

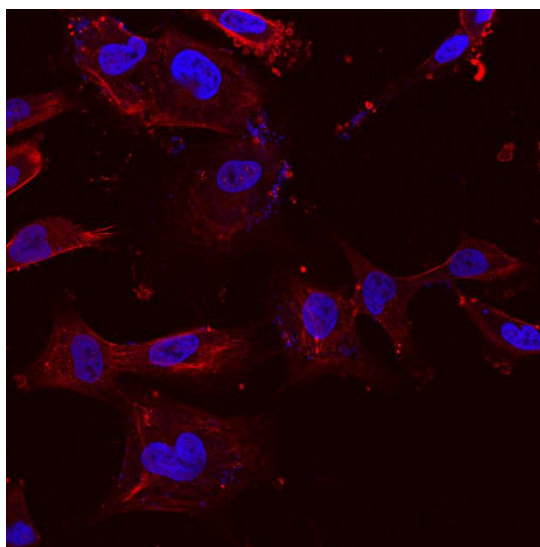


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ  
ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΔΡΑΣΕΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ Hs578T  
ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ



ΜΑΝΟΥΡΑ-ΖΩΝΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΝΟΤΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ (ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ)

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΤΕΡΙΝΟΠΟΥΛΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ (ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ)

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2021

## *Ευχαριστίες*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Γεώργιο Νότα για την ευκαιρία που μου έδωσε να διεκπεραιώσω την πτυχιακή μου εργασία υπό την καθοδήγησή του.

Τον Καθηγητή κύριο Χαράλαμπο Κατερινόπουλο για την αμέριστη στήριξη που έδειξε.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κυρία Μαριλένα Καμπά και τον Ομότιμο Καθηγητή κύριο Ηλία Καστανά, καθώς και τον Καθηγητή κύριο Παναγιώτη Θεοδωρόπουλο και την κυρία Χαρά Πολιουδάκη για τις παρατηρήσεις και τις ιδέες τους, που συνέβαλαν στη διαμόρφωση της παρούσας εργασίας, αλλά και στις γενικότερες επιστημονικές μου γνώσεις.

Όλα τα μέλη του εργαστηρίου Εργαστηριακής Ενδοκρινολογίας και ιδιαίτερος την κυρία Κωνσταντίνα Καλυβιανάκη και τον κύριο Παναγιώτη Μαλάμο για τη μετάδοση της εργαστηριακής τους εμπειρίας και τη φιλία τους από την πρώτη στιγμή.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την συναισθηματική και υλική υποστήριξη όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Εισαγωγή	5
Μαστός	5
Καρκίνος του μαστού	6
Στατιστικά-Παράγοντες κινδύνου-Πρόληψη-Διάγνωση	6
Στάδια καρκίνου του μαστού	7
Βαθμός διαφοροποίησης	9
Μοριακοί τύποι καρκίνου του μαστού	10
Κυτταρική σειρά Hs578T καρκίνου του μαστού	12
Θεραπείες καρκίνου του μαστού	13
Στεροειδείς ορμόνες: ανδρογόνα και οιστρογόνα	14
Υποδοχείς ανδρογόνων και οιστρογόνων	19
Ενδοκυτταρικοί (ή πυρηνικοί) υποδοχείς	19
Υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνη G	24
Υλικά και Μέθοδοι	27
Καλλιέργειες κυττάρων	27
Διεργασίες καλλιέργειών κυττάρων	27
Διάλυμα ενεργού άνθρακα-δεξτράνης ως μέσο δέσμευσης ελεύθερων στεροειδών ορμονών	31
Ανίχνευση υποδοχέων ανδρογόνων και οιστρογόνων στα κύτταρα Hs578T	32
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	32
Έμμεσος ανοσοφθορισμός	42
Μελέτη επιδράσεων ανδρογόνων και οιστρογόνων στα κύτταρα Hs578T	45
Μελέτη ρυθμού πολλαπλασιασμού	45
Αποτελέσματα	48
Συμπεράσματα	54
Συζήτηση	56
Βιβλιογραφία	58

## *Περίληψη*

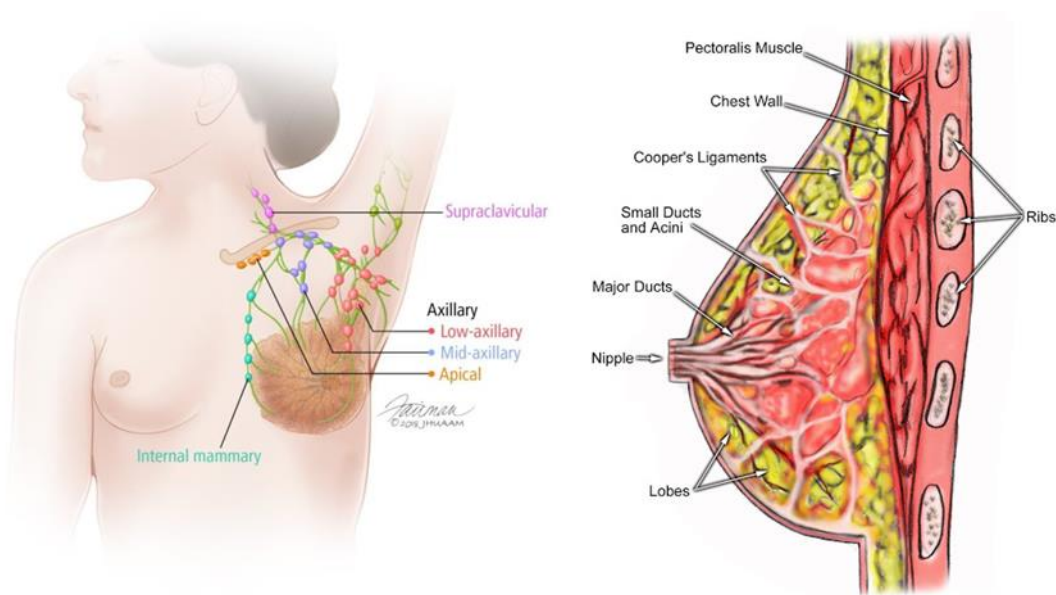
Ο καρκίνος του μαστού πλήττει μεγάλο μέρος του γυναικείου πληθυσμού. Στη διάγνωση με τριπλώς αρνητικό τύπο καρκίνου του μαστού, δηλαδή αρνητικού για κλασικό υποδοχέα οιστρογόνων, προγεστερόνης και πρωτεΐνης HER2, υπάρχει δυσμενής πρόγνωση για την επιβίωση της ασθενούς, τόσο λόγω της επιθετικότητάς του, όσο και λόγω των περιορισμένων θεραπειών του. Η ανακάλυψη, ωστόσο, τα τελευταία χρόνια νέων μορίων με ικανότητα πρόσδεσης οιστρογόνων και ανδρογόνων υποδεικνύει ότι υπάρχουν αρκετές ανεξερεύνητες πτυχές για την κατανόηση του τρόπου λειτουργίας αυτών των μορίων στον καρκίνο του μαστού. Η χρήση τριπλώς αρνητικών κυτταρικών σειρών, εκτός από την μελέτη των μηχανισμών αυτού του τύπου καρκίνου, επιτρέπει την πιο καθαρή μελέτη των φαινομένων που ρυθμίζουν τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα. Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία έχει ως τελικό στόχο την ανάλυση της έκφρασης και της κυτταρικής κατανομής αυτών των νέων υποδοχέων ορμονών του φύλου στην τριπλώς αρνητική κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού Hs578T, καθώς και στην εξερεύνηση πιθανής επιρροής των επιδράσεων των ορμονών αυτών στο ρυθμό πολλαπλασιασμού της.

## Εισαγωγή

### ΜΑΣΤΟΣ

Ο μαστός βρίσκεται στο πρόσθιο θωρακικό τοίχωμα του ανθρώπινου σώματος. Αναπτύσσεται περαιτέρω στις γυναίκες κατά τη διάρκεια της εφηβείας. Αποτελείται από τον μαστικό αδένα και το περιμαστικό λίπος.

Στον μαστικό αδένα βρίσκονται οι αδενοκυψέλες, κύτταρα τα οποία παράγουν το γάλα κατά τη λοχεία. Μαζί με τον ενδιάμεσο λιπώδη ιστό αποτελούν τα λόβια, τα οποία σχηματίζουν ομάδες, τους λοβούς. Το γάλα μεταφέρεται μέσω των γαλακτοφόρων πόρων στη θηλή, όπου σχηματίζονται οι γαλακτοφόροι κόλποι, και εκκρίνεται προς τα έξω.<sup>1</sup> Ο μαστικός αδένας στηρίζεται από τον σύνδεσμο του Cooper, ίνες που χωρίζουν τους λοβούς και τον συνδέουν με το δέρμα.<sup>2,3</sup> Γύρω και πάνω από τον μαστικό αδένα βρίσκονται οι λεμφαδένες.



Εικόνα 1 Η εικόνα αριστερά<sup>4</sup> αναπαριστά τους λεμφαδένες που συνδέονται με τον μαστό, τον έσω μαστικό αδένα (*Internal mammary*), τους μασχαλιαίους (*axillary*), τον υπερκλείδιο (*supraclavicular*) και τον κορυφαίο (υποκλείδιο) (*apical*). Δεξιά<sup>5</sup> περιγράφεται ο μαστικός αδένας με τη θηλή (*nipple*), τους λοβούς (*lobes*), το σύνδεσμο του Cooper (*Cooper's ligaments*) και τους γαλακτοφόρους πόρους (*ducts*).

Η ανάπτυξη και λειτουργία του μαστού καθορίζεται από τα οιστρογόνα, την προγεστερόνη και άλλες ορμόνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διαφοροποίηση των γυναικείων μαστών από τους ανδρικούς, ενώ επηρεάζουν τους αδένες ανάλογα με τα διάφορα στάδια της ζωής και του καταμήνιου κύκλου της γυναίκας.<sup>3</sup>

## ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

### ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ - ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ - ΠΡΟΛΗΨΗ - ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο καρκίνος του μαστού είναι το πιο συχνός είδος καρκίνου στις γυναίκες. Κάθε χρόνο πάνω από δυο εκατομμύρια γυναίκες διαγιγνώσκονται με καρκίνο του μαστού, ενώ σε αυτόν οφείλεται το 15% των θανάτων από καρκίνο το 2018.<sup>6</sup> Από καρκίνο του μαστού νοσούν και άνδρες σε αρκετά μικρότερη συχνότητα.<sup>7</sup>

Παράγοντες που μπορεί να αυξήσουν την πιθανότητα νόσου είναι η ηλικία, η λήψη ορμονών ως φαρμακευτική αγωγή και προηγούμενες θεραπείες με ακτινοβολία. Το αναπαραγωγικό ιστορικό φαίνεται να έχει επίσης αξιοσημείωτο ρόλο, αφού όσο μεγαλύτερο το διάστημα μεταξύ πρώτης εμμήνου ρύσης και αρχής της εμμηνόπαυσης, τόσο μεγαλύτερη η επίδραση των ορμονών στον οργανισμό, άρα και μεγαλύτερος κίνδυνος για εμφάνιση καρκίνου. Ωστόσο, η εγκυμοσύνη πριν την ηλικία των τριάντα ετών και η γαλουχία έχουν συνδεθεί με μειωμένη πιθανότητα νόσου. Εξίσου σημαντικός παράγοντας είναι και το οικογενειακό ιστορικό, ειδικά οι κληρονομούμενες μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2.<sup>7</sup>

Η σωστή πρόληψη μπορεί να οδηγήσει σε διάγνωση του καρκίνου στα αρχικά του στάδια και να αυξήσει τις πιθανότητες επιβίωσης. Η απλούστερη μέθοδος πρόληψης είναι η αυτό-εξέταση και η παρατήρηση για ανησυχητικές αλλαγές, όπως μάζες στο μαστό ή στη μασχάλη μετά από ψηλάφηση, πόνο, οίδημα ή έκκριμα εκτός του γάλακτος κατά την περίοδο θηλασμού. Κατ' επέκταση, η διάγνωση πρέπει να γίνεται σε κλινικό

επίπεδο με ψηλάφηση από εξειδικευμένο ιατρικό προσωπικό, μαστογραφία, υπέρηχο μαστού ή και μαγνητική τομογραφία μαστών<sup>7</sup>.

#### ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Τα στάδια του καρκίνου του μαστού διακρίνονται με βάση το κατά πόσο ο καρκινικός όγκος είναι εντοπισμένος στο σημείο από όπου ξεκίνησε ή έχει προχωρήσει και σε άλλα σημεία του σώματος.

Η ταξινόμηση αυτή είναι γνωστή και ως TNM,<sup>8,9</sup> ακρωνύμιο για τα:

**T:** Tumor = Σταδιοποίηση μεγέθους αρχικού όγκου.

**N:** Node = Σταδιοποίηση επιχώριων λεμφαδένων. Εξάπλωση του καρκίνου στους λεμφαδένες.

**M:** Metastasis = Σταδιοποίηση απομακρυσμένων μεταστάσεων. Εξάπλωση του καρκίνου σε άλλα σημεία του σώματος.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται ο διαχωρισμός των τριών αυτών σταδίων σε επιμέρους κατηγορίες.

