, μέσω του ERα, αρνητική ρύθμιση των επιπέδων του ERβ. Ο μηχανισμός που προτείνουμε είναι ότι το ACH εμπλέκεται στο μηχανισμό αποικοδόμησης του ERα. Συγκεκριμένα προτείνουμε ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες των θετικά φορτισμένων ιόντων αργιλίου πιθανόν να επιτρέπουν την αλληλεπίδρασή του με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του ERα. Μια τέτοια φωσφορική ομάδα θα μπορούσε να είναι αυτή στο αμινοξύ S118, του οποίου η φωσφορυλίωση έχει συσχετιστεί, μεταξύ άλλων, και με μηχανισμούς πρωτεολυτικής αποικοδόμησης του υποδοχέα (Tecalco-Cruz and Ramirez-Jarquín 2017). Έτσι δέσμευση της φωσφορικής ομάδας στο αμινοξύ S118, από το ACH, πιθανόν να εμποδίζει τη στρατολόγηση του πρωτεασώματος, αναστέλλοντας κατ' επέκταση την αποικοδόμηση του ERα και οδηγώντας σε αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων. Η φωσφορυλίωση του ERα στη S118 ελέγχεται από πολλά μόρια, μεταξύ αυτών και η νευρογλοβίνη (Ascenzi, di Masi et al. 2016), που ασκεί νευροπροστατευτικές δράσεις. Τα αποτελέσματά μας επαλήθευσαν την αρχική μας υπόθεση καθώς επωάζοντας τα κύτταρα SH-SY5Y για μικρό χρονικό διάστημα, 30 λεπτά, με ACH μειώνεται η επαγόμενη από την E2 και την h-NRG-1 αύξηση της φωσφορυλίωσης του ERα στη S118. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες μας σε κύτταρα MCF-7, καθώς το ACH μειώνει την επαγόμενη από την E2 αύξηση της

φωσφορυλίωσης του ERα στο αμινοξύ S118 σε κύτταρα MCF-7 που επώαστηκαν με 10^{-4} M ACH και 10^{-9} M E2 για 30 λεπτά (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020).

Αξίζει να αναφερθεί ότι ύστερα από σύγκριση των επιπέδων του pERα μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών, ανεξαρτήτως της δράσης ουσιών, παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων του στα κύτταρα SH-SY5Y σε σύγκριση με τα κύτταρα MCF-7 (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020). Η παρατήρηση αυτή πιθανόν να σχετίζεται με τα υψηλά επίπεδα φωσφοπεπτιδίων και φωσφοπρωτεϊνών που εντοπίζονται στον εγκέφαλο (Huttlin, Jedrychowski et al. 2010). Επιπρόσθετα, σε κάθε μια από αυτές τις δύο κυτταρικές σειρές εκφράζονται διαφορετικά ρυθμιστικά μόρια που εμπλέκονται, άμεσα ή έμμεσα, στη φωσφορυλίωση ERα. Ο συνδυασμός αυτών των ρυθμιστικών μορίων είναι που καθορίζει τη διαμόρφωση του ERα, η οποία καθορίζει με τη σειρά της την αλληλεπίδρασή του υποδοχέα με το ACH και κατά συνέπεια την επίδραση του ACH στην κατάσταση φωσφορυλίωσής του (Brann, Zhang et al. 2008). Σε συμφωνία με τα προαναφερθέντα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της φωσφορυλίωσης του ERα κατά την επώαση των κυττάρων SH-SY5Y μόνο με ACH. Αυτό το φαινόμενο ενδέχεται να υποδηλώνει είτε μια πιθανή οιστρογονική δράση του ACH είτε ότι τα ιόντα αργιλίου αλληλεπιδρούν ενδεχομένως με ρυθμιστικά μόρια του καταρράκτη φωσφορυλίωσης του ERα που οδηγούν εν τέλει στη φωσφορυλίωσή του.

Τα αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα και κατ' επέκταση η άμεση ή έμμεση μείωση των επιπέδων του ERβ επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην αναλογία των δύο υποδοχέων στο εσωτερικό των κυττάρων, επηρεάζοντας πιθανόν και τη νευροπροστατευτική δράση που ασκείται μέσω του ERβ. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε από προηγούμενες παρατηρήσεις μας (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020) που ανέδειξαν την επαγόμενη από το ACH μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της προκασπάσης 9 και του αντιαποπτωτικού μορίου Bcl-2 σε κύτταρα SH-SY5Y. Επίσης από τα αποτελέσματα της ίδιας μελέτης αποκαλύφθηκε και η επαγόμενη από το ACH μείωση των επιπέδων των μιτοχονδριακών αντιαποπτωτικών μορίων Bcl-xL και Bcl-2 και του αντιοξειδωτικού μορίου θειορεδοξίνη σε μιτοχονδριακά κλάσματα που απομονώθηκαν από κύτταρα SH-SY5Y, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδά τους στα κύτταρα αναφοράς (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020). Τέλος στην παρούσα εργασία, προς επιβεβαίωση και ενίσχυση των παραπάνω αποτελεσμάτων, διαπιστώθηκε ότι το ACH, σε αντίθεση με την E2, επάγει την παραγωγή ROS και την εκπόλωση της μιτοχονδριακής μεμβράνης σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y.

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, και επιβεβαιώθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ο ERβ εντοπίζεται και στο μιτοχόνδριο διαδραματίζοντας ένα καθοριστικό ρόλο στο συγκεκριμένο οργανίδιο, επάγοντας αντιοξειδωτικές και αντιαποπτωτικές δράσεις (Psarra and Sekeris 2008, Yang, Sarkar et al. 2009, Liang, Xie et al. 2015, Liao, Lee et al. 2019). Αντίθετα υπάρχουν και μελέτες που υποστηρίζουν ότι η σύνδεση του ERβ με τις μιτοχονδριακές μεμβράνες μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης και επαγωγή απόπτωσης (Petrovic, Velickovic et al. 2011, Burstein, Kim et al. 2018). Με εφαρμογή ανοσοφθορισμού και χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι του ERβ, σε διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y, αποκαλύφθηκε ότι το ACH αυξάνει τη μετατόπιση του ERβ στο μιτοχόνδριο σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς που δεν είχαν επωαστεί με το ACH. Αύξηση των μιτοχονδριακών επιπέδων του ERβ παρουσία ACH παρατηρήσαμε και σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα SH-SY5Y, ύστερα από εφαρμογή ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης κατά Western με χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι του ERβ (Tsialtas, Gorgogietas et al. 2020). Η επαγόμενη από το ACH αύξηση της μιτοχονδριακής εντόπισης του ERβ θα μπορούσε να επηρεάσει τη μιτοχονδριακή λειτουργία, οδηγώντας πιθανόν στην επαγόμενη από τον mtERβ αύξηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και βιοσύνθεσης των ενζύμων της OXPHOS, τα οποία με τη σειρά τους θα επάγουν την παραγωγή ROS μετά από συνεχή ενεργοποίηση των αντιδράσεων της αναπνευστικής αλυσίδας (Psarra and Sekeris 2008, Chen, Cammarata et al. 2009).

Συνοψίζοντας, στην τρίτη ενότητα της παρούσας διδακτορικής διατριβής υποστηρίζουμε ότι το ACH επηρεάζει άμεσα την κατάσταση φωσφορυλίωσης του ERα στο αμινοξύ S118, αναστέλλοντας την πρωτεολυτική του αποικοδόμηση και αυξάνοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα, τα οποία επάγουν τη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ. Η επαγόμενη από το ACH μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων και αύξηση της μιτοχονδριακής εντόπισης του ERβ πιθανώς να σχετίζεται, εν μέρει τουλάχιστον, με την εκδήλωση των νευροτοξικών δράσεων του ACH.

Εν συντομία, στη παρούσα διδακτορική διατριβή, χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο επαγωγής της μετακίνησης του ERβ στο μιτοχόνδριο, κύτταρα SH-SY5Y, ένα μοντέλο σταθερών κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν τον ERβ με μιτοχονδριακή στόχευση και ένα μοντέλο ανάπτυξης των κυττάρων αυτών παρουσία αναστολέα πυρηνικής μεταγραφής, αποκαλύφθηκε η άμεση εμπλοκή του mtERβ στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής.

Η επαγόμενη από τον mtERβ αύξηση των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων μορίων οδηγεί σε ενεργοποίηση της αναπνευστικής αλυσίδας - OXPHOS, γεγονός που αποδείχτηκε από τα αυξημένα επίπεδα μιτοχονδριακής ATP που παρατηρήθηκαν παρουσία του mtERβ. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο ανάπτυξης κυττάρων υπό συνθήκες επαγωγής απόπτωσης και οξειδωτικού στρες, διαπιστώθηκε ότι ο mtERβ ασκεί αντιαποπτωτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις στα κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού N2A. Οι δράσεις αυτές πιθανόν να επιτελούνται είτε μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης του mtERβ με μιτοχονδριακά εντοπισμένα μόρια, όπως είναι για παράδειγμα η προαποπτωτική πρωτεΐνη BAD, είτε μέσω έμμεσης ρύθμισης των επιπέδων αυτών των μορίων από τον mtERβ, λόγω της εμπλοκής του στη ρύθμιση και ενίσχυση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και παραγωγής ενέργειας. Όλες οι προαναφερθείσες δράσεις του mtERβ φαίνεται να επηρεάζουν την καρκινογένεση, καθώς ύστερα από εμβολιασμό των σταθερών κυτταρικών σειρών σε μύες αποκαλύφθηκε ότι η υπερέκφραση του mtERβ μείωσε το ρυθμό ανάπτυξης των όγκων. Ειδικότερα η βιοχημική ανάλυση των παραγόμενων όγκων ανέδειξε ότι η υπερέκφραση του mtERβ συντελεί στην αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των OXPHOS υπομονάδων COX I και COX IV, επιβεβαιώνοντας την άμεση εμπλοκή του mtERβ στην ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και στην παραγωγή ATP μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας - OXPHOS. Οι δράσεις αυτές του mtERβ σε συνδυασμό με την παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της AMPK (Thr172) και μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των σχετιζόμενων με το φαινόμενο Warburg μορίων GAPDH, LDH και MDH2 στους όγκους που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα, σε σύγκριση με τους όγκους που προέκυψαν από τα κύτταρα αναφοράς, αποκαλύπτει την εμπλοκή του mtERβ σε μηχανισμούς ενεργοποίησης καταβολικών διεργασιών στα μιτοχόνδρια, ενίσχυσης της παραγωγής ενέργειας μέσω αναπνευστικής αλυσίδας -OXPHOS και αναστολής της παραγωγής ATP μέσω της αερόβιας γλυκόλυσης. Περαιτέρω τα in vivo πειράματα καρκινογένεσης ανέδειξαν ότι η υπερέκφραση του mtERβ συνοδεύεται με αλλαγές σε μηχανισμούς σηματοδότησης οι οποίες οδηγούν σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και της επαγόμενης από την υποξία μιτοφαγίας (BNIP3L σηματοδοτικό μονοπάτι) και παράλληλα σε επαγωγή της μιτοφαγίας μέσω της AMPK σηματοδότησης σε συνδυασμό ή μη με το μονοπάτι μιτοφαγίας που εμπλέκεται η πρωτεΐνη P62. Επίσης, η επαγόμενη από τον mtERβ ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και παραγωγής ATP μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας - OXPHOS σε συνδυασμό με την εμπλοκή του mtERβ σε μηχανισμούς που οδηγούν σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και σε αύξηση