T (Tumor)	Tx	Μέγεθος όγκου που δεν μπορεί να προσδιοριστεί
	Tis	Καρκίνωμα <i>in situ</i>
	T1	Όγκος μεγέθους κάτω των 2cm
	T2	Όγκος μεγέθους μεταξύ 2cm και 5cm
	T3	Όγκος μεγέθους μεγαλύτερου των 5cm
	T4	Όγκος που επεκτείνεται στο θωρακικό τοίχωμα ή στο δέρμα του μαστού
N (Nodes)	Nx	Η ύπαρξη όγκου στους επιχώριους λεμφαδένες δεν μπορεί να προσδιοριστεί
	N0	Απουσία όγκου στους επιχώριους λεμφαδένες
	N1	Μετάσταση σε κινητούς σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες
	N2	Μετάσταση στους σύστοιχους μασχαλιαίους λεμφαδένες που σχηματίζει συσσωματώματα ή έχει διηθήσει παρακείμενες δομές

	N3	Μετάσταση σε ομόπλευρους υποκλείδιους ή υπερκλείδιους ή σε ομόπλευρους έσω μαστικούς λεμφαδένες και στους μασχάλιους λεμφαδένες
M (Metastasis)	M0	Απουσία μεταστάσεων σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος
	M1	Ύπαρξη μεταστάσεων σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος

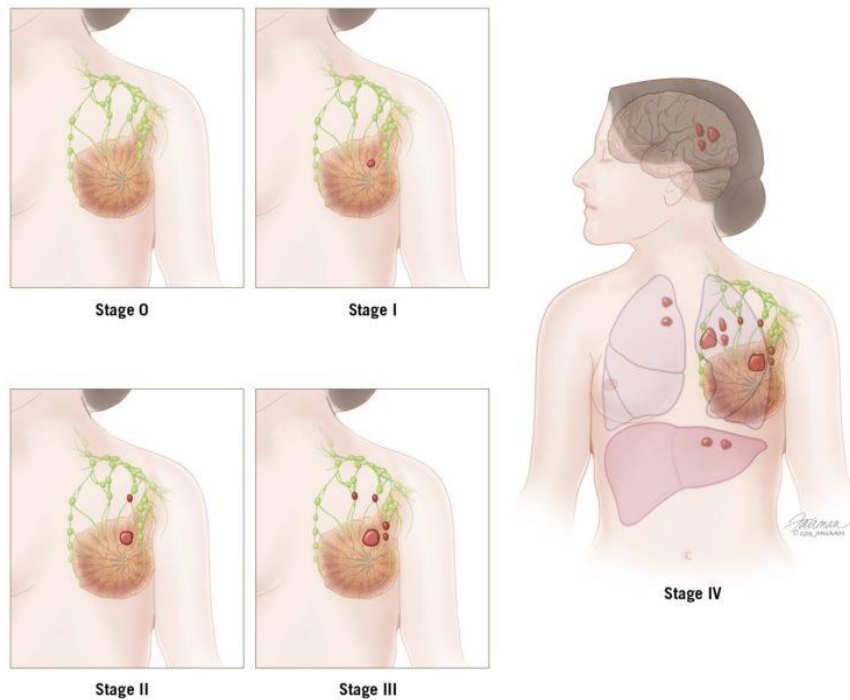
*Πίνακας 1 Σύστημα TNM για την κατάταξη του καρκίνου του μαστού. Το σύστημα περιλαμβάνει επιπλέον υποκατηγορίες όγκων, ανάλογα με κάποια πιο συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των όγκων.*

Η σταδιοποίηση<sup>10</sup>, με βάση τους συνδυασμούς του συστήματος TNM, γίνεται ως εξής:

Στάδιο	Στάδιο T	Στάδιο N	Στάδιο M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T0,T1	N1*	M0
IIA	T0,T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0,T1,T2	N2	M0
IIIB	T3	N1,N2	M0
IIIC	Οποιοδήποτε T	N3	M0
IV	Οποιοδήποτε T	Οποιοδήποτε N	M1

*Πίνακας 2 Στάδια καρκίνου του μαστού με βάση τους συνδυασμούς της κατηγοριοποίησης TNM. \*με όγκο μεγαλύτερο των 0,2mm ή/και περισσότερων από 200 κότταρα και μικρότερο των 2,0mm.*





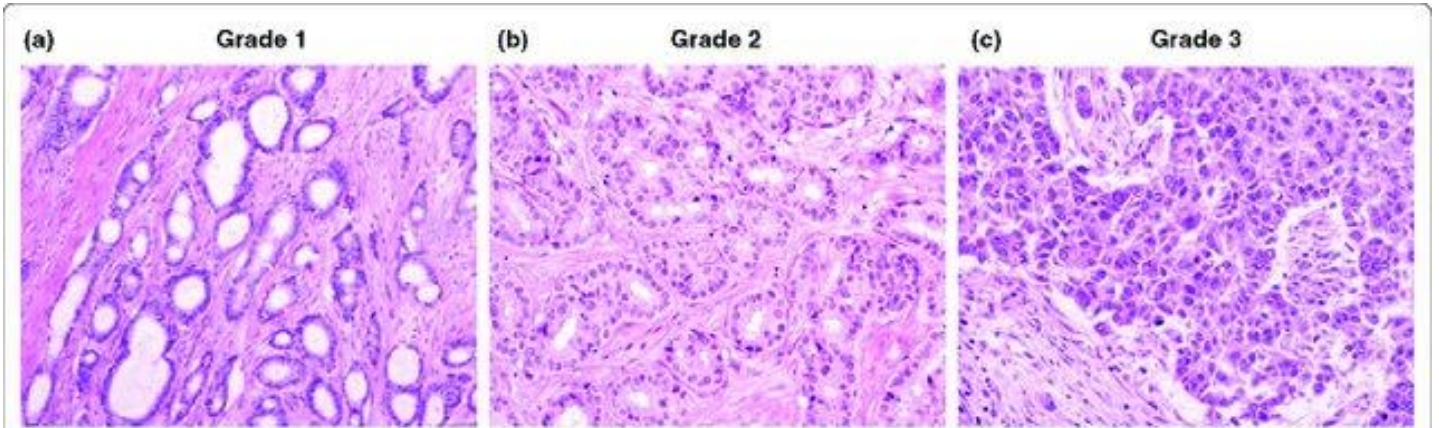
Εικόνα 2 Τα στάδια του καρκίνου το μαστού.<sup>5</sup> Στα στάδια 0 και I ο όγκος βρίσκεται στον μαστό, στα στάδια II και III εμφανίζεται και στους λεμφαδένες ενώ στο στάδιο IV έχει γίνει μετάσταση σε άλλα όργανα.

## ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ο βαθμός διαφοροποίησης<sup>11,12</sup> δείχνει κατά πόσο έχουν διαφοροποιηθεί τα φυσιολογικά κύτταρα του μαστού, οπότε προκύπτουν οι εξής κατηγορίες:

- Υψηλού βαθμού διαφοροποίηση (Grade 1): Καρκινικά κύτταρα με σχετικά φυσιολογική όψη. Ο πολλαπλασιασμός τους είναι αργός και η διασπορά τους μικρή, συνεπώς η πρόγνωση για τον ασθενή είναι καλύτερη.
- Μεσαίου βαθμού διαφοροποίηση (Grade 2): Καρκινικά κύτταρα με χαρακτηριστικά ανάμεσα σε χαμηλού και υψηλού βαθμού διαφοροποίηση.

- ο Χαμηλού βαθμού διαφοροποίηση (Grade 3): Καρκινικά κύτταρα με μη φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Ο πολλαπλασιασμός τους είναι ταχύς και η διασπορά τους έντονη, συνεπώς η πρόγνωση για τον ασθενή είναι κακή.



Εικόνα 3 Ιστολογική εικόνα των βαθμών διαφοροποίησης του καρκίνου του μαστού<sup>68</sup>.

## ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ο καρκίνος του μαστού ταξινομείται ανάλογα με την ιστολογική, κλινική και μοριακή εικόνα του. Η κατηγοριοποίηση αυτή καταδεικνύει την κατάλληλη θεραπεία.

Στην συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία είναι σημαντικό να αναφερθεί ο τρόπος της μοριακής ταξινόμησης, καθώς σε αυτήν βασίζεται το αντικείμενο μελέτης.

Τα κριτήρια μοριακής ταξινόμησης είναι η έκφραση ή μη κλασικών υποδοχέων οιστρογόνων, υποδοχέων προγεστερόνης και της πρωτεΐνης HER2. Άλλο χαρακτηριστικό είναι τα επίπεδα της πρωτεΐνης Ki-67, που σχετίζεται με τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.

Οι μοριακοί τύποι καρκίνου του μαστού<sup>12-14</sup> διακρίνονται στους:

Αυλικού τύπου A (Luminal A)

Θετικός για τον κλασικό υποδοχέα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, αρνητικός για υποδοχέα της πρωτεΐνης HER2 και διαθέτει χαμηλά επίπεδα Ki-67. Η διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών είναι χαμηλή και ο πολλαπλασιασμός τους αργός.

Αυλικού τύπου B (Luminal B)

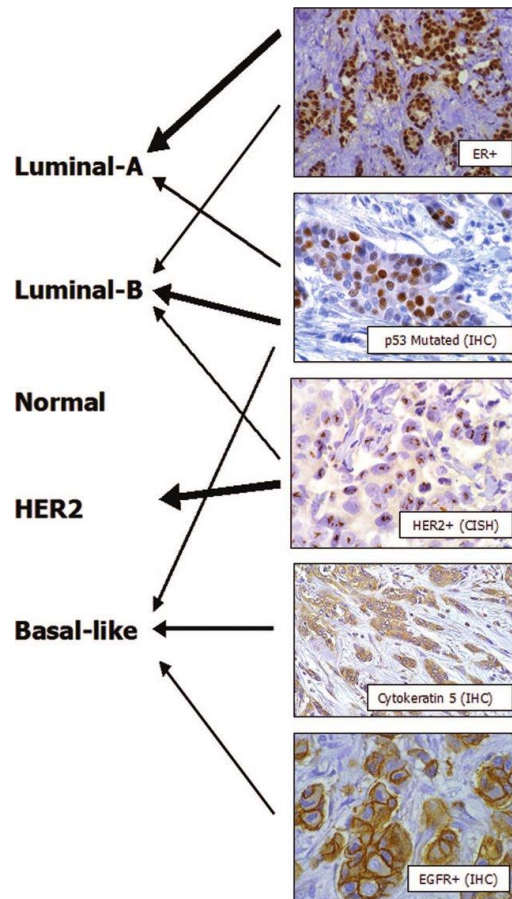
Θετικός για τον κλασικό υποδοχέα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης. Θετικός ή αρνητικός για υποδοχέα της πρωτεΐνης HER2. Διαθέτει υψηλά επίπεδα Ki-67. Η διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών είναι χαμηλή και ο πολλαπλασιασμός τους ελαφρώς ταχύτερος από τα αυλικού τύπου A.

Τριπλώς Αρνητικά/Βασικού τύπου (Triple Negative/Basal-like)

Αρνητικός για τον κλασικό υποδοχέα των οιστρογόνων, προγεστερόνης και για υποδοχέα της πρωτεΐνης HER2.

Υπερέκφρασης σε HER2 (HER2-enriched)

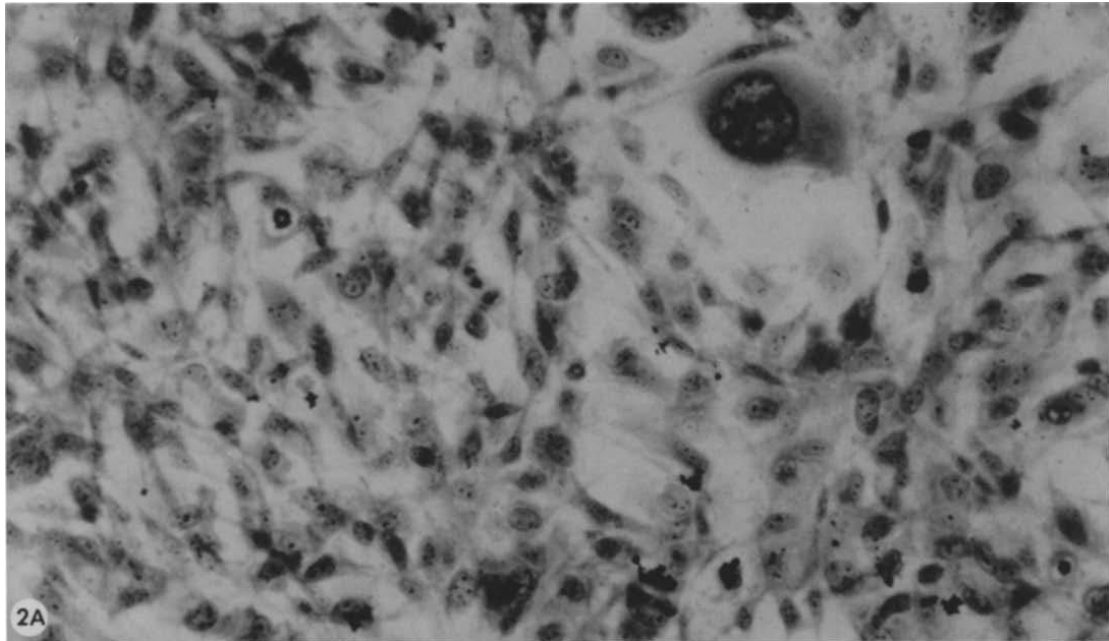
Αρνητικός για τον κλασικό υποδοχέα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης. Θετικός για υποδοχέα της πρωτεΐνης HER2. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων αυτών είναι ταχύτερος από τα αυλικού τύπου A.



Εικόνα 4 Ανοσοϊστοχημεία των μοριακών τύπων του καρκίνου του μαστού<sup>15</sup>.

## ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ Hs578T ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Η κυτταρική σειρά Hs578T απομονώθηκε το 1977 από 74χρονη καυκάσια ασθενή.<sup>16</sup> Προέρχεται από διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστικού αδένου,<sup>17</sup> που σημαίνει ότι η καρκινογένεση ξεκίνησε στο επιθήλιο των γαλακτοφόρων πόρων του μαστού και κατόπιν εξαπλώθηκε σε άλλα σημεία του ιστού. Ανήκει στην κατηγορία του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (Triple Negative Breast Cancer, TBNC)<sup>18</sup>, δηλαδή τα κύτταρα δεν εκφράζουν τον κλασικό υποδοχέα των οιστρογόνων (Estrogen Receptor, ER), τον υποδοχέα της προγεστερόνης και τον υποδοχέα της πρωτεΐνης HER2.<sup>18</sup>



*Εικόνα 5 Hs578T<sup>16</sup>.*

## ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Μετά τη διάγνωση του καρκίνου επιλέγεται, ανάλογα με το είδος και το στάδιό του, καθώς και τη συνολική υγεία της ασθενούς, η θεραπεία. Οι θεραπείες χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, τις τοπικές (χειρουργική επέμβαση και ακτινοθεραπεία) και τις συστηματικές (ορμονική θεραπεία και χημειοθεραπεία)<sup>19</sup>. Αναλυτικότερα, ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων και την έλλειψη ή μη συγκεκριμένων υποδοχέων, οι τρόποι αντιμετώπισης καρκίνου του μαστού ποικίλουν. Παραδείγματος χάριν, σε καρκινικά κύτταρα μαστού θετικά σε υποδοχείς οιστρογόνων και αρνητικά σε HER2, προτιμάται ορμονική θεραπεία με την χορήγηση είτε ανταγωνιστών των οιστρογόνων (ταμοξιφένη), είτε αναστολέων της αρωματάσης (λετροζόλη, αναστροζόλη ή εξεμεστάνη), του ενζύμου που καταλύει την μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα<sup>20</sup>. Αφότου τα κύτταρα αναπτύξουν αντίσταση στην ορμονική θεραπεία, ή εάν δεν ανταποκρίνονται σε αυτήν λόγω έλλειψης των αντίστοιχων υποδοχέων (τριπλώς αρνητικός καρκίνος του μαστού), χορηγούνται χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, των οποίων η δράση βασίζεται στην

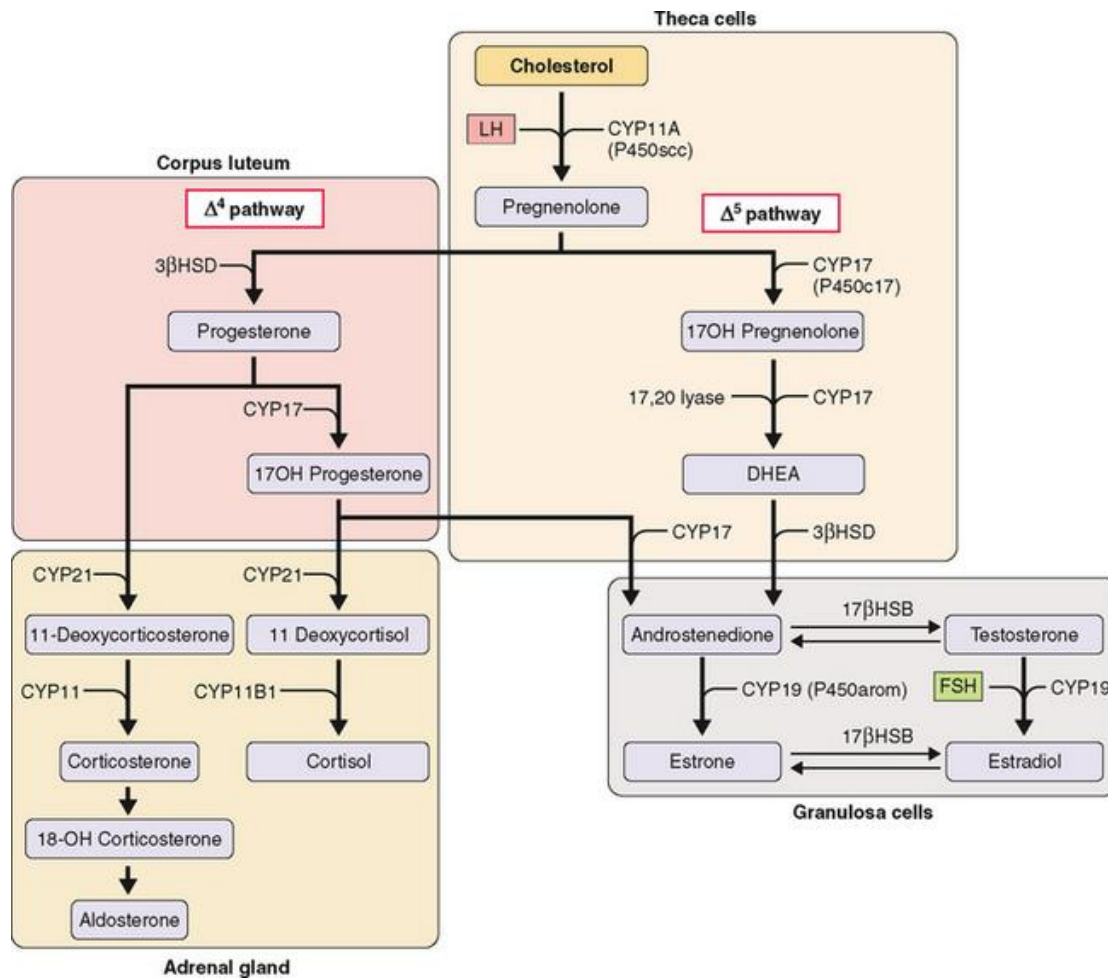
κυτταροτοξικότητα. Συχνά οι μη μεταστατικοί τριπλά αρνητικοί όγκοι υπόκεινται σε προεγχειρητική χημειοθεραπεία και κατόπιν σε χειρουργική αφαίρεση.<sup>21</sup>

## ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ: ΑΝΔΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

Τα στεροειδή είναι τερπενοειδή λιπίδια με τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων. Στο ανθρώπινο σώμα η σύνθεσή τους λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων των ενδοκρινών αδένων, με πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη.

Τα στεροειδή είναι ιδιαίτερα ισχυρά μόρια, καθώς σε μικρές ποσότητες καταφέρνουν να προκαλέσουν αλλαγές στη φυσιολογία του σώματος ή να ενεργοποιήσουν κάποια μεταβολική διαδικασία, σε οποιοδήποτε σημείο του οργανισμού. Μεταφέρονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, συνδεδεμένα με ειδικές πρωτεΐνες και λειτουργούν ως χημικοί αγγελιοφόροι και ρυθμιστές.<sup>22,23</sup>

Οι στεροειδείς ορμόνες διακρίνονται σε γεννητικές και κορτικοειδείς ανάλογα με τον αδένα στον οποίο παράγονται. Κατατάσσονται σε υποκατηγορίες ανάλογα με την λειτουργία τους.



Εικόνα 6 Σχεδιάγραμμα της βιοσύνθεσης των στεροειδών ορμονών από χοληστερόλη<sup>24</sup>.

Οι γεννητικές ορμόνες χωρίζονται σε ανδρογόνα, οιστρογόνα και στις προγεστίνες.<sup>22</sup> Εξυπηρετούν την ανάπτυξη των ιστών και την αναπαραγωγή. Ειδικότερα:

- Ανδρογόνα: υπεύθυνα για την ανάπτυξη του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος του εμβρύου κατά τη διάρκεια της κύησης και για τα δευτερεύοντα ανδρικά χαρακτηριστικά. Εκκρίνονται από τους όρχεις, τις ωθήκες και σε μικρότερο βαθμό από τα επινεφρίδια.
- Οιστρογόνα: υπεύθυνα για την ανάπτυξη του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος του εμβρύου κατά τη διάρκεια της κύησης και για τα δευτερεύοντα γυναικεία χαρακτηριστικά.

Εκκρίνονται από τις ωθήκες, τους μαστούς, τους όρχεις και σε μικρότερο βαθμό από τα επινεφρίδια και άλλους ιστούς.

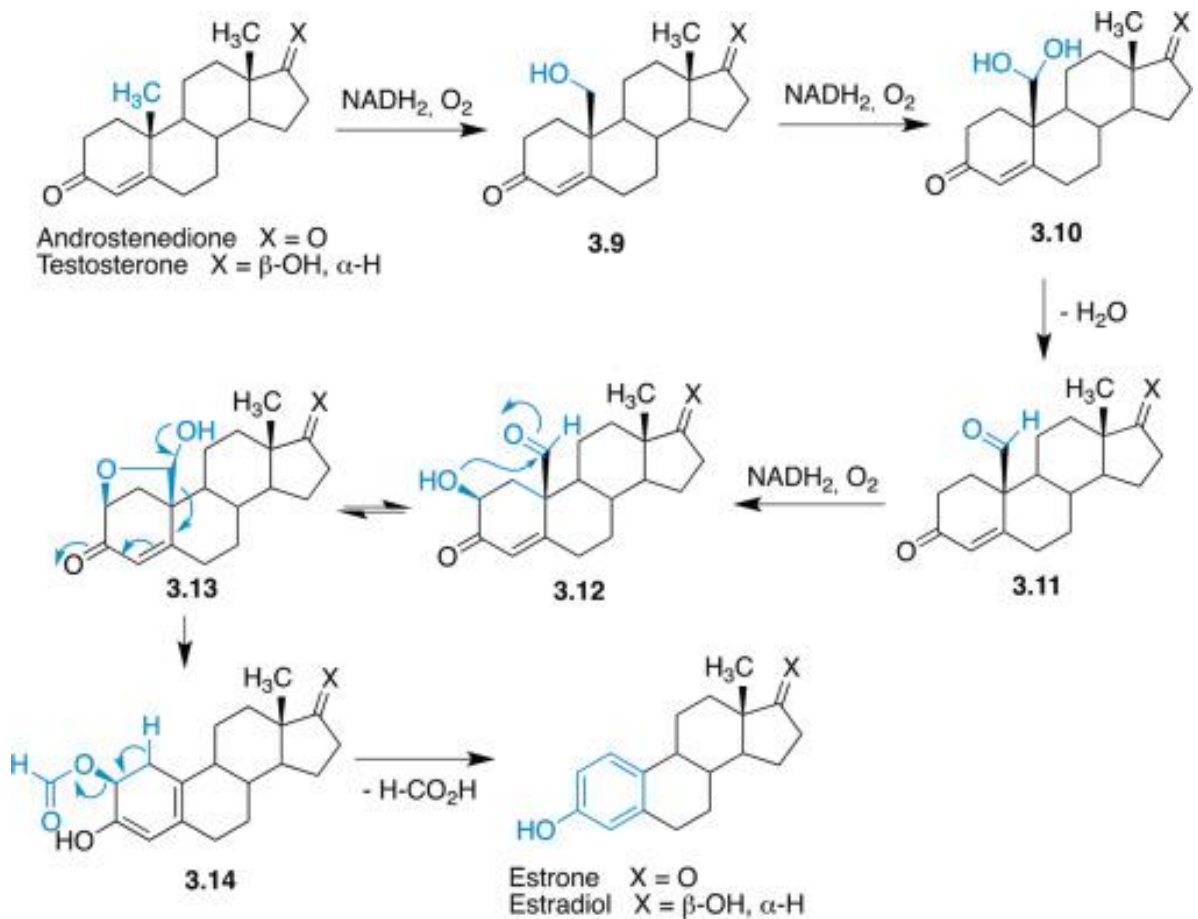
- Προγεστίνες: υπεύθυνες για την προετοιμασία του οργανισμού για την διαδικασία της κύησης. Παράγονται από τις ωθήκες και σε μικρότερο βαθμό από τα επινεφρίδια.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιούνται οι επιδράσεις του οιστρογόνου 17β-οιστραδιόλη (E2), και των ανδρογόνων διϋδροτεστοστερόνη (DHT) και του τεχνητού συμπλόκου τεστοστερόνης-αλβουμίνης (Testorenone-BSA).

#### 17β-Οιστραδιόλη (E2)

Η 17β-οιστραδιόλη (E2) αποτελεί οιστρογόνο, το οποίο προέρχεται είτε από την επεξεργασία της τεστοστερόνης από την αρωματάση είτε από την επεξεργασία της οιστρονής από την 17β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογονάση.