του μήκους των νευρώνων και των επιπέδων της Tuj-1, κάτω από συνθήκες επαγωγής διαφοροποίησης, αποκαλύπτουν τη συμμετοχή του υποδοχέα σε μηχανισμούς διαφοροποίησης των κυττάρων σε νευρικά. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο ανάπτυξης κυττάρων νευροβλαστώματος ανθρώπου SH-SY5Y παρουσία του νευροτοξικού παράγοντα ACH, διαπιστώθηκε ότι η εμπλοκή του ACH στην κατάσταση φωσφορυλίωσης του ERα (S118) επάγει την αναστολή της πρωτεολυτικής του αποικοδόμησης και κατ' επέκταση την αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων που οδηγούν με τη σειρά τους σε μείωση των επιπέδων του ERβ. Η νευροτοξική δράση του A1 θα μπορούσε να αποδοθεί, εν μέρει, στην επαγόμενη από το ACH μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του ERβ, γεγονός που προκαλεί τη μείωση της νευροπροστατευτικής δράσης του ERβ, και στην παρατηρούμενη από το ACH αύξηση της μετατόπισης του ERβ στο μιτοχόνδριο, δράση του A1 που μπορεί να επηρεάσει τη μιτοχονδριακή λειτουργία, οδηγώντας για παράδειγμα σε υπερλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας – OXPHOS, αυξημένη παραγωγή ROS και επαγωγή απόπτωσης, αλλά απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για αποσαφήνιση των επιπτώσεων της δράσης αυτής.

Όπως διαπιστώνεται από τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας και τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, ο mtERβ διαδραματίζει κομβικό ρόλο στη ρύθμιση μιας πληθώρας κυτταρικών διεργασιών αποκαλύπτοντας την πολυπλοκότητα της δράσης του και παράλληλα επισημαίνοντας τη σημαντικότητα της συνεχούς διερεύνησης των μηχανισμών δράσης του. Η εκτενέστερη κατανόηση των μηχανισμών αυτών θα συμβάλλει στην προαγωγή νέας γνώσης όσον αφορά τους βιοχημικούς μηχανισμούς που διέπουν την ρύθμιση της παθοφυσιολογίας του κυττάρου, γνώση που θα συνεισφέρει με την σειρά της στην αντιμετώπιση διαταραχών των μιτοχονδριακών λειτουργιών που έχουν συσχετιστεί αιτιολογικά με σημαντικές χρόνιες παθήσεις, στις οποίες η οιστρογονική σηματοδότηση διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο, όπως ο καρκίνος και τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα.

ABSTRACT

Estrogens are crucial regulators of the nervous system physiology, exerting anti-oxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory actions. They act via binding to their cognate nuclear, mitochondrial and membrane estrogen receptors (ERs), but also in an ER-independent manner. Recently, the neuroprotective effect of mitochondrial ERs, especially mitochondrial ER β (mtER β), has been documented. The exact mechanism of mtER β action in this organelle has not been fully elucidated and is the subject of study by various research groups. Considering the significant role of mitochondria in the maintenance of neurons survival and function, the characterization of the role and the biochemical mechanisms of the actions of mtER β in neural cells is of great importance. In this context, the aim of this PhD thesis was the characterization of the direct action of mtER β on several mitochondrial processes, such as mitochondrial transcription, energy production, anti-oxidant defense, mitochondria-associated apoptosis, as well as the elucidation of mtER β effects on carcinogenesis, cell differentiation and defense against neurotoxic agents. To this aim, a stable mouse neuroblastoma cell line Neuro-2a (N2A) overexpressing a mitochondrial-targeted ER β (mtER β) fused with the green fluorescent protein (N2AmtGFPER β), and a control N2A cell line stably overexpressing a mitochondrial-targeted GFP (N2AmtGFP), was generated. The produced stable cell lines along with the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, that exhibits considerable endogenous ER β protein levels with mitochondrial ER β localization as well, were cultured in the presence or absence of a specific inhibitor of nuclear transcription or differentiation- or neurotoxicity-inducing factors, in order to study the role of mtER β in mitochondrial function, by applying real-time PCR, fluorescence microscopy, immunocytochemistry and Western blotting, measurement of ATP levels or / and MTT assays. Moreover, stable cell lines were used for the development of a xenograft mouse model, for in vivo tumorigenesis studies.

The results of this PhD thesis revealed the direct involvement of mtER β in the activation of mitochondrial transcription and ATP production, even in the presence of a specific inhibitor of nuclear polymerase and in the presence or absence of estradiol (Estradiol, E2), in both the SH-SY5Y and N2AmtGFPER β cells. Furthermore, investigation of the role of mtER β in the regulation of neural cell differentiation uncovered the involvement of mtER β in neuronal differentiation as indicated by the statistically significant increase in the neuronal length and

Tuj-1 protein levels in mtER β -overexpressing cells, compared to control cells. Moreover, the increased anti-apoptotic and anti-oxidant defense of mtER β -overexpressing N2A cells, in the presence of apoptosis- and oxidative stress- inducing factors compared to the control cells, demonstrate the direct involvement of mtER β in the regulation of apoptosis and oxidative stress, verifying the neuroprotective effect of mtER β .

The actions and effects of the mtER β actions were confirmed and further investigated by applying a xenograft mouse model of mtER β -overexpressing N2A cells. In tumorigenesis studies, the direct action of mtER β in the regulation of mitochondrial transcription was also verified. Thus, in mtER β expressing tumors the increased synthesis of OXPHOS subunits was observed that possible lead to the enhancement of energy production through the respiratory chain - OXPHOS. Our findings indicate that these mtER β -induced actions contribute to the inhibition of carcinogenesis, through direct or indirect regulation of other biochemical mechanisms such as, cellular energy metabolism, mitophagy and cell cycle, thereby reversing the trends for metabolic reprogramming observed in Warburg effect.

Finally, the study of both the potential estrogenic action of aluminum (Aluminium, Al) and the involvement of this action in Al-induced neurotoxicity, highlighted the Al-induced reduction in ER β protein levels. This action may be linked to the observed involvement of Al in the phosphorylation at S118 residue of ER α , which cause the inhibition of ER α proteolytic degradation and the increase of ER α protein levels. Increased ER α levels, as we know from the literature, induce the reduction in ER β protein levels and consequently ER β -induced neuroprotective action. In addition, the neurotoxic effect of Al could be attributed to the observed Al-induced increase in mitochondrial localization of ER β , possibly triggering mitochondrial metabolism and increasing production of ROS and induction of apoptosis.

In summary, the results of the present PhD thesis support the direct action of mtER β in the regulation of mitochondrial function in both normal and pathological conditions, rendering mtER β a potential pharmaceutical target for mitochondrial related diseases, such as cancer and neurodegenerative diseases.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- 17β - HSD:** 17β - hydroxysteroid dehydrogenase, 17β – υδροξυστεροειδής αφυδρογονάση
- Ac-CoA:** acetyl coenzyme A, ακετυλοσυνένζυμο A
- ACH:** aluminum chlorohydrate, υδροξυχλωριούχο αργίλιο
- AF:** activation function, λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής
- Al:** aluminum, αργίλιο
- AMPK:** 5' adenosine monophosphate - activated protein kinase, ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση της 5' -μονοφωσφορικής αδενοσίνης
- AP-1:** activator protein-1, ενεργοποιός πρωτεΐνη-1
- Apf-1:** apoptotic protease activating factor-1, αποπτωτικός ενεργοποιητικός παράγων πρωτεάσης - 1
- ATF:** activating transcription factor, ενεργοποιητικός παράγων μεταγραφής
- ATG:** autophagy related protein, πρωτεΐνη που σχετίζεται με την αυτοφαγία
- ATP:** adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη
- ATP -6, -8:** ATP synthase subunit -6 and -8, υπομονάδα -6 και -8 της ATP συνθάσης
- BAD:** Bcl-associated death promoter
- BNIP3:** Bcl-2 interacting protein 3, πρωτεΐνες που περιέχουν BH3 περιοχή και αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2
- BNIP3L:** BNIP3 Like
- BSA:** bovine serum albumin, αλβουμίνη βόειου ορού
- CDK:** cyclin-dependent kinase, κυκλινο-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση
- ciAP1/2:** cellular inhibitor of apoptosis proteins 1 and 2, κυτταρικοί αναστολείς των αποπτωτικών πρωτεϊνών 1/2
- CMA:** chaperone mediated autophagy, αυτοφαγία που επάγεται από συνοδές πρωτεΐνες
- CMX:** mitotracker red CMXRos, κόκκινος φθορίζον μιτοχονδριακός ιχνηθέτης CMXRos
- Col.:** colony, αποικία
- COX I-IV:** cytochrome c oxidase subunit I-IV, υπομονάδα I-IV της οξειδάσης του κυτοχρώματος c
- CREB:** cyclic AMP (cAMP) response element binding protein, μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται στα στοιχεία απόκρισης κυκλικού AMP
- cs-FBS:** charcoal stripped FBS, FBS που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με διάλυμα ενεργού άνθρακα (ζωάνθρακα)
- Cyt b / c:** cytochrome -b and -c, κυτόχρωμα -b και -c
- DBD:** DNA-binding domain, περιοχή πρόσδεσης στο DNA
- DCF:** 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 6-καρβοξυ-H2DCFDA
- DISC:** death-inducing signaling complex, σύμπλοκο σηματοδότησης που επάγει το θάνατο
- D-Loop:** displacement - loop, εκτοπισμένος βρόχος
- DRAM2:** DNA damage regulated autophagy modulator 2, ρυθμιστής της αυτοφαγίας που ρυθμίζεται από βλάβες στο DNA 2

E2: 17β-estradiol, οιστραδιόλη

EGF: epidermal growth factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας

Elk-1: ETS - like protein-1

EREs: estrogen response elements, στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα

ERK1/2: extracellular signal - regulated kinase 1/2, εξωκυττάρια σηματορρυθμιζόμενες κινάσες 1/2