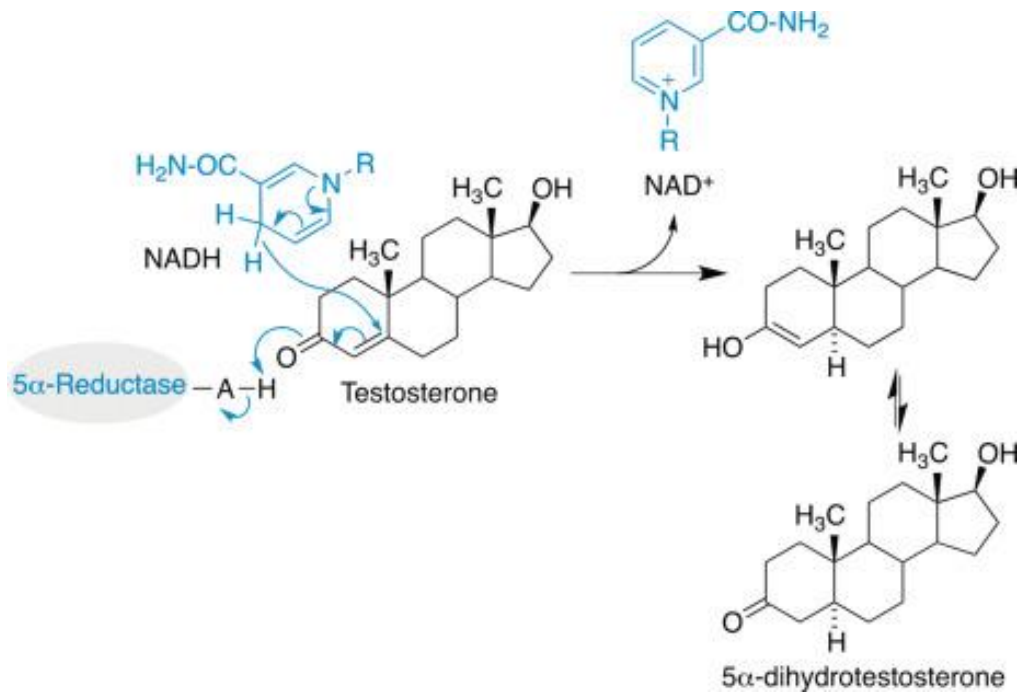




Εικόνα 7 Ο μηχανισμός της ενζυματικής μετατροπής της ανδροστερόνης και της τεστοστερόνης σε οιστρόνη και οιστραδιόλη<sup>25</sup>.

### Διυδροτεστοστερόνη (DHT)

Η διυδροτεστοστερόνη (DHT) είναι ανδρογόνο, προϊόν της επεξεργασίας της τεστοστερόνης από το ένζυμο 5α-αναγωγάση. Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα σε διάφορους ιστούς του σώματος και είναι η προσθήκη υδρογόνου στο διπλό δεσμό της τεστοστερόνης παρουσία NADPH.<sup>26</sup>



Εικόνα 8 Ο μηχανισμός της ενζυματικής μετατροπής της τεστοστερόνης σε διϋδροτεστοστερόνη<sup>25</sup>.

### Σύμπλοκο τεστοστερόνης-αλβουμίνης (Testosterone-BSA)

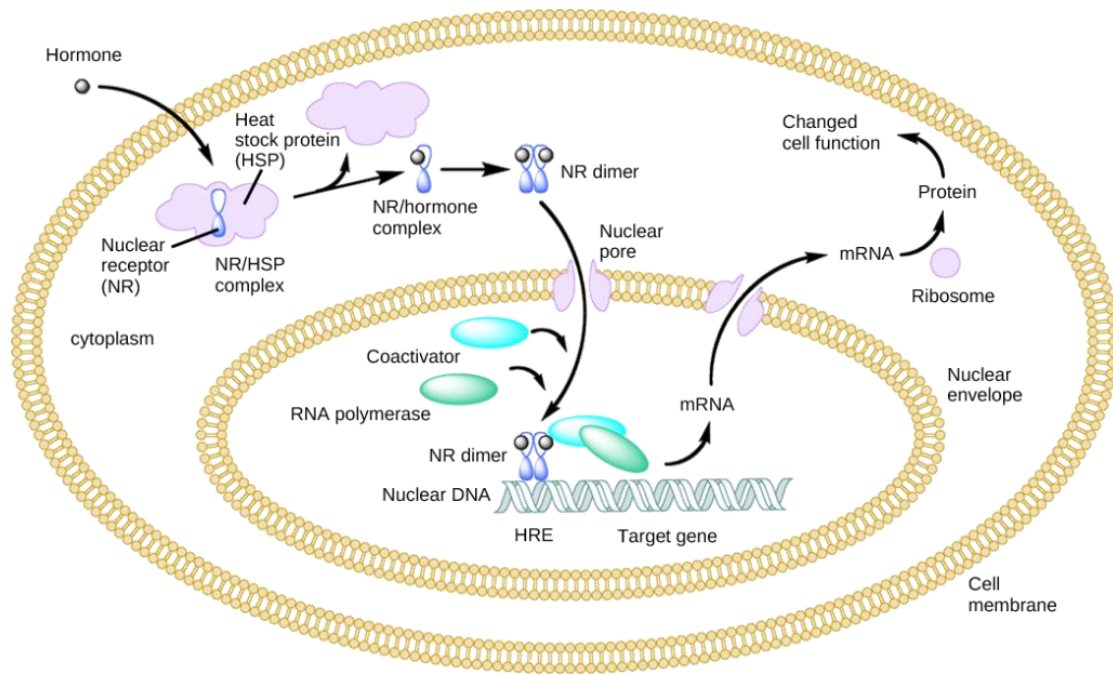
Το σύμπλοκο τεστοστερόνης-BSA είναι μια τεχνητή ένωση, αποτελούμενη από ένα μόριο αλβουμίνης ορού βοδιού (Bovine Serum Albumin, BSA) συνδεδεμένη με δέκα μόρια τεστοστερόνης. Χρησιμοποιείται πειραματικά για τη μελέτη της δράσης της τεστοστερόνης σε υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς λόγω του όγκου της δεν εισέρχεται μέσα στο κύτταρο κι έτσι μπορεί να προσδεθεί μόνο σε μεμβρανικούς υποδοχείς.

## ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Η δράση των στεροειδών ορμονών γίνεται μέσω ειδικών πρωτεϊνών, των υποδοχέων των κυττάρων. Η ένωση υποδοχέα-ένωσης πυροδοτεί μια σειρά από κινήσεις που μπορεί να επηρεάσει διάφορες λειτουργίες του κυττάρου. Οι υποδοχείς των οποίων η ύπαρξη και η λειτουργία μελετάται σε αυτήν την πτυχιακή εμπίπτουν σε δυο κατηγορίες, τους ενδοκυτταρικούς και τους συζευγμένους με πρωτεΐνη G.

### Ενδοκυτταρικοί (ή Πυρηνικοί) Υποδοχείς (Nuclear Receptors)

Οι ενδοκυτταρικοί ή πυρηνικοί υποδοχείς βρίσκονται εντός του κυττάρου, συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins-hsp), συχνότερα την hsp90, οι οποίες διαμορφώνουν τη δομή τους έτσι ώστε να διευκολύνουν τη μετέπειτα σύνδεσή τους με προσδέτες.<sup>27</sup> Όταν μόρια, όπως οι στεροειδείς ορμόνες, διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, συνδέονται με τους αντίστοιχους υποδοχείς στο κυτταρόπλασμα. Έτσι, πρωτεΐνες θερμικού σοκ απελευθερώνονται από τους υποδοχείς στο κυτταρόπλασμα, το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτη μεταβαίνει στον πυρήνα, διμερίζεται και συνδέεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, τα σημεία απόκρισης ορμόνης (hormone response elements). Κατά συνέπεια, επηρεάζεται η μεταγραφή κάποιων γονιδίων, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερη ή μικρότερη παραγωγή ορισμένων πρωτεϊνών.<sup>28</sup>



Εικόνα 9 Η λειτουργία των πυρηνικών υποδοχέων αφότου συνδεθούν με τις αντίστοιχες στεροειδείς ορμόνες<sup>29</sup>.

Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να δράσουν και με διαφορετικό τρόπο. Είναι πιθανό οι υποδοχείς αυτοί να εντοπιστούν και στην κυτταρική μεμβράνη, ενδεχομένως μέσω παλμιτοϋλίωσης, αντίδρασης που αλλάζει τον βαθμό υδροφοβικότητας του μορίου επιτρέποντάς του να εγκαθίσταται μεμβρανικά, και μέσω της δέσμευσης, ανάλογα της φύσης του υποδοχέα, τόσο οιστρογόνων, όσο και ανδρογόνων, να πυροδοτήσουν μονοπάτια που μπορούν να επηρεάσουν την γονιδιακή έκφραση.<sup>30,31</sup>

Οι πυρηνικοί υποδοχείς αποτελούνται από πέντε λειτουργικές περιοχές (domains):<sup>27,28</sup>

- Λειτουργική περιοχή A-B: Αμινο-τελικό άκρο του υποδοχέα. Περιλαμβάνει τη λειτουργία ενεργοποίησης 1 (AF-1).
- Λειτουργική περιοχή C: Σημείο σύνδεσης αλληλουχίας DNA (DNA Binding Domain - DBD).
- Λειτουργική περιοχή D: Συνδετική περιοχή (Hinge).

- Λειτουργική περιοχή E: Σημείο σύνδεσης προσδέτη (Ligand Binding Domain - LBD). Περιλαμβάνει τη λειτουργία ενεργοποίησης 2 (AF-2).
- Λειτουργική περιοχή F: Καρβοξυ-τελικό άκρο του υποδοχέα.

### Nuclear Receptor Structure



DBD: DNA binding domain  
 LBD: Ligand binding domain  
 AF-1: Activation function 1  
 AF-2: Activation function 2

Εικόνα 10 Οι λειτουργικές περιοχές των πυρηνικών υποδοχέων.<sup>32</sup>

Πυρηνικοί υποδοχείς είναι ο κλασικός υποδοχέας των ανδρογόνων και οι κλασικοί υποδοχείς των οιστρογόνων.

ERα (Estrogen Receptor alpha)

Ο υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου α (ERα) είναι ο πρώτος υποδοχέας οιστρογόνων που ανακαλύφθηκε.<sup>33</sup> Εκφράζεται σε πληθώρα ιστών, όπως του αναπαραγωγικού συστήματος, αλλά και στο ήπαρ και στα οστά.<sup>34</sup>

Στον καρκίνο του μαστού παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στόχος κάποιας ενδοκρινικής θεραπείας.<sup>35</sup> Στον τριπλώς αρνητικό καρκίνο του μαστού δεν εκφράζεται.

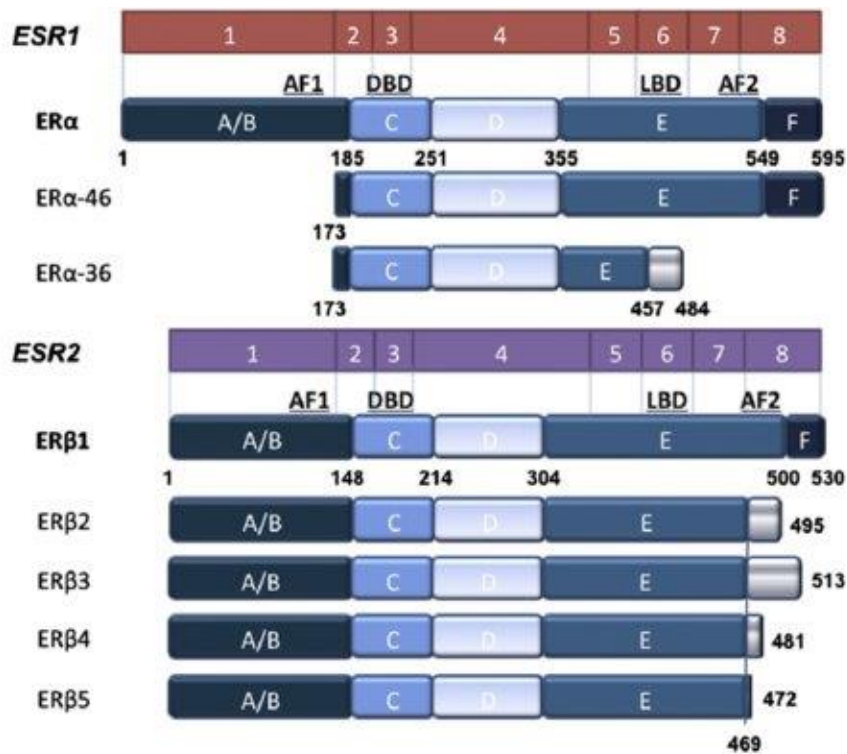
## ERβ (Estrogen Receptor beta)

Ο υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου β (ERβ) διαφέρει του ERα, καθώς προέρχονται από διαφορετικά γονίδια, ωστόσο παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα στα σημεία σύνδεσης αλληλουχίας DNA και προσδέτη.<sup>36</sup>

Γενικά, ο ρόλος του δεν είναι ιδιαίτερα ξεκάθαρος, αφού σε κάποιες περιπτώσεις δείχνει να σχετίζεται με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ενώ σε άλλες το αντίθετο<sup>37</sup> ανάλογα με το είδος του καρκίνου ή εάν συνυπάρχει με τον ERα. Φαίνεται να εκφράζεται σε κυτταρικές σειρές αρνητικές σε ERα.<sup>37</sup> ενώ έχει συσχετισθεί με κακή πρόγνωση.<sup>36</sup>

## ERα36 (Estrogen Receptor alpha 36)

Ο υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου α36 (ERα36) αποτελεί ισομορφή του ERα με μικρότερο μοριακό βάρος (36kDa), ενώ το γονίδιό του υπολείπεται του πρώτου εξονίου του ERα και έχει διαφορετική αλληλουχία στα τελευταία δυο εξόνια. Ωστόσο, η ικανότητά του να δεσμεύει οιστρογόνα παραμένει ακέραιη.<sup>38</sup> Εκφράζεται σε διάφορους υγιής ιστούς, αλλά και σε είδη καρκινικών κυττάρων. Εντοπίζεται και σε τριπλώς αρνητικά καρκινικά κύτταρα μαστού, ενώ έχει συσχετισθεί με καλή πρόγνωση, αν φαίνεται να εκφράζεται μεμβρανικά ή υπομεμβρανικά στο κύτταρο.<sup>39</sup>



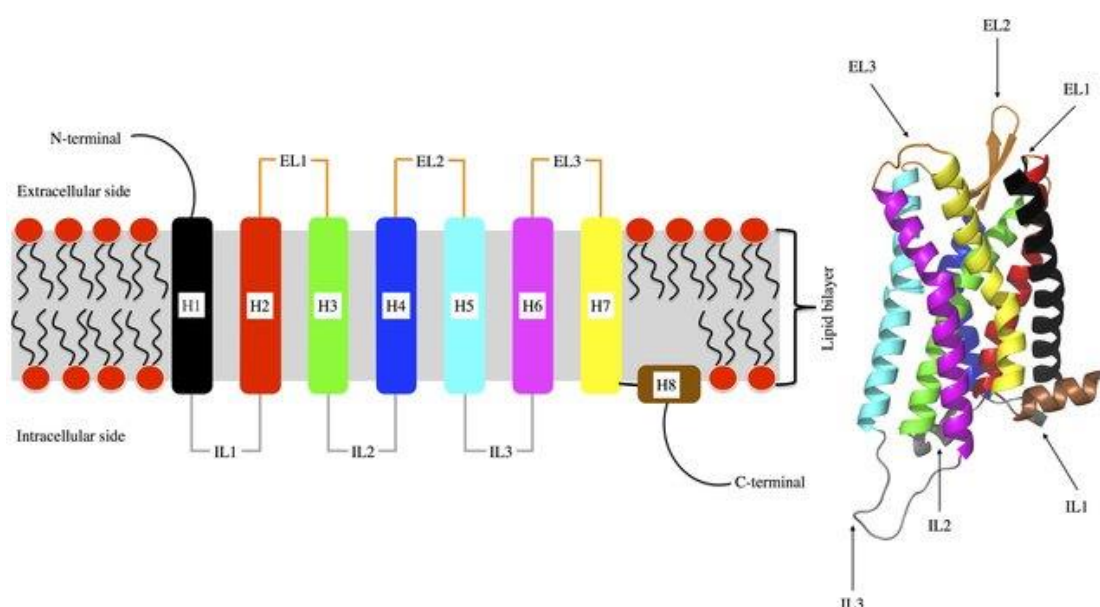
Εικόνα 11 Τα γονίδια ESR1 και ESR2 που εκφράζουν τους υποδοχείς ERα και ERβ και τις ισομορφές τους αντίστοιχα<sup>40</sup>.

## AR (Androgen Receptor)

Ο κλασικός υποδοχέας των ανδρογόνων εκφράζεται σε αρκετούς ιστούς του σώματος, συμπεριλαμβανομένων του αναπαραγωγικού, του νευρικού, του μυϊκού κ.ά. συστημάτων.<sup>41</sup> Εκφράζεται και σε είδη καρκίνου του μαστού, με ρόλο που εξαρτάται από το είδος των κυττάρων και την ύπαρξη άλλων υποδοχέων στεροειδών ορμονών. Σε κάποιες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, συμπεριλαμβανομένων και των τριπλώς αρνητικών, χορηγείται θεραπεία ανταγωνιστών του AR.<sup>42,43</sup> Έχει αναφερθεί ότι συνδεδεμένος με διϋδροτεστοστερόνη προκαλεί μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού κάποιων κυτταρικών σειρών,<sup>44</sup> αλλά και ότι η απουσία της έκφρασης του μπορεί να σημαίνει περισσότερες πιθανότητες για υποτροπή ή μετάσταση σε κάποιους τριπλά αρνητικούς καρκίνους του μαστού.<sup>45,46</sup>

## Υποδοχείς Συζευγμένοι με Πρωτεΐνη G (G Protein-Coupled Receptors - GPCRs)

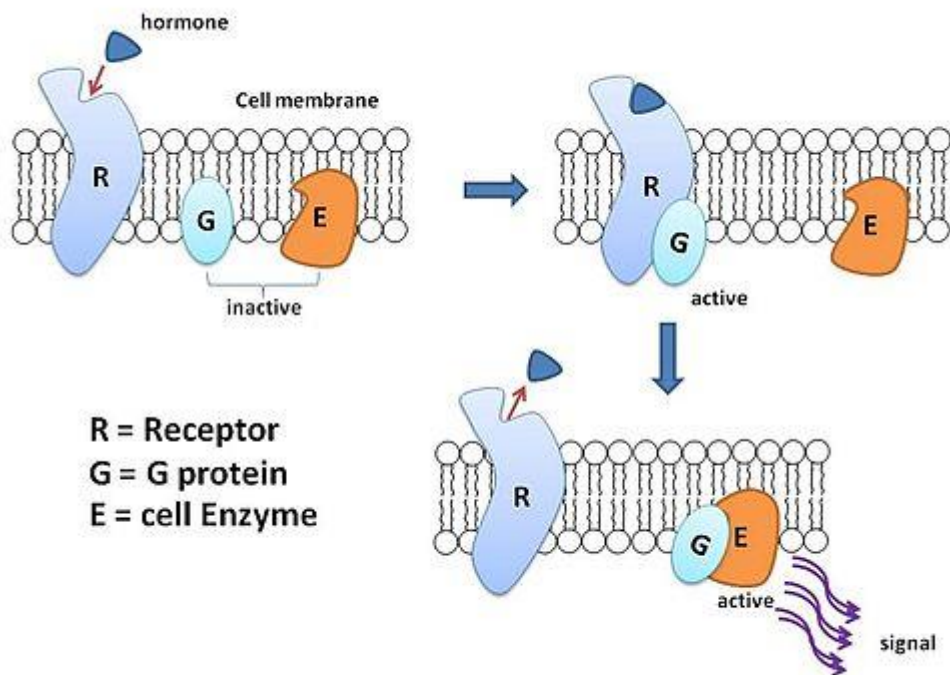
Οι GPCRs είναι μια κατηγορία υποδοχέων που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη, μερικώς εξωτερικά (αμινο-τελικό άκρο) και μερικώς εσωτερικά (καρβοξυ-τελικό άκρο) του κυττάρου. Οι GPCRs είναι επίσης γνωστοί ως υποδοχείς 7TM, δηλαδή υποδοχείς με επτά διαμεμβρανικές περιοχές (seven-(pass)-transmembrane domain receptors), όνομα που δηλώνει ότι διαπερνούν επτά φορές την κυτταρική μεμβράνη,<sup>47</sup> όπως φαίνεται στην Εικόνα 12.



Εικόνα 12 Δομή ενός GPCR<sup>48</sup>.

Αφού το εξωτερικό τμήμα του υποδοχέα δεσμευτεί από ένα μόριο-υποκαταστάτη (ενδογενή ουσία ή αγωνιστή), το εσωτερικό συνδέεται με ρυθμιστική πρωτεΐνη G, που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Η πρωτεΐνη G ενεργοποιείται και μεταβάλλοντας την δραστικότητα κάποιου μορίου (π.χ. ένζυμο), επηρεάζει τη συγκέντρωση εσωτερικών μορίων-αγγελιοφόρων, μεταδίδοντας έτσι συγκεκριμένα σήματα μέσα στο κύτταρο και πυροδοτώντας σειρά αντιδράσεων.<sup>49</sup>





Εικόνα 13 Δέσμευση στεροειδούς ορμόνης με GPCR και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης G<sup>50</sup>.

Οι υποδοχείς GPER-1, OXER1, ZIP9 και GPRC6A ανήκουν στην οικογένεια των GPCRs.

### GPER1 (G Protein-coupled Estrogen Receptor 1)

Ο GPER1 αποτελεί υποδοχέα των οιστρογόνων της οικογένειας των GPCR. Κύριος αγωνιστής του είναι το τεχνητό μόριο G-1,<sup>51</sup> αλλά δεσμεύει και την 17β-οιστραδιόλη με μεγάλη συγγένεια.<sup>52</sup> Εκφράζεται σε πολλούς τριπλώς αρνητικούς καρκίνους του μαστού<sup>53</sup> και θεωρείται πιθανός θεραπευτικός στόχος γι' αυτούς, καθώς μετά από σίγαση της έκφρασης του φάνηκε να μειώνεται η ανάπτυξη των κυττάρων μετά από επώαση με 17β-οιστραδιόλη.<sup>54</sup>

OXER1 (5-oxo-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenoic acid receptor)

Ο υποδοχέας των εικοσανοειδών OXER1 έχει ως ενδογενή συνδέτη του το προϊόν μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος από την 5-λιποξυγενάση και την υπεροξειδάση, 5-οξο-εικοσατετραενοϊκό οξύ (5-οξοETE)<sup>55</sup>.

Εντοπίζεται σε κύτταρα της φλεγμονής,<sup>56</sup> αλλά και σε διάφορους καρκίνους, όπως του προστάτη και του μαστού.<sup>57,58</sup> Έχει, ακόμα, την ικανότητα δέσμευσης με εξωκυττάρια ανδρογόνα,<sup>58</sup> γεγονός που επηρεάζει τα ενδοκυττάρια σήματα και κατ' επέκταση ικανότητες των καρκινικών κυττάρων να μεταναστεύουν και να πολλαπλασιάζονται.

ZIP9 (Zinc Transporter ZIP9)

Ο ZIP9 λειτουργεί ως μεταφορέας ιόντων ψευδαργύρου, ωστόσο παρουσιάζεται και ως εναλλακτικός μεμβρανικός υποδοχέας των ανδρογόνων.<sup>59</sup> Εκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα μαστού και προστάτη<sup>57,60</sup> και φαίνεται να συνδέεται με την τεστοστερόνη με μεγάλη συγγένεια,<sup>57</sup> προκαλώντας μια σειρά αντιδράσεων που επάγουν την κυτταρική απόπτωση, γεγονός που τον κάνει να θεωρείται πιθανός θεραπευτικός στόχος.<sup>60</sup>

GPRC6A (G Protein-coupled Receptor family C group 6 member A)

Ο GPRC6A λειτουργεί κυρίως ως υποδοχέας οστεοκαλσίνης, ιόντων ασβεστίου, αμινοξέων<sup>61</sup> αλλά και στεροειδών ορμονών, που βρίσκονται εξωκυτταρικά. Η σύνδεσή του με ανδρογόνα μπορεί να προκαλέσει μια σειρά σημάτων μέσα στο κύτταρο.<sup>62</sup> Η ικανότητά του αυτή, δεδομένης της ύπαρξής του σε καρκινικά κύτταρα μαστού,<sup>60</sup> μπορεί να επηρεάζει την πορεία της ασθένειας, χωρίς όμως να υπάρχουν ιδιαίτερες ενδείξεις γι' αυτό.

## *Υλικά και Μέθοδοι*

### ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα κύτταρα της σειράς Hs578T έχουν χρόνο διπλασιασμού 32-53,8 ώρες<sup>17</sup>. Καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο, σε συνθήκες 37°C, 5% CO<sub>2</sub> και υγρής ατμόσφαιρας, με τη χρήση θρεπτικού υλικού DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)<sup>63</sup>, όπου έχουν προστεθεί σε συγκέντρωση 5% ορός εμβρύου βοδιού (Fetal Bovine Serum, FBS) και 1% μείγμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης (Penicillin-Streptomycin, P/S).

Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ζωντανά κύτταρα για την διεξαγωγή πειραμάτων, γίνεται η καλλιέργειά τους σε ειδικό θάλαμο και σε στείρες συνθήκες για την αποφυγή μολύνσεων. Οι διαδικασίες λαμβάνουν χώρα σε ειδικούς απαγωγούς που έχουν αποστειρωθεί με τη χρήση UV και καθαρισμό με διάλυμα αιθανόλης 70%. Καθ' όλη τη διάρκεια απαιτείται η χρήση γαντιών και εργαστηριακής ποδιάς, καθώς και ο καθαρισμός, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, των χεριών και οποιουδήποτε υλικού εισάγεται στον απαγωγό με αιθανόλη. Το θρεπτικό υλικό και το PBS που χρησιμοποιούνται στις κυτταροκαλλιέργειες θερμαίνονται για λίγη ώρα μέχρι να φτάσουν τους 37°C.

### ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

#### Υλικά

Κύτταρα Hs578T

Θρεπτικό υλικό / Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Gibco by Life Technologies™

Διάλυμα Θρουψίνης/EDTA 4%, Gibco by Life Technologies™

Ορός εμβρύου βοός / Fetal Bovine Serum (FBS), Gibco by Life Technologies™

Φωσφορικό Ρυθμιστικό διάλυμα / Phosphate-Buffer Saline (PBS), TaKaRa, Sweden

Διμεθυλοσουλφοξείδιο / Dimethyl sulfoxide (DMSO), Sigma, USA

Διάλυμα Πενικιλίνης-Στρεπτομυκίνης / Penicillin-Streptomycin, Gibco by Life Technologies™

Φλάσκες καλλιέργειας 25 και 75cm<sup>2</sup>, SPL Life Sciences Co.