ERs: estrogen receptors, υποδοχείς οιστρογόνων

ERα: estrogen receptor alpha, υποδοχέας οιστρογόνων άλφα

ERβ: estrogen receptor beta, υποδοχέας οιστρογόνων βήτα

FADD: Fas - associated protein with death domain, πρωτεϊνικός ενδιάμεσος «προσαρμοστής» για τον υποδοχέα Fas

FBS: fetal bovine serum, εμβρυϊκός βόειος ορός

FSH: Follicle - Stimulating Hormone, θυλακιοτρόπος ορμόνη

FUNDC1: FUN14 domain - containing protein 1, πρωτεΐνη με περιοχή FUN14

GABA: gamma - aminobutyric acid, γ - αμινοβουτυρικό οξύ

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης

GFP: green fluorescent protein, πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη

GnRH: gonadotropin - releasing hormone, εκλυτική ορμόνη της γοναδοτροπίνης

GP1B: G protein - coupled estrogen receptor 1, ο συζευγμένος με G πρωτεΐνες υποδοχέας οιστρογόνων 1

H₂O₂: hydrogen peroxide, υπεροξείδιο του υδρογόνου

HIF-1α: hypoxia - inducible factor 1 - alpha, επαγόμενος από την υποξία μεταγραφικός παράγοντας 1-α

h-NRG-1: human neuregulin 1, ανθρώπινη νευρορεγουλίνη 1

HREs: hormone response elements, στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες

HRP: horseradish peroxidase, αρμορακική οξειδάση (χρένου)

HSPs: heat shock proteins, πρωτεΐνες θερμικού σοκ

IAPs: inhibitor of apoptosis proteins, πρωτεΐνες αναστολείς της απόπτωσης

IGF1: insulin-like growth factor-1, ινσουλινοειδής αυξητικός παράγοντας-1

IGFR1: IGF1 receptor, υποδοχέας του IGF1

IL: interleukin, ιντερλευκίνη

JC-1: 5,5', 6,6' - tetrachloro - 1,1',3,3' - tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide

JNK: c-Jun N-terminal Kinase, c-Jun αμινοτελική κινάση

LAMP-1 and -2: lysosome - associated membrane protein -1 and -2, μεμβρανικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με το λυσόσωμα

LBD: ligand-binding domain, περιοχή δέσμησης με τον προσδέτη

LC3: microtubule-associated protein light chain 3, ελαφριά αλυσίδα 3 της πρωτεΐνης που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους

LDH: lactate dehydrogenase, αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος

LDL: low - density lipoprotein, λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας

L-Glu: L-Glutamine, L-γλουταμίνη

LH: luteinizing hormone, ωχρινότροπος ορμόνη

LIR: LC3 interacting region, περιοχές αλληλεπίδρασης με το LC3

MAPK: microtubule associated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση που σχετίζεται με τους μικροσωληνίσκους

MDH2: malate dehydrogenase 2, ισομορφή 2 της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος

mER α / β : membrane estrogen receptor α / β , μεμβρανικός υποδοχέας οιστρογόνων α / β

Mito: mitochondrial fraction, εμπλουτισμένο με μιτοχόνδρια κλάσμα

mtDNA: mitochondrial DNA, μιτοχονδριακό DNA

mtEREs: mitochondrial EREs, μιτοχονδριακά EREs

mtER β : mitochondrial ER β , μιτοχονδριακός ER β

mTOR: mammalian target of rapamycin, στόχος ραπαμυκίνης στα θηλαστικά

mTORC1: mTOR complex 1, σύμπλοκο mTOR 1

N2A: Neuro-2A, κύτταρα νευροβλαστώματος ποντικού

N2A wt: N2A wild type, N2A αγρίου τύπου

NBR1: NBR1 autophagy cargo receptor

ND 1-6, 4L: NADH dehydrogenase subunit 1-6, 4L, υπομονάδα 1-6, 4L της αφυδρογονάσης του NADH

NDP52: nuclear dot protein 52

NHRs: nuclear hormone receptors, πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών

NRF: nuclear respiratory factor, πυρηνικός αναπνευστικός παράγοντας

NTD: N-terminal domain, αμινοτελική περιοχή

OPTN: optineurin

OXPHOS: oxidative phosphorylation, οξειδωτική φωσφορυλίωση

P/S: penicillin / streptomycin, πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη

P62 (P62/SQSTM1): sequestosome 1, πρωτεΐνη σύνδεσης ουβικιτίνης

pAMPK: phospho AMPK, φωσφορυλιωμένη AMPK

PBS: phosphate-buffered saline, αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικά

PDH: pyruvate dehydrogenase, αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος

PE: phosphatidyl ethanolamine, φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη

pER α : phospho ER α , φωσφορυλιωμένος ER α

PGC-1 α : peroxisome proliferator - activated receptor gamma - coactivator 1 alpha

PH: heavy strand promoter, υποκινητής βαριάς αλυσίδας

PHB2: prohibitin 2

PI3K: phosphatidyl inositol 3 kinase, κινάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης τύπου III

PINK1: PTEN-induced kinase 1, επαγόμενη από το PTEN κινάση 1

PKA: protein kinase A, πρωτεϊνική κινάση A

PKC: protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C

PL: light strand promoter, υποκινητής ελαφριάς αλυσίδας

PLC: phospholipase C, φωσφολιπάση C

PM: postmitochondrial fraction, εμπλουτισμένο με κυτταροπλασματικά συστατικά κλάσμα

POLRMT: RNA polymerase mitochondrial, μιτοχονδριακή πολυμεράση

PTEN: phosphatase and tensin homolog, φωσφατάση ομόλογη της τενσίνης

PUMA: p53 - upregulated modulator of apoptosis, αυξορρυθμιζόμενος από το p53 ρυθμιστής της απόπτωσης

PVA: polyvinyl alcohol, πολυβινυλική αλκοόλη

R5P: ribose 5-phosphate, 5-φωσφορική ριβόζη

RA: retinoic acid, ρετινοϊκό οξύ

RAR: retinoic acid receptor, υποδοχέας ρετινοϊκού οξέος

RIP: receptor - interacting protein kinases, πρωτεϊνικές κινάσες που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς

ROS: reactive oxygen species, ενεργές μορφές οξυγόνου

rRNA: ribosomal RNA, ριβοσωμικό RNA

RXR: retinoid X receptor, υποδοχέας ρετινοϊδων X

S118: serine 118, ser 118, σερίνη 118

SDH: succinate dehydrogenase, αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου

SERMs: selective estrogen receptor modulators, εκλεκτικοί ρυθμιστές των ERs

SHBG: sex hormone-binding globulin, σφαιρίνη δέσμησης ορμόνης φύλου

Smac: second mitochondrial-derived activator of caspase, δεύτερος μιτοχονδριακά προερχόμενος ενεργοποιητής της κασπάσης

SOD 1: Cu/Zn SOD, υπεροξείδιο της δισμουτάσης του χαλκού/ψευδαργύρου

SOD 2: MnSOD, υπεροξείδιο της δισμουτάσης του μαγγανίου

SP-1: stimulating protein-1, διεγερτική πρωτεΐνη-1

STAT: signal transducer and activator of transcription, μεταγωγέας σήματος και ενεργοποιητής της μεταγραφής

STS: staurosporine, σταυροσπορίνη

TBS: tris-buffered saline, αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα

TCA cycle: tricarboxylic acid, κύκλος του κιτρικού οξέος

TE: total extract, ολικό κυτταρικό εκχύλισμα

TF: transcription factor, μεταγραφικός παράγοντας

TFAM: mitochondrial transcription factor A, μιτοχονδριακός μεταγραφικός παράγοντας A

TFB1M/TFB2M: mitochondrial transcription factor B1/B2, μιτοχονδριακοί μεταγραφικοί παράγοντες B1 και B2

Thr172: threonine 172, θρεονίνη 172

TIM: translocase of the inner membrane, σύμπλοκο της μετατοπάσης της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου

TNBC: triple negative breast cancer

TNF-α: tumor necrosis factor alpha, παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα

TNFR1: tumor necrosis factor receptor 1, υποδοχέας 1 του παράγοντα νέκρωσης όγκου

TOM: translocase of the mitochondrial outer membrane, σύμπλοκο της μετατοπάσης της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου

TRADD: TNFR1 - associated death domain protein, πρωτεϊνικός ενδιάμεσος «προσαρμοστής» για τον υποδοχέα TNFR1

TRAF 2/5: TNFR associated factors 2/5, παράγοντες που σχετίζεται με τον TNFR 2/5

TRP: tetratricopeptide repeat motifs, τετρατικοπεπτιδικά επαναλαμβανόμενα μοτίβα

Tuj-1: βIII-tubulin, βIII τουμπουλίνη

ULK 1/2: Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2, Unc-51 like κινάση ενεργοποίησης της αυτοφαγίας 1/2

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbas, T. and A. Dutta (2009). "p21 in cancer: intricate networks and multiple activities." Nat Rev Cancer **9**(6): 400-414.
- Agostini, M., F. Romeo, S. Inoue, M. V. Niklison-Chirou, A. J. Elia, D. Dinsdale, N. Morone, R. A. Knight, T. W. Mak and G. Melino (2016). "Metabolic reprogramming during neuronal differentiation." Cell Death Differ **23**(9): 1502-1514.
- Allen, E. and E. A. Doisy (1983). "Landmark article Sept 8, 1923. An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. By Edgar Allen and Edward A. Doisy." JAMA **250**(19): 2681-2683.
- An, H. K., K. M. Chung, H. Park, J. Hong, J. E. Gim, H. Choi, Y. W. Lee, J. Choi, J. Y. Mun and S. W. Yu (2020). "CASP9 (caspase 9) is essential for autophagosome maturation through regulation of mitochondrial homeostasis." Autophagy **16**(9): 1598-1617.
- Anbalagan, M. and B. G. Rowan (2015). "Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer." Mol Cell Endocrinol **418 Pt 3**: 264-272.
- Arevalo, M. A., I. Azcoitia and L. M. Garcia-Segura (2015). "The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors." Nat Rev Neurosci **16**(1): 17-29.
- Ascenzi, P., A. di Masi, L. Leboffe, M. Fiocchetti, M. T. Nuzzo, M. Brunori and M. Marino (2016). "Neuroglobin: From structure to function in health and disease." Mol Aspects Med **52**: 1-48.
- Azcoitia, I., G. E. Barreto and L. M. Garcia-Segura (2019). "Molecular mechanisms and cellular events involved in the neuroprotective actions of estradiol. Analysis of sex differences." Front Neuroendocrinol **55**: 100787.
- Baez-Jurado, E., M. A. Rincon-Benavides, O. Hidalgo-Lanussa, G. Guio-Vega, G. M. Ashraf, A. Sahebkar, V. Echeverria, L. M. Garcia-Segura and G. E. Barreto (2019). "Molecular mechanisms involved in the protective actions of Selective Estrogen Receptor Modulators in brain cells." Front Neuroendocrinol **52**: 44-64.
- Barakat, R., O. Oakley, H. Kim, J. Jin and C. J. Ko (2016). "Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function." BMB Rep **49**(9): 488-496.
- Bayeva, N., E. Coll and O. Piskareva (2021). "Differentiating Neuroblastoma: A Systematic Review of the Retinoic Acid, Its Derivatives, and Synergistic Interactions." J Pers Med **11**(3).
- Beato, M. (1989). "Gene regulation by steroid hormones." Cell **56**(3): 335-344.
- Beato, M., P. Herrlich and G. Schutz (1995). "Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot." Cell **83**(6): 851-857.
- Becaria, A., S. C. Bondy and A. Campbell (2003). "Aluminum and copper interact in the promotion of oxidative but not inflammatory events: implications for Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **5**(1): 31-38.
- Becaria, A., A. Campbell and S. C. Bondy (2002). "Aluminum as a toxicant." Toxicol Ind Health **18**(7): 309-320.
- Beikoghli Kalkhoran, S. and G. Kararigas (2022). "Oestrogenic Regulation of Mitochondrial Dynamics." Int J Mol Sci **23**(3).
- Bejarano, E. and A. M. Cuervo (2010). "Chaperone-mediated autophagy." Proc Am Thorac Soc **7**(1): 29-39.