Σωληνάρια φυγοκέντρησης 15ml, 50ml, SPL Life Sciences Co.

Πιπέτες 5ml, 10ml, 25ml, SPL Life Sciences Co.

Πιπεταδόρος

Πιπέτες 100-1000μl, 20-200μl Autoclavable, Nichipet EXII, Japan

Tips 100-1000μl, 20-200μl, AHN Biotechnologie GmbH, Germany

Σωληνάρια βαθιάς κατάψυξης

Αιμοκυτταρόμετρο, Neubauer

Επωαστικός κλίβανος 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, ατμόσφαιρα υγρασίας Sanyo

Ανάστροφο μικροσκόπιο ορατού φωτός Nikon TMS

Κλίβανος θέρμανσης 37°C

Φυγόκεντρος Eppendorf Centrifuge 5720

### 1. Απόψυξη Κυτταρικής Σειράς

Μια καλλιέργεια ξεκινά με την απόψυξη των κυττάρων (σωληνάρια 1ml φυλαγμένα στους -80°C). Το αποψυχθέν υλικό αναμειγνύεται με 14ml θρεπτικού υλικού με ορό και φυγοκεντρείται στα 8000rpm για 8 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα (κύτταρα) επαναδιαλύεται σε 5ml θρεπτικού υλικού με ορό. Μετά από καλή ανάδευση με πιπέτα, το διάλυμα μεταφέρεται σε φλάσκες καλλιέργειας των 25cm<sup>2</sup> και αφήνεται σε αποστειρωμένο κλίβανο στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> μέχρις ότου τα κύτταρα να κολλήσουν στο κάτω μέρος της φλάσκας και να πολλαπλασιαστούν. Στην φλάσκα αναγράφονται η ημερομηνία απόψυξης, η ημερομηνία που είχε

ψυχθεί το υλικό, η κυτταρική σειρά και η γενιά των κυττάρων (passage), που αμέσως μετά την απόψυξη είναι η 1 (P1).

## 2. Διατήρηση Καλλιέργειας

Τα κύτταρα ελέγχονται καθημερινά στο μικροσκόπιο για πιθανές ενδείξεις μολύνσεων και παρατήρηση της αναπαραγωγής τους. Ανά δυο ή τρεις ημέρες, ανάλογα με την πυκνότητα των κυττάρων στην φλάσκα, γίνεται απόρριψη του θρεπτικού υλικού και προσθήκη νέου.

## 3. Ανακαλλιέργεια Κυττάρων

Όταν τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί καταλαμβάνοντας το 70-90% της φλάσκας ή/ και όταν πρέπει να διεξαχθεί πείραμα με τη χρήση κυττάρων, γίνεται ανακαλλιέργεια της κυτταρικής σειράς. Το θρεπτικό υλικό της φλάσκας απορρίπτεται και γίνεται μια έκπλυση με PBS. Μετά από πεντάλεπτη επώαση στον κλίβανο με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης 4% (Trypsin-EDTA σε PBS), τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί από το τοίχωμα της φλάσκας. Το διάλυμα θρυψίνης-κυττάρων αραιώνεται με PBS και μεταφέρεται σε σωληνάριο φυγοκέντρισης. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 8000rpm για 8 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα (κύτταρα) επαναδιαλύεται σε 5ml θρεπτικού υλικού με ορό. Μετά από καλή ανάδευση με πιπέτα, το διάλυμα μεταφέρεται σε φλάσκες καλλιέργειας των 25cm<sup>2</sup> και αφήνεται σε αποστειρωμένο κλίβανο στους 37°C, 5% CO<sub>2</sub> μέχρις ότου τα κύτταρα να κολλήσουν στο κάτω μέρος της φλάσκας και να πολλαπλασιαστούν. Στην φλάσκα αναγράφονται η ημερομηνία ανακαλλιέργειας η κυτταρική σειρά και η γενιά των κυττάρων (passage), η οποία αυξάνει κατά ένα με κάθε ανακαλλιέργεια.

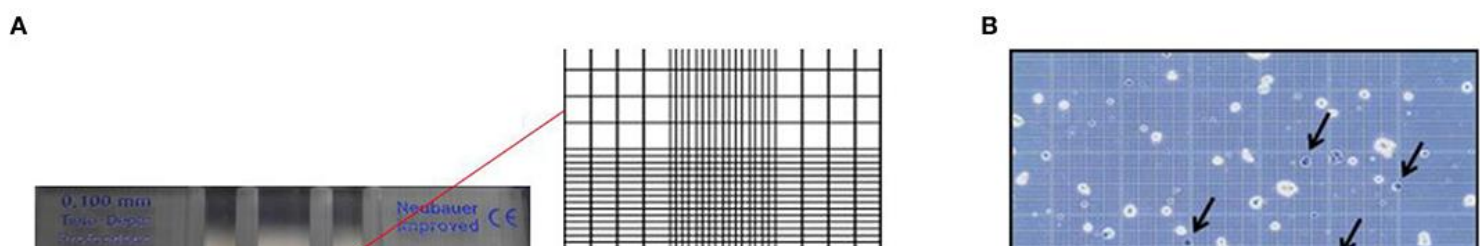
## 4. Κατάψυξη Κυττάρων

Για να υπάρχει απόθεμα κυττάρων πρέπει να γίνεται και ψύξη κυτταρικών σειρών ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η διαδικασία είναι η ίδια με εκείνη της ανακαλλιέργειας (βλ. παραπάνω) μέχρι το σημείο της φυγοκέντρισης και της απόρριψης του υπερκειμένου. Η επαναδιάλυση του

ιζήματος των κυττάρων γίνεται με διάλυμα 1ml FBS και 100μl DMSO για κάθε vial κυττάρων. Πάνω στο ειδικό σωληνάριο αναγράφονται η κυτταρική σειρά, η τελευταία γενιά των κυττάρων πριν την ψύξη και η ημερομηνία ψύξης. Επειδή το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα, οι κινήσεις γίνονται γρήγορα και τα σωληνάρια φυλάσσονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι την επόμενη απόψυξη.

#### 5. Μέτρηση συγκέντρωσης κυττάρων

Ορισμένα πειράματα απαιτούν συγκεκριμένη συγκέντρωση κυττάρων. Για να επιτευχθεί αυτή, μετρείται η ήδη υπάρχουσα συγκέντρωση των κυττάρων σε ειδικό αιμοκυτταρόμετρο. Μετά το βήμα της επαναδιάλυσης (βλ. Ανακαλλιέργεια Κυττάρων) του ιζήματος των κυττάρων γίνεται έντονη ανάδευση με πιπέτα ώστε να διαχωριστούν τα συσσωματώματα των κυττάρων. Το αιμοκυτταρόμετρο καλύπτεται με καλυπτρίδα και στις δυο οπές προστίθενται 20μl διαλύματος κυττάρων ανά οπή. Το αιμοκυτταρόμετρο μεταφέρεται στο μικροσκόπιο. Παρατηρώντας, φαίνεται ένας σταυρός πολλών γραμμών και στις γραμμές του εφάπτονται τέσσερα τετράγωνα. Τα ζωντανά κύτταρα μετρούνται σε κάθε τετράγωνο (εσωτερικά του τετραγώνου και πάνω στις κοινές γραμμές τετραγώνου και σταυρού). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και στον σταυρό της άλλης οπής του αιμοκυτταρόμετρου. Ο αριθμός των κυττάρων των οκτώ τετραγώνων προστίθενται και υπολογίζεται ο μέσος όρος τους (άθροισμα κυττάρων/8). Ο αριθμός αυτός επί  $10^4$  είναι η συγκέντρωση των κυττάρων ανά ml.



Εικόνα 14 A: Το αιμοκυτταρόμετρο και ο σταυρός με βάση τον οποίο γίνεται η μέτρηση της συγκέντρωσης των κυττάρων. B: Τα κύτταρα στο αιμοκυτταρόμετρο όπως φαίνονται στο μικροσκόπιο<sup>69,70</sup>.

Με δεδομένα την αρχική συγκέντρωση ( $C_1$ ), την επιθυμητή συγκέντρωση ( $C_2$ ) και τον επιθυμητό τελικό όγκο ( $V_2$ ), υπολογίζεται ο όγκος του αρχικού διαλύματος ( $V_1$ ) που θα χρησιμοποιηθεί για να παρασκευασθεί το καινούριο διάλυμα κυττάρων, σύμφωνα με την εξίσωση:  $C_1 V_1 = C_2 V_2$

#### ΔΙΑΛΥΜΑ ΕΝΕΡΓΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ-ΔΕΞΤΡΑΝΗΣ ΩΣ ΜΕΣΟ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

Το διάλυμα ενεργού άνθρακα αποσκοπεί στη δέσμευση ενώσεων μικρού μοριακού βάρους που υπάρχουν ελεύθερα σε κάποιο διάλυμα. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκε για τον «καθαρισμό» του διαλύματος τεστοστερόνης-BSA από ελεύθερα μόρια τεστοστερόνης (288,42g/mol) που βρίσκονται μέσα στο διάλυμα, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η περίπτωση αλλοίωσης των αποτελεσμάτων από αυτά.

#### Υλικά

Dextran T70

Activated Charcoal, Sigma, USA

Απιονισμένο νερό

Για την παρασκευή 100ml διαλύματος ενεργού άνθρακα (0,3% activated charcoal, 0,03% dextran) μετρούνται σε ζυγό ακριβείας 0,3gr σκόνης ενεργού άνθρακα και 0,03gr dextran, τα οποία προστίθενται σε 100ml απιονισμένου ύδατος, μέσα σε κωνική φιάλη. Το διάλυμα αφήνεται καλυμμένο στους 4°C υπό ανάδευση για ένα βράδυ (περίπου 12 ώρες). Την επομένη το διάλυμα, το οποίο έχει παρασκευασθεί σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από την επιθυμητή, αναδεύεται σε αναλογία 2:1 με το διάλυμα ενεργού άνθρακα. Το νέο διάλυμα αφήνεται για μισή ώρα στους 4°C υπό ανάδευση, κατόπιν φυγοκεντρείται στα 3.000g για δέκα λεπτά και με μια πιπέτα λαμβάνεται το υπερκείμενο με προσοχή, ώστε να μην

υπάρξει ανάμειξη με το ίζημα. Το διάλυμα φιλτράρεται και φυλάσσεται στους -20°C.

## ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ Hs578T

### 1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια διαδικασία κλωνοποίησης του DNA, που επιτρέπει την ανίχνευση ειδικών κομματιών σε ευρύτερο γενετικό υλικό. Σε αυτήν την πτυχιακή εργασία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των γονιδίων των υποδοχέων ανδρογόνων και οιστρογόνων στο γονιδίωμα των κυττάρων Hs578T, ενώ χρησιμοποιούνται και άλλες κυτταρικές σειρές, που είναι γνωστό ότι περιέχουν τους συγκεκριμένους υποδοχείς, για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Πριν από το κυρίως πείραμα της PCR, προηγούνται απομόνωση RNA από τα κύτταρα, αντίστροφη μεταγραφή και στο τέλος ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.

#### Απομόνωση RNA

Η απομόνωση του RNA από κύτταρα γίνεται με τη χρήση ειδικού kit που περιέχει διαλύματα, μεμβράνες-φίλτρα σε στήλες και σωληνάρια. Πιο συγκεκριμένα, στο kit περιέχονται (σε σειρά χρήσης):

1. RA1: Διάλυμα χαστροπικών αλάτων. Δημιουργεί συνθήκες υψηλής αλατότητας. Μαζί με αυτό, γίνεται χρήση β-μερκαπτοαιθανόλης, η οποία ως αναγωγικό μέσο, σπάει τους καταργεί τους δισουλφιδικούς δεσμούς, αναστέλλοντας τη λειτουργία των ριβονουκλεασών των κυττάρων και διατηρώντας έτσι το RNA ανεπηρέαστο.
2. Στήλη με μεμβράνη-φίλτρο: Ξεχωρίζει τα νουκλεϊκά οξέα από τα υπόλοιπα οργανίδια που υπήρχαν στο διάλυμα.
3. Στήλη με μεμβράνη πυριτίου: Με τη βοήθεια της υψηλής αλατότητας



που επιτεύχθηκε με το RA1, δημιουργείται μεγάλη συγγένεια μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου RNA και της θετικά φορτισμένης μεμβράνης πυριτίου.

4. Membrane Desalting Buffer (MDB): Διάλυμα που απομακρύνει τα άλατα από τη μεμβράνη, προετοιμάζοντάς το έδαφος για καλύτερη λειτουργία της rDNase.

5. rDNase/Reaction Buffer for rDNase: Δεοξυριβονουκλεάση που υδρολύει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στο DNA.