- Bhangoo, M. K., S. Tzankov, A. C. Fan, K. Dejgaard, D. Y. Thomas and J. C. Young (2007). "Multiple 40-kDa heat-shock protein chaperones function in Tom70-dependent mitochondrial import." Mol Biol Cell **18**(9): 3414-3428.
- Bjornstrom, L. and M. Sjoberg (2005). "Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes." Mol Endocrinol **19**(4): 833-842.
- Bonawitz, N. D., D. A. Clayton and G. S. Shadel (2006). "Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery." Mol Cell **24**(6): 813-825.
- Bondy, S. C. (2014). "Prolonged exposure to low levels of aluminum leads to changes associated with brain aging and neurodegeneration." Toxicology **315**: 1-7.
- Brann, D. W., Q. G. Zhang, R. M. Wang, V. B. Mahesh and R. K. Vadlamudi (2008). "PELP1--a novel estrogen receptor-interacting protein." Mol Cell Endocrinol **290**(1-2): 2-7.
- Bulun, S. E., K. Zeitoun, H. Sasano and E. R. Simpson (1999). "Aromatase in aging women." Semin Reprod Endocrinol **17**(4): 349-358.
- Burgess, D. J. (2013). "Metabolism: Glutamine connections." Nat Rev Cancer **13**(5): 293.
- Burstein, S. R., H. J. Kim, J. A. Fels, L. Qian, S. Zhang, P. Zhou, A. A. Starkov, C. Iadecola and G. Manfredi (2018). "Estrogen receptor beta modulates permeability transition in brain mitochondria." Biochim Biophys Acta Bioenerg **1859**(6): 423-433.
- Cavalcanti, F. N., T. F. Lucas, M. F. Lazari and C. S. Porto (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.
- Chainy, G. B. N. and D. K. Sahoo (2020). "Hormones and oxidative stress: an overview." Free Radic Res **54**(1): 1-26.
- Chalansonnet, M., N. Carabin, S. Boucard, L. Merlen, M. Melczer, G. Antoine, J. Devoy, A. Remy and F. Gagnaire (2018). "Study of potential transfer of aluminum to the brain via the olfactory pathway." Toxicol Lett **283**: 77-85.
- Chen, J. Q., P. R. Cammarata, C. P. Baines and J. D. Yager (2009). "Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications." Biochim Biophys Acta **1793**(10): 1540-1570.
- Chen, J. Q., M. Delannoy, C. Cooke and J. D. Yager (2004). "Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(6): E1011-1022.
- Chen, J. Q., M. Eshete, W. L. Alworth and J. D. Yager (2004). "Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements." J Cell Biochem **93**(2): 358-373.
- Chen, J. Q., J. D. Yager and J. Russo (2005). "Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications." Biochim Biophys Acta **1746**(1): 1-17.
- Cheng, J., E. J. Lee, L. D. Madison and G. Lazennec (2004). "Expression of estrogen receptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis." FEBS Lett **566**(1-3): 169-172.
- Chiaradonna, F., D. Gaglio, M. Vanoni and L. Alberghina (2006). "Expression of transforming K-Ras oncogene affects mitochondrial function and morphology in mouse fibroblasts." Biochim Biophys Acta **1757**(9-10): 1338-1356.
- Chimento, A., A. De Luca, P. Avena, F. De Amicis, I. Casaburi, R. Sirianni and V. Pezzi (2022). "Estrogen Receptors-Mediated Apoptosis in Hormone-Dependent Cancers." Int J Mol Sci **23**(3).

- Chiueh, C., S. Lee, T. Andoh and D. Murphy (2003). "Induction of antioxidative and antiapoptotic thioredoxin supports neuroprotective hypothesis of estrogen." *Endocrine* **21**(1): 27-31.
- Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." *Biochem J* **326** (Pt 1): 1-16.
- Cue, L., F. Diaz, K. J. Briegel, H. H. Patel and A. P. Raval (2015). "Periodic Estrogen Receptor-Beta Activation: A Novel Approach to Prevent Ischemic Brain Damage." *Neurochem Res* **40**(10): 2009-2017.
- Cui, J., Y. Shen and R. Li (2013). "Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain." *Trends Mol Med* **19**(3): 197-209.
- Cummins, N. and J. Gotz (2018). "Shedding light on mitophagy in neurons: what is the evidence for PINK1/Parkin mitophagy in vivo?" *Cell Mol Life Sci* **75**(7): 1151-1162.
- Darbre, P. D. (2005). "Aluminium, antiperspirants and breast cancer." *J Inorg Biochem* **99**(9): 1912-1919.
- Darbre, P. D. (2006). "Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast." *J Appl Toxicol* **26**(3): 191-197.
- Deberardinis, R. J., N. Sayed, D. Ditsworth and C. B. Thompson (2008). "Brick by brick: metabolism and tumor cell growth." *Curr Opin Genet Dev* **18**(1): 54-61.
- Demonacos, C. V., N. Karayanni, E. Hatzoglou, C. Tsiriyiotis, D. A. Spandidos and C. E. Sekeris (1996). "Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones." *Steroids* **61**(4): 226-232.
- Deroo, B. J. and K. S. Korach (2006). "Estrogen receptors and human disease." *J Clin Invest* **116**(3): 561-570.
- Dey, P., R. P. Barros, M. Warner, A. Strom and J. A. Gustafsson (2013). "Insight into the mechanisms of action of estrogen receptor beta in the breast, prostate, colon, and CNS." *J Mol Endocrinol* **51**(3): T61-74.
- Dorea, J. G. (2015). "Exposure to mercury and aluminum in early life: developmental vulnerability as a modifying factor in neurologic and immunologic effects." *Int J Environ Res Public Health* **12**(2): 1295-1313.
- Dykens, J. A., W. H. Moos and N. Howell (2005). "Development of 17alpha-estradiol as a neuroprotective therapeutic agent: rationale and results from a phase I clinical study." *Ann N Y Acad Sci* **1052**: 116-135.
- Egawa, Y., C. Saigo, Y. Kito, T. Moriki and T. Takeuchi (2018). "Therapeutic potential of CPI-613 for targeting tumorous mitochondrial energy metabolism and inhibiting autophagy in clear cell sarcoma." *PLoS One* **13**(6): e0198940.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* **35**(4): 495-516.
- Enmark, E., M. Pelto-Huikko, K. Grandien, S. Lagercrantz, J. Lagercrantz, G. Fried, M. Nordenskjold and J. A. Gustafsson (1997). "Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern." *J Clin Endocrinol Metab* **82**(12): 4258-4265.
- Ettinger, A. W., M. Wilsch-Brauninger, A. M. Marzesco, M. Bickle, A. Lohmann, Z. Maliga, J. Karbanova, D. Corbeil, A. A. Hyman and W. B. Huttner (2011). "Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour." *Nat Commun* **2**: 503.
- Evan R. Simpson, Colin Clyne, Gary Rubin, Wah Chin Boon, Kirsten Robertson, Kara Britt, a. Caroline Speed and M. Jones (2002). "Aromatase—A Brief Overview." *Annual Review of Physiology* **64**(1): 93-127.
- Feng, Y. and P. Gregor (1997). "Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors." *Biochem Biophys Res Commun* **231**(3): 651-654.

- Ferreira, L. M., A. Hebrant and J. E. Dumont (2012). "Metabolic reprogramming of the tumor." Oncogene **31**(36): 3999-4011.
- Fitzpatrick, S. L. and J. S. Richards (1991). "Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells." Endocrinology **129**(3): 1452-1462.
- Folkerts, H., S. Hilgendorf, E. Vellenga, E. Bremer and V. R. Wiersma (2019). "The multifaceted role of autophagy in cancer and the microenvironment." Med Res Rev **39**(2): 517-560.
- Fuentes, N. and P. Silveyra (2019). "Estrogen receptor signaling mechanisms." Adv Protein Chem Struct Biol **116**: 135-170.
- Fujimoto, J., R. Hirose, H. Sakaguchi and T. Tamaya (1999). "Expression of oestrogen receptor-alpha and -beta in ovarian endometriomata." Mol Hum Reprod **5**(8): 742-747.
- Gaitanou, M., K. Segklia and R. Matsas (2019). "Cend1, a Story with Many Tales: From Regulation of Cell Cycle Progression/Exit of Neural Stem Cells to Brain Structure and Function." Stem Cells Int **2019**: 2054783.
- Georgakilas, A. G., O. A. Martin and W. M. Bonner (2017). "p21: A Two-Faced Genome Guardian." Trends Mol Med **23**(4): 310-319.
- Georgopoulou, N., C. Hurel, P. K. Politis, M. Gaitanou, R. Matsas and D. Thomaidou (2006). "BM88 is a dual function molecule inducing cell cycle exit and neuronal differentiation of neuroblastoma cells via cyclin D1 down-regulation and retinoblastoma protein hypophosphorylation." J Biol Chem **281**(44): 33606-33620.
- Gherardi, R. K., J. Aouizerate, J. Cadusseau, S. Yara and F. J. Authier (2016). "Aluminum adjuvants of vaccines injected into the muscle: Normal fate, pathology and associated disease." Morphologie **100**(329): 85-94.
- Goldshmit, Y., S. Erlich and R. Pinkas-Kramarski (2001). "Neuregulin rescues PC12-ErbB4 cells from cell death induced by H(2)O(2). Regulation of reactive oxygen species levels by phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem **276**(49): 46379-46385.
- Gorgogietas, V. A., I. Tsialtas, N. Sotiriou, V. C. Laschou, A. G. Karra, D. D. Leonidas, G. P. Chrousos, E. Protopapa and A. G. Psarra (2018). "Potential interference of aluminum chlorohydrate with estrogen receptor signaling in breast cancer cells." J Mol Biochem **7**(1): 1-13.
- Gosden, J. R., P. G. Middleton and D. Rout (1986). "Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24----q27 by in situ hybridization." Cytogenet Cell Genet **43**(3-4): 218-220.
- Green, P. S. and J. W. Simpkins (2000). "Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action." Int J Dev Neurosci **18**(4-5): 347-358.
- Green, S., P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J. M. Bornert, P. Argos and P. Chambon (1986). "Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A." Nature **320**(6058): 134-139.
- Greene, G. L., P. Gilna, M. Waterfield, A. Baker, Y. Hort and J. Shine (1986). "Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA." Science **231**(4742): 1150-1154.
- Gruber, C. J., W. Tschugguel, C. Schneeberger and J. C. Huber (2002). "Production and actions of estrogens." N Engl J Med **346**(5): 340-352.
- Gu, Y., T. Chen, E. Lopez, W. Wu, X. Wang, J. Cao and L. Teng (2014). "The therapeutic target of estrogen receptor-alpha36 in estrogen-dependent tumors." J Transl Med **12**: 16.