6. RAW2: Απενεργοποιεί την rDNase.

7. RAW3: Απομακρύνει τα πάντα εκτός του RNA.

Υλικά

Κύτταρα Hs578T

Πλάκα καλλιέργειας 6 οπών, Corning & Costar, USA

Διάλυμα θρεπτικού υλικού DMEM, 10% FBS, 1%

Πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη

β-μερκαπτοαιθανόλη, Merck-Schuehardt

Total RNA Isolation Kit NucleoSpin RNA II, NucleoSpin RNA L,

Macherey-Nagel

Σωληνάρια 1,5ml, AHB Biotechnologie GmbH, Germany

Επωαστικός κλίβανος 37°C, υγρής ατμόσφαιρας και CO<sub>2</sub> 5%

Συσκευή φωτομέτρησης μικροποσότητας DNA/RNA NanoDrop 2000

Spectrophotometer, Thermo Scientific, Cheshire, UK

Φυγόκεντρος, Sigma Laborzentrifugen 1K15 BIOBLOCK SCIENTIFIC

Συσκευή ανάδευσης Vortex-Genie 2, Scientific Industries

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκα 6 οπών και αφήνονται να πολλαπλασιαστούν μέχρις ότου καλύπτουν το 70% της κάθε οπής. Η συλλογή των κυττάρων γίνεται με την προσθήκη σε κάθε οπή 350μl διαλύματος RA1 (εμπεριέχεται στο ειδικό kit) και 3,5 μl β-

μερκαπτοαιθανόλης. Το διάλυμα αυτό θα κάνει λύση των κυττάρων σε θραύσματα και νουκλεϊκά οξέα και θα μεταφερθεί σε στήλες με ειδικό φίλτρο, το οποίο μετά από φυγοκέντριση ενός λεπτού στα 11.000g θα συγκρατήσει τα υπόλοιπα συστατικά και θα αφήσει το DNA και το RNA να περάσουν στο υπερκείμενο. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε σωληνάρια των 1,5ml και αναδεύονται με την πιπέτα, μετά την προσθήκη 350μl διαλύματος αιθανόλης 70%. Το διάλυμα αυτό μεταφέρεται σε στήλη με μεμβράνη που θα συγκρατήσει το RNA, ενώ το DNA θα περάσει στο υπερκείμενο, μετά από φυγοκέντριση ενός λεπτού στα 11.000g. Στη στήλη με την μεμβράνη-φίλτρο προστίθενται 350μl Membrane Desalting Buffer (MDB) και έπειτα από άλλη μια φυγοκέντριση ενός λεπτού στα 11.000g προστίθενται 95μl διαλύματος δεοξυριβονουκλεάσης (rDNase) σε κάθε δείγμα, το οποίο αφήνεται για 15 λεπτά. Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται από 10μl ανασυσταμένης rDNase και 90μl του διαλύματος Reaction Buffer for rDNase (ποσότητες για ένα δείγμα). Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις της στήλης με το φίλτρο ως εξής:

Προσθήκη 200μl διαλύματος RA2 και φυγοκέντριση ενός λεπτού στα 11.000g.

Προσθήκη 600μl διαλύματος RA3 και φυγοκέντριση ενός λεπτού στα 11.000g.

Προσθήκη 250μl διαλύματος RA3 και φυγοκέντριση δυο λεπτών στα 11.000g.

Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο, όπου με προσθήκη 60μl RNase-free ύδατος και φυγοκέντριση ενός λεπτού στα 11.000g, το RNA εκλούεται και συλλέγεται. Ακολουθεί μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA σε κάθε δείγμα με τη χρήση ειδικής συσκευής φωτομέτρησης (NanoDrop 2000 Spectrophotometer).

## Αντίστροφη Μεταγραφή RNA σε cDNA

Η διαδικασία αυτή έχει σκοπό να μετατρέψει το RNA σε DNA με τη χρήση ειδικού kit, το οποίο περιέχει το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή, που θα καταλύσει την αντίδραση, ελεύθερα νουκλεοτίδια και εκκινητές.

### Υλικά

Απομονωμένο RNA κυττάρων Hs578T, T47D, DU145

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, applied biosystems by Thermo Fisher Scientific

Σωληνάρια τύπου Eppendorf 1.5 και 2.0 ml, AHB Biotechnologie GmbH, Germany

Συσκευή επώασης cDNA Primus 96 Advanced, peQLab

Αρχικά, παρασκευάζονται 10μl διαλύματος του RNA σε συγκέντρωση 0,1μg/μl, σε απεσταλμένο νερό RNase-free. Σε αυτό το διάλυμα, προστίθενται 10μl του εξής διαλύματος:

2μl 10x RT Buffer

0,8μl 25x dNTP Mix (100mM)

2μl 10x Random Primers

1μl MultiScribe Reverse Transcriptase™

4,2μl Nuclease-free H<sub>2</sub>O

Τα τελικά διαλύματα μεταφέρονται στον θερμικό κυκλοποιητή, όπου ρυθμίζεται το πρόγραμμα της αντίστροφης μεταγραφής.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια
Θέρμανση	99	
Αποδιάταξη RNA	25	10min
Αντίστροφη μεταγραφή	37	120min
Απενεργοποίηση μεταγραφάσης	85	5min
Συντήρηση	4	

*Πίνακας 3 Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι παραμονής των δειγμάτων RNA σε αυτές, με σκοπό την αντίστροφη μεταγραφή. Ο θερμικός κυκλοποιητής θερμαίνεται μέχρις 99°C, κατόπιν εναλλάσσει τις θερμοκρασίες όπως φαίνονται παραπάνω και ολοκληρώνει το πρόγραμμα με ψύξη και συντήρηση των δειγμάτων στους 4°C.*

Με το πέρας της διαδικασίας, το cDNA αραιώνεται με 180μl απεσταγμένου RNase-free νερού και φυλάσσεται στους -20°C.

Με την παραπάνω διαδικασία παρασκευάστηκαν cDNA κυττάρων Hs578T, DU145 και T47D.

#### Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η PCR πραγματοποιείται με τη χρήση kit που περιέχει ελεύθερα νουκλεοτίδια και DNA πολυμεράση, η οποία θα συνθέσει τον νέο κλώνο του DNA. Η επιλεκτική επιλογή των επιθυμητών μερών του γονιδιώματος γίνεται με τη χρήση εκκινητών, συμπληρωματικών στην αρχή και το τέλος των κομματιών που θα κλωνοποιηθούν. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή, όπου λαμβάνουν χώρα τα στάδια που φαίνονται στον Πίνακα 4.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Διάρκεια
Ενεργοποίηση πολυμεράσης	95	180sec
Αποδιάταξη cDNA	95	3sec
	55-60*	20sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	95	5min
Επιμήκυνση αλυσίδων	60	20min
Συγκέντρωση δεδομένων	95	15min

Πίνακας 4 Οι εναλλαγές στις θερμοκρασίες της PCR, ανάλογα με το στάδιο. \*Η θερμοκρασία προσαρμόζεται ανάλογα με τον εκάστοτε εκκινητή.

Τα στάδια της αποδιάταξης, της υβριδοποίησης, της επιμήκυνσης και της συγκέντρωσης δεδομένων επαναλαμβάνονται όσες φορές χρειαστεί για να παραχθεί προϊόν (κύκλοι).

Για την PCR χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής πραγματικού χρόνου. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) επιτρέπει τόσο ποιοτική όσο και ποσοτική μέτρηση της έκφρασης αλληλουχιών γενετικού υλικού. Ωστόσο, στην παρούσα πτυχιακή εργασία επιλέχθηκε μόνο ποιοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων των υποδοχέων.

Το ειδικό διάλυμα για την Real-Time PCR περιέχει τη χρωστική SYBR Green I, η οποία φθορίζει μόνο όταν προσδένεται πάνω στα μόρια DNA, ανάμεσα στους δυο εκάστοτε εκκινητές. Ο θερμικός κυκλοποιητής πραγματικού χρόνου μπορεί να ανιχνεύει στο τέλος κάθε κύκλου το φθορισμό της SYBR Green I, χάρις στο σύστημα κατόπτρων και φίλτρων που διαθέτει και να τον μεταφράζει σε ποσοτικοποιημένο προϊόν.

Υλικά

Σωληνάρια 0.5ml, AHB Biotechnologie GmbH, Germany

Σωληνάρια για αντιδράσεις Real-Time PCR MicroAmp Reaction Tubes,  
Applied Biosystems

Master mix KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 2x, Kapa Biosystems, Inc.  
Wilmington, MA, USA

Σύστημα Real-Time PCR StepOnePlus System Real-Time PCR, Applied  
Biosystems

Εκκινητές, Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany

Γονίδιο (Στόχος)	Εκκινητής	Αλληλουχία
<b>ERα</b>	Reverse	5'-TTTCAACATTCTCCCTCCTC-3'
	Forward	5'-AATTCAGATAATCGACGCCAG-3'
<b>ERβ</b>	Reverse	5'-GGGAGCCACACTTCACCAT-3'
	Forward	5'-TAGTGGTCCATCCCCAGTTAT-3'
<b>ERα36</b>	Reverse	5'-GCACGGTTCATTAACATCTTTCTG-3'
	Forward	5'-CCAAGAATGTTCAACCACAACCT-3'
<b>AR</b>	Reverse	5'-AGCTTCTGGGTGTCTCCTCAGTGG-3'
	Forward	5'-TGTCACTATGGAGCTCTCACATGTGG-3'
<b>GPER-1</b>	Reverse	5'-TGAGCTTGTCCCTGAAGGTC-3'
	Forward	5'-TGGTGGTGAACATCAGCTTC-3'
<b>OXER1</b>	Reverse	5'-CGACGAGAGCTCCTACCAAC-3'
	Forward	5'-AGGAGCCTTCCTTTTCCAGA-3'
<b>ZIP9</b>	Reverse	5'-GGCTATGTTGGTGGGATGTT-3'
	Forward	5'-AGCAGTTCACAGAGAAGGC-3'
<b>GPRC6A</b>	Reverse	5'-CTCCCAGACGACCACAAATC-3'
	Forward	5'-ACCCAGTTTGAAGGTC-3'
<b>h18s</b>	Reverse	5'-TTCTGCTGTCTTTGGAACCTTGTC-3'
	Forward	5'-ATGGTCAACCCCAACGTG-3'

*Πίνακας 5 Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, προσαρμοσμένοι στο γονίδιο του εκάστοτε υποδοχέα. Πριν από τις PCR με τους εκκινητές αυτούς, πραγματοποιήθηκε μια PCR με τον εκκινητή του γονιδίου h18s, με σκοπό την επαλήθευση ύπαρξης γενετικού υλικού.*

Σε σωληνάριο του 0.5ml παρασκευάζεται διάλυμα με 30μl master mix, 3μl reverse εκκινητή, 3μl forward εκκινητή και 9μl RNase-free νερού. Σε τρία από τα ειδικά σωληνάρια της Real-Time PCR προστίθενται από 15μl του παραπάνω διαλύματος και από 5μl cDNA, στο πρώτο σωληνάριο Hs578T, στο δεύτερο η επιλεγμένη κυτταρική σειρά που είναι θετική στο γονίδιο στόχο και στο τρίτο 5μl νερού απεσταγμένου, αποστειρωμένου και RNase-free νερού ως δείκτη για ύπαρξη τυχόν επιμολύνσεων. Η συγκεκριμένη

διαδικασία επαναλαμβάνεται για κάθε ζεύγος εκκινητών (reverse-forward) του εκάστοτε γονιδίου-στόχου. Τα δείγματα τοποθετούνται στο μηχάνημα και το αντίστοιχο πρόγραμμα στον υπολογιστή ρυθμίζεται στην κατάλληλη θερμοκρασία και στους κατάλληλους κύκλους για κάθε εκκινητή γονιδίου στόχου, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

<i>Εκκινητής</i>	<b>Θερμοκρασία (°C)</b>	<b>Κύκλοι</b>
<i>ERa</i>	58	45
<i>ERβ</i>	58	45
<i>ERa36</i>	60	45
<i>AR</i>	58	45
<i>GPER-1</i>	58	45
<i>OXER1</i>	60	35
<i>ZIP9</i>	60	45
<i>GPRC6A</i>	55	45
<i>h18s</i>	60	45

*Πίνακας 6 Θερμοκρασία στην αποδιάταξη του cDNA και κύκλοι (επανάληψη της διαδικασίας) ανάλογα με τον εκάστοτε εκκινητή.*

Ο εκκινητής *h18s* στοχεύει στο αντίστοιχο γονίδιο αναφοράς, δηλαδή ένα γονίδιο κοινό για όλες τις κυτταρικές σειρές του ίδιου είδους, το οποίο δείχνει την ύπαρξη ή όχι cDNA και παραπροϊόντων που μπορεί να προέκυψαν κατά την αντίστροφη μεταγραφή. Αν τα αποτελέσματα είναι τα επιθυμητά, ακολουθούν οι υπόλοιπες PCR.

Ηλεκτροφόρηση cDNA σε γέλη αγαρόζης 2%

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στην μετακίνηση φορτισμένων μορίων υπό την επίδραση εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Ο διαχωρισμός γίνεται λόγω μεγέθους, με τα μικρότερα μόρια να κινούνται ευκολότερα και γρηγορότερα μέσα στην πηκτική αγαρόζη και να φτάνουν στο κάτω μέρος της. Με την ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση δείγματος που φέρει κομμάτια



DNA σε γνωστές θέσεις (ladder) φαίνεται η θέση που εμφανίζεται το κάθε δείγμα και ταυτοποιείται σε συγκεκριμένη βάση δεδομένων.