- Gulliver, L. (2013). "Estradiol Synthesis and Metabolism and Risk of Ovarian Cancer in Older Women Taking Prescribed or Plant-derived Estrogen Supplementation." Journal of Steroids & Hormonal Science: 0-0.
- Guo, C., S. Liu and M. Z. Sun (2013). "Novel insight into the role of GAPDH playing in tumor." Clin Transl Oncol **15**(3): 167-172.
- Guo, H., M. Liu, L. Zhang, L. Wang, W. Hou, Y. Ma and Y. Ma (2020). "The Critical Period for Neuroprotection by Estrogen Replacement Therapy and the Potential Underlying Mechanisms." Curr Neuropharmacol **18**(6): 485-500.
- Gupte, A. A., H. J. Pownall and D. J. Hamilton (2015). "Estrogen: an emerging regulator of insulin action and mitochondrial function." J Diabetes Res **2015**: 916585.
- Gustafsson, C. M., M. Falkenberg and N. G. Larsson (2016). "Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA." Annu Rev Biochem **85**: 133-160.
- Gustafsson, J. A., A. Strom and M. Warner (2019). "Update on ERbeta." J Steroid Biochem Mol Biol **191**: 105312.
- Hacker, G. (2000). "The morphology of apoptosis." Cell Tissue Res **301**(1): 5-17.
- Han, G., R. J. Casson, G. Chidlow and J. P. Wood (2014). "The mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces endoplasmic reticulum stress and activation of GSK-3beta in cultured rat retinal cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(9): 5616-5628.
- Han, J., W. Hou, L. A. Goldstein, D. B. Stolz, S. C. Watkins and H. Rabinowich (2014). "A Complex between Atg7 and Caspase-9: A NOVEL MECHANISM OF CROSS-REGULATION BETWEEN AUTOPHAGY AND APOPTOSIS." J Biol Chem **289**(10): 6485-6497.
- Hardie, D. G. (2015). "Molecular Pathways: Is AMPK a Friend or a Foe in Cancer?" Clin Cancer Res **21**(17): 3836-3840.
- He, C. and D. J. Klionsky (2009). "Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy." Annu Rev Genet **43**: 67-93.
- Heldring, N., A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Strom, E. Treuter, M. Warner and J. A. Gustafsson (2007). "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets." Physiol Rev **87**(3): 905-931.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-776.
- Herzig, S. and R. J. Shaw (2018). "AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis." Nat Rev Mol Cell Biol **19**(2): 121-135.
- Hewitt, S. C. and K. S. Korach (2018). "Estrogen Receptors: New Directions in the New Millennium." Endocr Rev **39**(5): 664-675.
- Holinka, C. F., E. Diczfalusy and H. J. Coelingh Bennink (2008). "Estetrol: a unique steroid in human pregnancy." J Steroid Biochem Mol Biol **110**(1-2): 138-143.
- Hsieh, Y. C., M. A. Choudhry, H. P. Yu, T. Shimizu, S. Yang, T. Suzuki, J. Chen, K. I. Bland and I. H. Chaudry (2006). "Inhibition of cardiac PGC-1alpha expression abolishes ERbeta agonist-mediated cardioprotection following trauma-hemorrhage." FASEB J **20**(8): 1109-1117.
- Hsieh, Y. C., S. Yang, M. A. Choudhry, H. P. Yu, L. W. Rue, 3rd, K. I. Bland and I. H. Chaudry (2005). "PGC-1 upregulation via estrogen receptors: a common mechanism of salutary effects of estrogen and flutamide on heart function after trauma-hemorrhage." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(6): H2665-2672.
- Hsu, T. C., K. K. Liu, H. C. Chang, E. Hwang and J. I. Chao (2014). "Labeling of neuronal differentiation and neuron cells with biocompatible fluorescent nanodiamonds." Sci Rep **4**: 5004.

- Huttlin, E. L., M. P. Jedrychowski, J. E. Elias, T. Goswami, R. Rad, S. A. Beausoleil, J. Villen, W. Haas, M. E. Sowa and S. P. Gygi (2010). "A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression." *Cell* **143**(7): 1174-1189.
- Hwang, S., M. H. Disatnik and D. Mochly-Rosen (2015). "Impaired GAPDH-induced mitophagy contributes to the pathology of Huntington's disease." *EMBO Mol Med* **7**(10): 1307-1326.
- Illendula, A., N. Fultang and B. Peethambaran (2020). "Retinoic acid induces differentiation in neuroblastoma via ROR1 by modulating retinoic acid response elements." *Oncol Rep* **44**(3): 1013-1024.
- Ishihara, Y., T. Takemoto, A. Ishida and T. Yamazaki (2015). "Protective actions of 17beta-estradiol and progesterone on oxidative neuronal injury induced by organometallic compounds." *Oxid Med Cell Longev* **2015**: 343706.
- Janesick, A., S. C. Wu and B. Blumberg (2015). "Retinoic acid signaling and neuronal differentiation." *Cell Mol Life Sci* **72**(8): 1559-1576.
- Jensen, E. V., E. R. Desombre, T. Kawashima, T. Suzuki, K. Kyser and P. W. Jungblut (1967). "Estrogen-binding substances of target tissues." *Science* **158**(3800): 529-530.
- Jensen, E. V., T. Suzuki, T. Kawashima, W. E. Stumpf, P. W. Jungblut and E. R. DeSombre (1968). "A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **59**(2): 632-638.
- Jeong, H. S., H. Y. Choi, E. R. Lee, J. H. Kim, K. Jeon, H. J. Lee and S. G. Cho (2011). "Involvement of caspase-9 in autophagy-mediated cell survival pathway." *Biochim Biophys Acta* **1813**(1): 80-90.
- Jia, M., K. Dahlman-Wright and J. A. Gustafsson (2015). "Estrogen receptor alpha and beta in health and disease." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **29**(4): 557-568.
- Johnson, J., E. Mercado-Ayon, Y. Mercado-Ayon, Y. N. Dong, S. Halawani, L. Ngaba and D. R. Lynch (2021). "Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases." *Arch Biochem Biophys* **702**: 108698.
- Kale, J., E. J. Osterlund and D. W. Andrews (2018). "BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death." *Cell Death Differ* **25**(1): 65-80.
- Kann, O. and R. Kovacs (2007). "Mitochondria and neuronal activity." *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(2): C641-657.
- Karimian, A., Y. Ahmadi and B. Yousefi (2016). "Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage." *DNA Repair (Amst)* **42**: 63-71.
- Ke, P. Y. (2018). "The Multifaceted Roles of Autophagy in Flavivirus-Host Interactions." *Int J Mol Sci* **19**(12).
- Kent, A. C., K. B. Y. El Baradie and M. W. Hamrick (2021). "Targeting the Mitochondrial Permeability Transition Pore to Prevent Age-Associated Cell Damage and Neurodegeneration." *Oxid Med Cell Longev* **2021**: 6626484.
- Killackey, S. A., D. J. Philpott and S. E. Girardin (2020). "Mitophagy pathways in health and disease." *J Cell Biol* **219**(11).
- Klinge, C. M. (2008). "Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis." *J Cell Biochem* **105**(6): 1342-1351.
- Klinge, C. M. (2017). "Estrogens regulate life and death in mitochondria." *J Bioenerg Biomembr* **49**(4): 307-324.
- Klinge, C. M. (2020). "Estrogenic control of mitochondrial function." *Redox Biol* **31**: 101435.

- Kocaturk, N. M. and D. Gozuacik (2018). "Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System." *Front Cell Dev Biol* **6**: 128.
- Koide, A., C. Zhao, M. Naganuma, J. Abrams, S. Deighton-Collins, D. F. Skafar and S. Koide (2007). "Identification of regions within the F domain of the human estrogen receptor alpha that are important for modulating transactivation and protein-protein interactions." *Mol Endocrinol* **21**(4): 829-842.
- Korecka, J. A., R. E. van Kesteren, E. Blaas, S. O. Spitzer, J. H. Kamstra, A. B. Smit, D. F. Swaab, J. Verhaagen and K. Bossers (2013). "Phenotypic characterization of retinoic acid differentiated SH-SY5Y cells by transcriptional profiling." *PLoS One* **8**(5): e63862.
- Krewski, D., R. A. Yokel, E. Nieboer, D. Borchelt, J. Cohen, J. Harry, S. Kacew, J. Lindsay, A. M. Mahfouz and V. Rondeau (2007). "Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide." *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **10 Suppl 1**: 1-269.
- Kubli, D. A. and A. B. Gustafsson (2012). "Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control." *Circ Res* **111**(9): 1208-1221.
- Kuiper, G. G., E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson and J. A. Gustafsson (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 5925-5930.
- Kumar, R., M. N. Zakharov, S. H. Khan, R. Miki, H. Jang, G. Toraldo, R. Singh, S. Bhasin and R. Jasuja (2011). "The dynamic structure of the estrogen receptor." *J Amino Acids* **2011**: 812540.
- Lee, Y., H. Y. Lee, R. A. Hanna and A. B. Gustafsson (2011). "Mitochondrial autophagy by Bnip3 involves Drp1-mediated mitochondrial fission and recruitment of Parkin in cardiac myocytes." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**(5): H1924-1931.
- Lee, Y. M., W. He and Y. C. Liou (2021). "The redox language in neurodegenerative diseases: oxidative post-translational modifications by hydrogen peroxide." *Cell Death Dis* **12**(1): 58.
- Leigh-Brown, S., J. A. Enriquez and D. T. Odom (2010). "Nuclear transcription factors in mammalian mitochondria." *Genome Biol* **11**(7): 215.
- Li, C., M. R. Briggs, T. E. Ahlborn, F. B. Kraemer and J. Liu (2001). "Requirement of Sp1 and estrogen receptor alpha interaction in 17beta-estradiol-mediated transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene expression." *Endocrinology* **142**(4): 1546-1553.
- Li, H., C. Ding, Z. L. Ding, M. Ling, T. Wang, W. Wang and B. Huang (2017). "17beta-Oestradiol promotes differentiation of human embryonic stem cells into dopamine neurons via cross-talk between insulin-like growth factors-1 and oestrogen receptor beta." *J Cell Mol Med* **21**(8): 1605-1618.
- Li, H. L., H. H. Wang, S. J. Liu, Y. Q. Deng, Y. J. Zhang, Q. Tian, X. C. Wang, X. Q. Chen, Y. Yang, J. Y. Zhang, Q. Wang, H. Xu, F. F. Liao and J. Z. Wang (2007). "Phosphorylation of tau antagonizes apoptosis by stabilizing beta-catenin, a mechanism involved in Alzheimer's neurodegeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(9): 3591-3596.
- Li, N., K. Ragheb, G. Lawler, J. Sturgis, B. Rajwa, J. A. Melendez and J. P. Robinson (2003). "Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production." *J Biol Chem* **278**(10): 8516-8525.
- Li, W., S. M. Saud, M. R. Young, G. Chen and B. Hua (2015). "Targeting AMPK for cancer prevention and treatment." *Oncotarget* **6**(10): 7365-7378.
- Li, Y., W. Zheng, Y. Lu, Y. Zheng, L. Pan, X. Wu, Y. Yuan, Z. Shen, S. Ma, X. Zhang, J. Wu, Z. Chen and X. Zhang (2021). "BNIP3L/NIX-mediated mitophagy: molecular mechanisms and implications for human disease." *Cell Death Dis* **13**(1): 14.

- Liang, J., Q. Xie, P. Li, X. Zhong and Y. Chen (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.
- Liao, T. L., Y. C. Lee, C. R. Tzeng, Y. P. Wang, H. Y. Chang, Y. F. Lin and S. H. Kao (2019). "Mitochondrial translocation of estrogen receptor beta affords resistance to oxidative insult-induced apoptosis and contributes to the pathogenesis of endometriosis." Free Radic Biol Med **134**: 359-373.
- Liao, T. L., C. R. Tzeng, C. L. Yu, Y. P. Wang and S. H. Kao (2015). "Estrogen receptor-beta in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis." Ann NY Acad Sci **1350**: 52-60.
- Lindell, T. J., F. Weinberg, P. W. Morris, R. G. Roeder and W. J. Rutter (1970). "Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin." Science **170**(3956): 447-449.
- Liu, M. M., C. Albanese, C. M. Anderson, K. Hilty, P. Webb, R. M. Uht, R. H. Price, Jr., R. G. Pestell and P. J. Kushner (2002). "Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression." J Biol Chem **277**(27): 24353-24360.
- Liu, Q., C. T. Harvey, H. Geng, C. Xue, V. Chen, T. M. Beer and D. Z. Qian (2013). "Malate dehydrogenase 2 confers docetaxel resistance via regulations of JNK signaling and oxidative metabolism." Prostate **73**(10): 1028-1037.
- Liu, Z., Y. Gou, H. Zhang, H. Zuo, H. Zhang, Z. Liu and D. Yao (2014). "Estradiol improves cardiovascular function through up-regulation of SOD2 on vascular wall." Redox Biol **3**: 88-99.
- Lonard, D. M. and W. O'Malley B (2007). "Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation." Mol Cell **27**(5): 691-700.
- Lone, A. M., N. J. Dar, A. Hamid, W. A. Shah, M. Ahmad and B. A. Bhat (2016). "Promise of Retinoic Acid-Triazolyl Derivatives in Promoting Differentiation of Neuroblastoma Cells." ACS Chem Neurosci **7**(1): 82-89.
- Lone, M. U., K. S. Baghel, R. K. Kanchan, R. Shrivastava, S. A. Malik, B. N. Tewari, C. Tripathi, M. P. Negi, V. K. Garg, M. Sharma, M. L. Bhatt and S. Bhaduria (2017). "Physical interaction of estrogen receptor with MnSOD: implication in mitochondrial O₂(-) upregulation and mTORC2 potentiation in estrogen-responsive breast cancer cells." Oncogene **36**(13): 1829-1839.
- Lopes, F. M., R. Schroder, M. L. da Frota, Jr., A. Zannotto-Filho, C. B. Muller, A. S. Pires, R. T. Meurer, G. D. Colpo, D. P. Gelain, F. Kapczinski, J. C. Moreira, C. Fernandes Mda and F. Klamt (2010). "Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies." Brain Res **1337**: 85-94.
- Lu, Y., G. R. Sareddy, J. Wang, Q. Zhang, F. L. Tang, U. P. Pratap, R. R. Tekmal, R. K. Vadlamudi and D. W. Brann (2020). "Neuron-Derived Estrogen Is Critical for Astrocyte Activation and Neuroprotection of the Ischemic Brain." J Neurosci **40**(38): 7355-7374.
- Ma, Y. C., P. F. Tian, Z. P. Chen, D. S. Yue, C. C. Liu, C. G. Li, C. Chen, H. Zhang, H. L. Liu, Z. F. Zhang, L. Chen, B. Zhang and C. L. Wang (2021). "Urinary malate dehydrogenase 2 is a new biomarker for early detection of non-small-cell lung cancer." Cancer Sci **112**(6): 2349-2360.
- Maddirala, Y., S. Tobwala and N. Ercal (2015). "N-acetylcysteineamide protects against manganese-induced toxicity in SHSY5Y cell line." Brain Res **1608**: 157-166.
- Maharjan, S., M. Oku, M. Tsuda, J. Hoseki and Y. Sakai (2014). "Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition." Sci Rep **4**: 5896.
- Mahmoodzadeh, S. and E. Dworatzek (2019). "The Role of 17beta-Estradiol and Estrogen Receptors in Regulation of Ca(2+) Channels and Mitochondrial Function in Cardiomyocytes." Front Endocrinol (Lausanne) **10**: 310.

Marin-Vicente, C., M. Guerrero-Valero, M. L. Nielsen, M. M. Savitski, J. C. Gomez-Fernandez, R. A. Zubarev and S. Corbalan-Garcia (2011). "ATP enhances neuronal differentiation of PC12 cells by activating PKC α interactions with cytoskeletal proteins." J Proteome Res **10**(2): 529-540.

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

Marzagalli, M., L. Casati, R. M. Moretti, M. Montagnani Marelli and P. Limonta (2015). "Estrogen Receptor beta Agonists Differentially Affect the Growth of Human Melanoma Cell Lines." PLoS One **10**(7): e0134396.

Marzinke, M. A. and M. Clagett-Dame (2012). "The all-trans retinoic acid (atRA)-regulated gene Calmin (Clmn) regulates cell cycle exit and neurite outgrowth in murine neuroblastoma (Neuro2a) cells." Exp Cell Res **318**(1): 85-93.

Matthews, J. and J. A. Gustafsson (2003). "Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta." Mol Interv **3**(5): 281-292.

Mattingly, K. A., M. M. Ivanova, K. A. Riggs, N. S. Wickramasinghe, M. J. Barch and C. M. Klinge (2008). "Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis." Mol Endocrinol **22**(3): 609-622.

Maya, S., T. Prakash, K. D. Madhu and D. Goli (2016). "Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review." Biomed Pharmacother **83**: 746-754.

Mazure, N. M. and J. Pouyssegur (2010). "Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival?" Curr Opin Cell Biol **22**(2): 177-180.

McEwen, B. S. (2001). "Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms." J Appl Physiol (1985) **91**(6): 2785-2801.

McGlynn, L. M., S. Tovey, J. M. Bartlett, J. Doughty, T. G. Cooke and J. Edwards (2013). "Interactions between MAP kinase and oestrogen receptor in human breast cancer." Eur J Cancer **49**(6): 1176-1186.

Mendez, P. and L. M. Garcia-Segura (2006). "Phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase 3 regulate estrogen receptor-mediated transcription in neuronal cells." Endocrinology **147**(6): 3027-3039.

Mihaylova, M. M. and R. J. Shaw (2011). "The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism." Nat Cell Biol **13**(9): 1016-1023.

Miller, W. L. (2017). "Steroidogenesis: Unanswered Questions." Trends Endocrinol Metab **28**(11): 771-793.

Mold, M., E. Shardlow and C. Exley (2016). "Insight into the cellular fate and toxicity of aluminium adjuvants used in clinically approved human vaccinations." Sci Rep **6**: 31578.

Molina, L., C. D. Figueroa, K. D. Bhoola and P. Ehrenfeld (2017). "GPER-1/GPR30 a novel estrogen receptor sited in the cell membrane: therapeutic coupling to breast cancer." Expert Opin Ther Targets **21**(8): 755-766.

Montano, M. M., V. Muller, A. Trobaugh and B. S. Katzenellenbogen (1995). "The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists." Mol Endocrinol **9**(7): 814-825.

Morales-Hernandez, A., M. Corrales-Redondo, J. M. Marcos-Merino, F. J. Gonzalez-Rico, F. J. Sanchez-Martin and J. M. Merino (2016). "AhR-dependent 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in human neuronal cell line SHSY5Y." Neurotoxicology **56**: 55-63.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.

Mosselman, S., J. Polman and R. Dijkema (1996). "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor." *FEBS Lett* **392**(1): 49-53.

Nagasawa, K., J. Akagi, M. Koma, T. Kakuda, K. Nagai, S. Shimohama and S. Fujimoto (2006). "Transport and toxic mechanism for aluminum citrate in human neuroblastoma SH-SY5Y cells." *Life Sci* **79**(1): 89-97.

Namsi, A., T. Nury, H. Hamdouni, A. Yammine, A. Vejux, D. Vervandier-Fasseur, N. Latruffe, O. Masmoudi-Kouki and G. Lizard (2018). "Induction of Neuronal Differentiation of Murine N2a Cells by Two Polyphenols Present in the Mediterranean Diet Mimicking Neurotrophins Activities: Resveratrol and Apigenin." *Diseases* **6**(3).

Nazari, E. and F. Suja (2016). "Effects of 17beta-estradiol (E2) on aqueous organisms and its treatment problem: a review." *Rev Environ Health* **31**(4): 465-491.

Nelson, A. W., A. J. Groen, J. L. Miller, A. Y. Warren, K. A. Holmes, G. A. Tarulli, W. D. Tilley, B. S. Katzenellenbogen, J. R. Hawse, V. J. Gnanapragasam and J. S. Carroll (2017). "Comprehensive assessment of estrogen receptor beta antibodies in cancer cell line models and tissue reveals critical limitations in reagent specificity." *Mol Cell Endocrinol* **440**: 138-150.

Nicholls, C., H. Li and J. P. Liu (2012). "GAPDH: a common enzyme with uncommon functions." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **39**(8): 674-679.

Nilsson, S., S. Makela, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner and J. A. Gustafsson (2001). "Mechanisms of estrogen action." *Physiol Rev* **81**(4): 1535-1565.

Nomura, M., K. S. Korach, D. W. Pfaff and S. Ogawa (2003). "Estrogen receptor beta (ERbeta) protein levels in neurons depend on estrogen receptor alpha (ERalpha) gene expression and on its ligand in a brain region-specific manner." *Brain Res Mol Brain Res* **110**(1): 7-14.

O'Lone, R., M. C. Frith, E. K. Karlsson and U. Hansen (2004). "Genomic targets of nuclear estrogen receptors." *Mol Endocrinol* **18**(8): 1859-1875.

Ogawa, S., S. Inoue, T. Watanabe, H. Hiroi, A. Orimo, T. Hosoi, Y. Ouchi and M. Muramatsu (1998). "The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* **243**(1): 122-126.

Olefsky, J. M. (2001). "Nuclear receptor minireview series." *J Biol Chem* **276**(40): 36863-36864.

Otto, A. M. (2016). "Warburg effect(s)-a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism." *Cancer Metab* **4**: 5.

Panigrahi, D. P., P. P. Praharaj, C. S. Bhol, K. K. Mahapatra, S. Patra, B. P. Behera, S. R. Mishra and S. K. Bhutia (2020). "The emerging, multifaceted role of mitophagy in cancer and cancer therapeutics." *Semin Cancer Biol* **66**: 45-58.

Pankiv, S., T. H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J. A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy and T. Johansen (2007). "p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy." *J Biol Chem* **282**(33): 24131-24145.

Petrovic, S., N. Velickovic, I. Stanojevic, M. Milosevic, D. Drakulic, M. Stanojlovic and A. Horvat (2011). "Inhibition of mitochondrial Na⁺-dependent Ca²⁺ efflux by 17beta-estradiol in the rat hippocampus." *Neuroscience* **192**: 195-204.

Piu, F., A. Aronheim, S. Katz and M. Karin (2001). "AP-1 repressor protein JDP-2: inhibition of UV-mediated apoptosis through p53 down-regulation." *Mol Cell Biol* **21**(9): 3012-3024.

Planey, S. L., R. Kumar and J. A. Arnott (2014). "Estrogen receptors (ERalpha versus ERbeta): friends or foes in human biology?" *J Recept Signal Transduct Res* **34**(1): 1-5.

- Poole, L. P. and K. F. Macleod (2021). "Mitophagy in tumorigenesis and metastasis." Cell Mol Life Sci **78**(8): 3817-3851.
- Princz, A., K. Kounakis and N. Tavernarakis (2018). "Mitochondrial contributions to neuronal development and function." Biol Chem **399**(7): 723-739.
- Prossnitz, E. R. and M. Barton (2011). "The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease." Nat Rev Endocrinol **7**(12): 715-726.
- Prossnitz, E. R. and M. Barton (2014). "Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities." Mol Cell Endocrinol **389**(1-2): 71-83.
- Psarra, A. M. and C. E. Sekeris (2008). "Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment." Biochim Biophys Acta **1783**(1): 1-11.
- Psarra, A. M. and C. E. Sekeris (2008). "Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria." IUBMB Life **60**(4): 210-223.
- Psarra, A. M. and C. E. Sekeris (2009). "Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions." Biochim Biophys Acta **1787**(5): 431-436.
- Psarra, A. M. and C. E. Sekeris (2011). "Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells: role of the mitochondrial glucocorticoid receptor." Biochim Biophys Acta **1813**(10): 1814-1821.
- Psarra, A. M., S. Solakidi and C. E. Sekeris (2006). "The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells." Mol Cell Endocrinol **246**(1-2): 21-33.
- Psarra, A. M., S. Solakidi, I. P. Trougakos, L. H. Margaritis, G. Spyrou and C. E. Sekeris (2005). "Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli." Int J Biochem Cell Biol **37**(12): 2544-2558.
- Revankar, C. M., D. F. Cimino, L. A. Sklar, J. B. Arterburn and E. R. Prossnitz (2005). "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling." Science **307**(5715): 1625-1630.
- Rezzani, R., C. Franco, R. Hardeland and L. F. Rodella (2020). "Thymus-Pineal Gland Axis: Revisiting Its Role in Human Life and Ageing." Int J Mol Sci **21**(22).
- Riboni, L., A. Prinetti, R. Bassi, A. Caminiti and G. Tettamanti (1995). "A mediator role of ceramide in the regulation of neuroblastoma Neuro2a cell differentiation." J Biol Chem **270**(45): 26868-26875.
- Roger, P., M. E. Sahla, S. Makela, J. A. Gustafsson, P. Baldet and H. Rochefort (2001). "Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors." Cancer Res **61**(6): 2537-2541.
- Rudolph, A., C. Toth, M. Hoffmeister, W. Roth, E. Herpel, L. Jansen, A. Marx, H. Brenner and J. Chang-Claude (2012). "Expression of oestrogen receptor beta and prognosis of colorectal cancer." Br J Cancer **107**(5): 831-839.
- Saldanha, C. J. (2020). "Estrogen as a Neuroprotectant in Both Sexes: Stories From the Bird Brain." Front Neurol **11**: 497.
- Saleiro, D., G. Murillo, R. V. Benya, M. Bissonnette, J. Hart and R. G. Mehta (2012). "Estrogen receptor-beta protects against colitis-associated neoplasia in mice." Int J Cancer **131**(11): 2553-2561.
- Samavat, H. and M. S. Kurzer (2015). "Estrogen metabolism and breast cancer." Cancer Lett **356**(2 Pt A): 231-243.
- Santoro, N., R. Worsley, K. K. Miller, S. J. Parish and S. R. Davis (2016). "Role of Estrogens and Estrogen-Like Compounds in Female Sexual Function and Dysfunction." J Sex Med **13**(3): 305-316.

- Scarpulla, R. C. (2006). "Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells." *J Cell Biochem* **97**(4): 673-683.
- Scarpulla, R. C. (2012). "Nucleus-encoded regulators of mitochondrial function: integration of respiratory chain expression, nutrient sensing and metabolic stress." *Biochim Biophys Acta* **1819**(9-10): 1088-1097.
- Scarpulla, R. C., R. B. Vega and D. P. Kelly (2012). "Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis." *Trends Endocrinol Metab* **23**(9): 459-466.
- Scheller, K. and C. E. Sekeris (2003). "The effects of steroid hormones on the transcription of genes encoding enzymes of oxidative phosphorylation." *Exp Physiol* **88**(1): 129-140.
- Schulster, M., A. M. Bernie and R. Ramasamy (2016). "The role of estradiol in male reproductive function." *Asian J Androl* **18**(3): 435-440.
- Schwabe, J. W., L. Chapman, J. T. Finch and D. Rhodes (1993). "The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements." *Cell* **75**(3): 567-578.
- Seifart, K. H. and C. E. Sekeris (1969). "Alpha-amanitin, a specific inhibitor of transcription by mammalian RNA-polymerase." *Z Naturforsch B* **24**(12): 1538-1544.
- Sekeris, C. E. (1990). "The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones." *In Vivo* **4**(5): 317-320.
- Sepuri, N. B. V., P. Tammineni, F. Mohammed and A. Paripati (2017). "Nuclear Transcription Factors in the Mitochondria: A New Paradigm in Fine-Tuning Mitochondrial Metabolism." *Handb Exp Pharmacol* **240**: 3-20.
- Shaw, C. A. (2018). "Aluminum as a CNS and Immune System Toxin Across the Life Span." *Adv Exp Med Biol* **1091**: 53-83.
- Shi, B. and A. Haug (1990). "Aluminum uptake by neuroblastoma cells." *J Neurochem* **55**(2): 551-558.
- Shoham, Z. and M. Schachter (1996). "Estrogen biosynthesis--regulation, action, remote effects, and value of monitoring in ovarian stimulation cycles." *Fertil Steril* **65**(4): 687-701.
- Simmons, L. J., M. C. Surles-Zeigler, Y. Li, G. D. Ford, G. D. Newman and B. D. Ford (2016). "Regulation of inflammatory responses by neuregulin-1 in brain ischemia and microglial cells in vitro involves the NF-kappa B pathway." *J Neuroinflammation* **13**(1): 237.
- Simpkins, J. W., S. H. Yang, S. N. Sarkar and V. Pearce (2008). "Estrogen actions on mitochondria--physiological and pathological implications." *Mol Cell Endocrinol* **290**(1-2): 51-59.
- Simpkins, J. W., K. D. Yi, S. H. Yang and J. A. Dykens (2010). "Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection." *Biochim Biophys Acta* **1800**(10): 1113-1120.
- Simpson, E. R. (2003). "Sources of estrogen and their importance." *J Steroid Biochem Mol Biol* **86**(3-5): 225-230.
- Simpson, E. R., M. Misso, K. N. Hewitt, R. A. Hill, W. C. Boon, M. E. Jones, A. Kovacic, J. Zhou and C. D. Clyne (2005). "Estrogen--the good, the bad, and the unexpected." *Endocr Rev* **26**(3): 322-330.
- Solakidi, S., A. M. Psarra, S. Nikolaropoulos and C. E. Sekeris (2005). "Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece." *Hum Reprod* **20**(12): 3481-3487.
- Solakidi, S., A. M. Psarra and C. E. Sekeris (2005). "Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: localization of ERalpha in the nucleoli and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines." *Biochim Biophys Acta* **1745**(3): 382-392.

- Son, G. and J. Han (2018). "Roles of mitochondria in neuronal development." *BMB Rep* **51**(11): 549-556.
- Song, I. S., Y. J. Jeong, S. H. Jeong, J. E. Kim, J. Han, T. H. Kim and S. W. Jang (2019). "Modulation of Mitochondrial ERbeta Expression Inhibits Triple-Negative Breast Cancer Tumor Progression by Activating Mitochondrial Function." *Cell Physiol Biochem* **52**(3): 468-485.
- Stanojlovic, M., I. Gusevac, I. Grkovic, N. Mitrovic, J. Zlatkovic, A. Horvat and D. Drakulic (2016). "Repeated Estradiol Treatment Attenuates Chronic Cerebral Hypoperfusion-Induced Neurodegeneration in Rat Hippocampus." *Cell Mol Neurobiol* **36**(6): 989-999.
- Strehlow, K., S. Rotter, S. Wassmann, O. Adam, C. Grohe, K. Laufs, M. Bohm and G. Nickenig (2003). "Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen." *Circ Res* **93**(2): 170-177.
- Strom, J. O., A. Theodorsson and E. Theodorsson (2011). "Mechanisms of estrogens' dose-dependent neuroprotective and neurodamaging effects in experimental models of cerebral ischemia." *Int J Mol Sci* **12**(3): 1533-1562.
- Su, C., N. Rybalchenko, D. A. Schreihof, M. Singh, B. Abbassi and R. L. Cunningham (2012). "Cell Models for the Study of Sex Steroid Hormone Neurobiology." *J Steroids Horm Sci* **52**.
- Sun, G., W. Porter and S. Safe (1998). "Estrogen-induced retinoic acid receptor alpha 1 gene expression: role of estrogen receptor-Sp1 complex." *Mol Endocrinol* **12**(6): 882-890.
- Tecalco-Cruz, A. C. and J. O. Ramirez-Jarquín (2017). "Mechanisms that Increase Stability of Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer." *Clin Breast Cancer* **17**(1): 1-10.
- Thomas, C. and J. A. Gustafsson (2011). "The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy." *Nat Rev Cancer* **11**(8): 597-608.
- Tora, L., J. White, C. Brou, D. Tasset, N. Webster, E. Scheer and P. Chambon (1989). "The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions." *Cell* **59**(3): 477-487.
- Totta, P., C. Busonero, S. Leone, M. Marino and F. Acconcia (2016). "Dynamin II is required for 17beta-estradiol signaling and autophagy-based ERalpha degradation." *Sci Rep* **6**: 23727.
- Tremblay, R. G., M. Sikorska, J. K. Sandhu, P. Lanthier, M. Ribocco-Lutkiewicz and M. Bani-Yaghoob (2010). "Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons." *J Neurosci Methods* **186**(1): 60-67.
- Tsialtas, I., A. Georgantopoulos, M. E. Karipidou, F. D. Kalousi, A. G. Karra, D. D. Leonidas and A. G. Psarra (2021). "Anti-Apoptotic and Antioxidant Activities of the Mitochondrial Estrogen Receptor Beta in N2A Neuroblastoma Cells." *Int J Mol Sci* **22**(14).
- Tsialtas, I., V. A. Gorgogietas, M. Michalopoulou, A. Komninou, E. Liakou, A. Georgantopoulos, F. D. Kalousi, A. G. Karra, E. Protopapa and A. G. Psarra (2020). "Neurotoxic effects of aluminum are associated with its interference with estrogen receptors signaling." *Neurotoxicology*.
- Tsialtas, I., V. A. Gorgogietas, M. Michalopoulou, A. Komninou, E. Liakou, A. Georgantopoulos, F. D. Kalousi, A. G. Karra, E. Protopapa and A. G. Psarra (2020). "Neurotoxic effects of aluminum are associated with its interference with estrogen receptors signaling." *Neurotoxicology* **77**: 114-126.
- Tsioras, K., F. Papastefanaki, P. K. Politis, R. Matsas and M. Gaitanou (2013). "Functional Interactions between BM88/Cend1, Ran-binding protein M and Dyrk1B kinase affect cyclin D1 levels and cell cycle progression/exit in mouse neuroblastoma cells." *PLoS One* **8**(11): e82172.
- Tsuchiya, Y., M. Nakajima and T. Yokoi (2005). "Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human." *Cancer Lett* **227**(2): 115-124.

- Valdiglesias, V., C. Costa, V. Sharma, G. Kilic, E. Pasaro, J. P. Teixeira, A. Dhawan and B. Laffon (2013). "Comparative study on effects of two different types of titanium dioxide nanoparticles on human neuronal cells." Food Chem Toxicol **57**: 352-361.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley and C. B. Thompson (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." Science **324**(5930): 1029-1033.
- Varshney, M. K., J. Inzunza, D. Lupu, V. Ganapathy, P. Antonson, J. Ruegg, I. Nalvarte and J. A. Gustafsson (2017). "Role of estrogen receptor beta in neural differentiation of mouse embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(48): E10428-E10437.
- Ventura-Clapier, R., J. Piquereau, V. Veksler and A. Garnier (2019). "Estrogens, Estrogen Receptors Effects on Cardiac and Skeletal Muscle Mitochondria." Front Endocrinol (Lausanne) **10**: 557.
- Vrtacnik, P., B. Ostanek, S. Mencej-Bedrac and J. Marc (2014). "The many faces of estrogen signaling." Biochem Med (Zagreb) **24**(3): 329-342.
- Vucetic-Arsic, S., N. V. Radonjic, M. Jovanovic, V. Selakovic, T. Nikolic, M. Velimirovic, T. Stojkovic, A. Milovanovic, J. Milovanovic and N. D. Petronijevic (2013). "Oxidative stress precedes mitochondrial dysfunction in gerbil brain after aluminum ingestion." Environ Toxicol Pharmacol **36**(3): 1242-1252.
- Wang, B., M. Huang, D. Shang, X. Yan, B. Zhao and X. Zhang (2021). "Mitochondrial Behavior in Axon Degeneration and Regeneration." Front Aging Neurosci **13**: 650038.
- Wang, J., G. R. Sareddy, Y. Lu, U. P. Pratap, F. Tang, K. M. Greene, P. L. Meyre, R. R. Tekmal, R. K. Vadlamudi and D. W. Brann (2020). "Astrocyte-Derived Estrogen Regulates Reactive Astrogliosis and is Neuroprotective following Ischemic Brain Injury." J Neurosci **40**(50): 9751-9771.
- Wang, Y. F., C. C. Li and J. X. Cai (2006). "Aniracetam attenuates H₂O₂-induced deficiency of neuron viability, mitochondria potential and hippocampal long-term potentiation of mice in vitro." Neurosci Bull **22**(5): 274-280.
- Warburg, O. (1956). "On respiratory impairment in cancer cells." Science **124**(3215): 269-270.
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." Science **123**(3191): 309-314.
- Warburg, O. (1956). "[Origin of cancer cells]." Oncologia **9**(2): 75-83.
- Warner, M., B. Huang and J. A. Gustafsson (2017). "Estrogen Receptor beta as a Pharmaceutical Target." Trends Pharmacol Sci **38**(1): 92-99.
- Wei, Y. and J. Huang (2019). "Role of estrogen and its receptors mediated-autophagy in cell fate and human diseases." J Steroid Biochem Mol Biol **191**: 105380.
- Wesley, U. V., J. F. Hatcher and R. J. Dempsey (2015). "Sphingomyelin Synthase 1 Regulates Neuro-2a Cell Proliferation and Cell Cycle Progression Through Modulation of p27 Expression and Akt Signaling." Mol Neurobiol **51**(3): 1530-1541.
- Wiedemann, N. and N. Pfanner (2017). "Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly." Annu Rev Biochem **86**: 685-714.
- Wise, P. M., D. B. Dubal, M. E. Wilson, S. W. Rau, M. Bottner and K. L. Rosewell (2001). "Estradiol is a protective factor in the adult and aging brain: understanding of mechanisms derived from in vivo and in vitro studies." Brain Res Brain Res Rev **37**(1-3): 313-319.
- Wu, P. Y., Y. C. Lin, C. L. Chang, H. T. Lu, C. H. Chin, T. T. Hsu, D. Chu and S. H. Sun (2009). "Functional decreases in P2X7 receptors are associated with retinoic acid-induced neuronal differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells." Cell Signal **21**(6): 881-891.
- Yang, S. H., R. Liu, E. J. Perez, Y. Wen, S. M. Stevens, Jr., T. Valencia, A. M. Brun-Zinkernagel, L. Prokai, Y. Will, J. Dykens, P. Koulen and J. W. Simpkins (2004). "Mitochondrial localization of estrogen receptor beta." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4130-4135.

- Yang, S. H., S. N. Sarkar, R. Liu, E. J. Perez, X. Wang, Y. Wen, L. J. Yan and J. W. Simpkins (2009). "Estrogen receptor beta as a mitochondrial vulnerability factor." J Biol Chem **284**(14): 9540-9548.
- Yang, Z. M., M. F. Yang, W. Yu and H. M. Tao (2019). "Molecular mechanisms of estrogen receptor beta-induced apoptosis and autophagy in tumors: implication for treating osteosarcoma." J Int Med Res **47**(10): 4644-4655.
- Yasar, P., G. Ayaz, S. D. User, G. Gupur and M. Muyan (2017). "Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling." Reprod Med Biol **16**(1): 4-20.
- Yokel, R. A. and P. J. McNamara (2001). "Aluminium toxicokinetics: an updated minireview." Pharmacol Toxicol **88**(4): 159-167.
- Young, J. C., N. J. Hoogenraad and F. U. Hartl (2003). "Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70." Cell **112**(1): 41-50.
- Zhang, G., N. Yanamala, K. L. Lathrop, L. Zhang, J. Klein-Seetharaman and H. Srinivas (2010). "Ligand-independent antiapoptotic function of estrogen receptor-beta in lung cancer cells." Mol Endocrinol **24**(9): 1737-1747.
- Zhang, J. (2013). "Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control." Redox Biol **1**(1): 19-23.
- Zhang, J. Y., F. Zhang, C. Q. Hong, A. E. Giuliano, X. J. Cui, G. J. Zhou, G. J. Zhang and Y. K. Cui (2015). "Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells." Cancer Biol Med **12**(1): 10-22.
- Zhang, L., Y. Ma, M. Liu, Y. Ma and H. Guo (2019). "The effects of various estrogen doses on the proliferation and differentiation of cultured neural stem cells." Gen Physiol Biophys **38**(5): 417-425.
- Zhang, W., S. L. Zhang, X. Hu and K. Y. Tam (2015). "Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target?" Int J Biol Sci **11**(12): 1390-1400.
- Zhou, J. X. and X. Li (2015). Apoptosis in Polycystic Kidney Disease: From Pathogenesis to Treatment. Polycystic Kidney Disease. X. Li. Brisbane (AU).
- Zhuang, Y., J. Xiang, W. Bao, Y. Sun, L. Wang, M. Tan, Y. He and X. Xi (2017). "MDH2 Stimulated by Estrogen-GPR30 Pathway Down-Regulated PTEN Expression Promoting the Proliferation and Invasion of Cells in Endometrial Cancer." Transl Oncol **10**(2): 203-210.



Η ερευνητική εργασία υποστηρίχθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. Υποψηφίων Διδακτόρων» (Αριθμός Υποτροφίας: 1434).

Επιπρόσθετα μέρος της εργασίας αυτής υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «Synthetic Biology: From omics technologies to genomic engineering (OMIC-ENGINE)» (MIS 5002636) που εντάσσεται στη Δράση «Ενίσχυση των Υποδομών Έρευνας και Καινοτομίας» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).