#### Υλικά

Αγαρόζη, Sigma-Aldrich, USA

TAE-buffer 1x (40 Mm Tris, 20 Mm Acetate, 1mM EDTA), pH= 8.6

Βρωμιούχο αιθύλιο (0.5 µg/ml)

Loading buffer 10x

100bp ladder H3 RTU NIPPON Genetics EUROPE GmbH

Κωνική φιάλη 250 ml

Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Φωτογραφικό μηχάνημα ακτινών UV

Φούρνος μικροκυμάτων

Σε 100ml διαλύματος TAE 10x γίνεται προσθήκη 2gr αγαρόζης. Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου γίνει διαυγές και εμφανίσει φουσκάλες που σταματούν ακαριαία μετά από την έξοδο από τον φούρνο. Το διάλυμα ψύχεται ελαφρώς σε υδατόλουτρο και κατόπιν γίνεται προσθήκη 15µl βρωμιούχου αιθιδίου. Έπειτα από ελαφριά ανάδευση της φιάλης με το χέρι, το διάλυμα τοποθετείται στην ειδική πλαστική θήκη, στην οποία θα πάρει τη μορφή που απαιτείται. Αμέσως τοποθετούνται τα ειδικά χτενάκια που θα σχηματίσουν τα πηγάδια της γέλης και το διάλυμα αφήνεται να πήξει για μισή ώρα. Όταν η γέλη είναι έτοιμη μεταφέρεται στο μηχάνημα ηλεκτροφόρησης όπου καλύπτεται με επαρκή ποσότητα διαλύματος TAE 10x. Ωστόσο, στα δείγματα cDNA προστίθενται από 5µl ειδικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) και στη συνέχεια 12µl από το κάθε δείγμα μεταφέρονται στα πηγάδια της γέλης. Στο πρώτο πηγάδι, έχουν μεταφερθεί 10µl διαλύματος ladder. Η συσκευή ρυθμίζεται στα 100V και η ηλεκτροφόρηση διαρκεί περίπου 40

λεπτά, μέχρι τα δείγματα να φτάσουν στο κάτω μέρος της γέλης. Κατόπιν, η γέλη φωτογραφίζεται κάτω από λάμπα υπεριώδους φωτός.

## 2. Έμμεσος Ανοσοφθορισμός

Η ανίχνευση υποδοχέων με τη χρήση του ανοσοφθορισμού βασίζεται στη χρήση ειδικών αντισωμάτων που συνδέονται επιλεκτικά στους επιθυμητούς υποδοχείς. Στα ειδικά αυτά αντισώματα συνδέονται, πάλι ειδικά, δευτερεύοντα αντισώματα, τα οποία φθορίζουν και επιτρέπουν την παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Η χρήση των δευτερευόντων φθορίζόντων αντισωμάτων καθιστούν τον ανοσοφθορισμό έμμεσο.

## Καλλιέργεια και Μονιμοποίηση Κυττάρων για Ανοσοφθορισμό

### Υλικά

Αντικειμενοφόρος πλάκα των 8 θέσεων Permax Chamber Slide, Labtech

Διάλυμα θρεπτικού υλικού DMEM, 10% FBS, 1%

Πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη

Διάλυμα PBS

Παραφορμαλδεΰδη (PFA) 4%, MERCK, Germany

Επωαστικός κλίβανος 37°C, υγρής ατμόσφαιρας και CO<sub>2</sub> 5%

Σε πλακίδιο 8 οπών καλλιεργείται ποσότητα 70.000 κυττάρων ανά οπή (1 οπή=300μl). Την επομένη της επίστρωσης τα κύτταρα μονιμοποιούνται με επώαση με παραφορμαλδεΰδη 4% για 10 λεπτά, αφού προηγηθούν δυο εκπλύσεις με PBS. Ακολουθούν ξανά δυο εκπλύσεις με PBS. Το πλακίδιο μπορεί να φυλαχθεί για λίγες ημέρες στους 4°C, με προσθήκη PBS, σφραγισμένο με μεμβράνη parafilm, μέχρι να γίνει χρήση του.

Χρώση για Έμμεσο Ανοσοφθορισμό

Υλικά

Triton 100x

διάλυμα  $MgCl_2$  1M, MERCK, Germany

Fishkin Gelatin, Sigma, USA

Διάλυμα PBS

ER $\alpha$  antibody (mouse), Santa Cruz Biotechnologies

ER $\beta$  antibody (rabbit), Santa Cruz Biotechnologies

ER $\alpha$ 36 antibody (rabbit), Alpha Diagnostic International

AR antibody (rabbit), Thermo Fisher Scientific

GPER1 antibody (rabbit), Santa Cruz Biotechnologies

OXER1 antibody (goat), Sigma

ZIP9 antibody (rabbit), Origene

GPRC6A antibody (rabbit), CUSABIO TECHNOLOGY LLC

Alexa 555 antibody (anti-rabbit), Biotium

FITC antibody (anti-mouse), Santa Cruz Biotechnologies

PE antibody (anti-goat), Santa Cruz Biotechnologies

TO-PRO-3 Iodide, Thermo Fisher Scientific

Καλυπτρίδες 24 x 50 mm MENZEL-GLASER, Thermo Scientific, Germany

Ανάστροφο μικροσκόπιο με λογισμικό ZEN AXIO Vert.A1 ZEISS

International, Jena, Germany

Παρασκευάζονται διαλύματος blocking (blocking buffer) με 100 $\mu$ l Triton 100x, 100 $\mu$ l διαλύματος  $MgCl_2$  1M, 250 $\mu$ l fishkin gelatin και PBS μέχρις όγκου 100ml. Σκοπός του διαλύματος αυτού είναι η μείωση της μη ειδικής σύνδεσης των αντισωμάτων. Γίνεται έκπλυση στο πλακίδιο με PBS και κατόπιν δεκάλεπτη επώαση με 300 $\mu$ l blocking buffer ανά οπή. Παράλληλα, παρασκευάζονται τα διαλύματα των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση των υποδοχέων. Ανάλογα με την

συγκέντρωση κάθε αντισώματος που προτείνεται από την εκάστοτε εταιρεία, υπολογίζεται η ποσότητα που απαιτείται και μεταφέρεται σε blocking buffer. Τα διαλύματα των αντισωμάτων μεταφέρονται στις αντίστοιχες οπές σε ποσότητα 100μl ανά οπή. Γίνεται διώρη επώαση.

<i>Αντίσωμα</i>	<b>Αραίωση (Αντίσωμα:Blocking Buffer)</b>
<i>ERα</i>	1:50
<i>ERβ</i>	1:10
<i>ERα36</i>	1:50
<i>AR</i>	1:100
<i>GPER-1</i>	1:100
<i>OXER1</i>	1:50
<i>ZIP9</i>	1:50
<i>GPRC6A</i>	1:200

*Πίνακας 7 Οι αραιώσεις των πρωτεϊνικών αντισωμάτων όπως χρησιμοποιήθηκαν.*

Ακολουθεί και πάλι δεκάλεπτη επώαση με blocking buffer. Ταυτόχρονα, παρασκευάζονται τα διαλύματα των φθορίζοντων (δευτερευόντων) αντισωμάτων που θα δεσμευτούν στα πρώτα αντισώματα. Ανάλογα με την συγκέντρωση κάθε αντισώματος που προτείνεται από την εκάστοτε εταιρεία, υπολογίζεται η ποσότητα που απαιτείται και μεταφέρεται σε blocking buffer. Τα διαλύματα των αντισωμάτων μεταφέρονται στις αντίστοιχες οπές σε ποσότητα 100μl ανά οπή, και αφήνονται για μια ώρα σε σκοτεινό σημείο, ώστε να μην εξασθενίσουν οι χρωστικές.

<i>Αντίσωμα</i>	<b>Αραίωση (Αντίσωμα:Blocking Buffer)</b>
<i>Alexa 555 anti-rabbit antibody</i>	1:500
<i>FITC anti-mouse antibody</i>	1:100
<i>PE anti-goat antibody</i>	1:100

Πίνακας 8 Οι αραιώσεις των δευτερευόντων αντισωμάτων όπως χρησιμοποιήθηκαν.

Εν συνεχεία, γίνεται ξανά δεκάλεπτη επώαση με blocking buffer και μια πλύση με PBS. Για την χρώση του πυρήνα των κυττάρων χρησιμοποιείται διάλυμα TO-PRO-3 Iodide σε PBS (1:1000), 100μl ανά οπή, για 10 λεπτά. Μετά από τρεις εκπλύσεις με PBS, το πλακίδιο αποκόπτεται από τις οπές και καλύπτεται με ειδική καλυπτρίδα, αφού πρώτα προστεθεί από μια σταγόνα mounting medium σε κάθε τετράγωνο κυττάρων. Το πλακίδιο παρατηρείται στο μικροσκόπιο φθορισμού.

## ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ Hs578T

### Μελέτη Ρυθμού Πολλαπλασιασμού

Σκοπός του πειράματος είναι η μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων υπό την επίδραση οιστρογόνων ή ανδρογόνων. Η διάρκεια του πειράματος είναι 7 ημέρες, μέσα στις οποίες τα κύτταρα, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε ίδια συγκέντρωση σε κάθε οπή της πλάκας, αναπαράγονται με ρυθμούς που μπορεί να επηρεάζονται από τις επιδράσεις ουσιών. Η μέτρηση γίνεται με την χρήση της κίτρινης χρωστικής MTT (2-(3,5-diphenyltetrazol-2-ium-2-yl)-4,5-dimethyl-1,3-thiazole bromide), η οποία μεταβολίζεται από αφυδρογονάσες στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων, δημιουργώντας μπλε κρυστάλλους. Οι κρυστάλλοι στη συνέχεια διαλύονται σε οργανικό διαλύτη,

καταλήγοντας σε διάλυμα ιώδους χρώματος, του οποίου η απορρόφηση στα 595nm, μετά από μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο, δίνει σε αναλογία την συγκέντρωση των κυττάρων.

Υλικά

DMEM, 10% FBS, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη

DMEM χωρίς ορό/αντιβιοτικά

Πλάκες καλλιέργειας 24 οπών, Orange Scientific, USA

Πλάκες καλλιέργειας 96 οπών, Orange Scientific, USA

Χρωστική 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT), Sigma, USA

Διμεθυλοσουλφοξείδιο, DMSO Sigma, USA

Οιστραδιόλη (E2), Sigma, Germany

Δυδροτεστοστερόνη (DHT), Sigma, Germany

Αλβουμίνη ορού βοδιού (BSA), Sigma, Germany

Τεστοστερόνη-BSA, Sigma, Germany

Επωαστικός κλίβανος 37°C, υγρής ατμόσφαιρας και CO<sub>2</sub> 5%

Φωτόμετρο ELISA BIORAD Model 680 MICROPLATE READER

Η διαδικασία ξεκινά με την καλλιέργεια ποσότητας περίπου 3.000 κυττάρων ανά ml σε πλάκα 24 οπών (1 οπή=1ml). Την επομένη της επίστρωσης διαλύματα στεροειδών ορμονών σε θρεπτικό υλικό με ορό προστίθενται σε κάθε οπή. Για κάθε διαφορετικό διάλυμα αναλογεί μια τριπλέτα οπών. Προκειμένου να γίνει η μελέτη της επίδρασης των ουσιών στον ρυθμό πολλαπλασιασμού, κύτταρα σε έξι οπές της πλάκας καλλιεργούνται με θρεπτικό υλικό με ορό και χωρίς προσθήκη ουσιών. Με το πέρας τριών ημερών γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού στις οπές της πλάκας, προσθέτοντας πάλι τις αντίστοιχες ουσίες. Οι διαδικασίες από εδώ και πέρα γίνονται με την αποφυγή φωτός, για να μην εξασθενίσει οι

χρωστική του MTT. Τρεις ημέρες μετά, αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό και γίνει μια έκπλυση με PBS (500μl ανά οπή), γίνεται επώαση με διάλυμα MTT (5mg/ml σε PBS) σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό (0,5mg/ml) για 3 ώρες στον κλίβανο. Ακολουθεί άλλη μια έκπλυση με PBS και διάλυση των κρυστάλλων με οργανικό διαλύτη (DMSO, 200μl ανά οπή). Κατόπιν, γίνεται καλή ανάδευση με πιπέτα και μεταφορά 120μl κάθε οπής σε αντίστοιχη θέση πλάκα 96 οπών. Τέλος, μετριέται η απορρόφηση κάθε διαλύματος οπής σε φασματόμετρο ELISA, στα 595nm.

## *Αποτελέσματα*

### ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ Hs578T

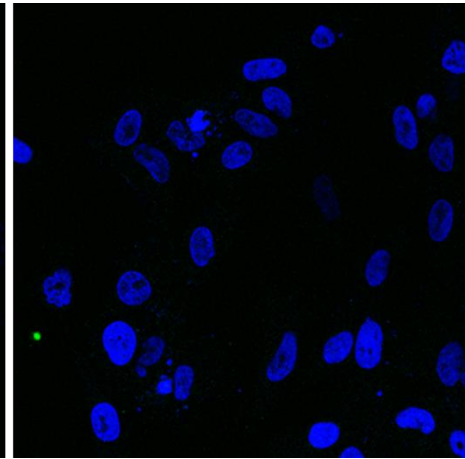
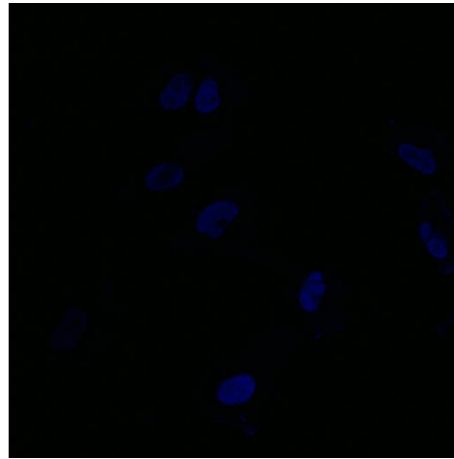
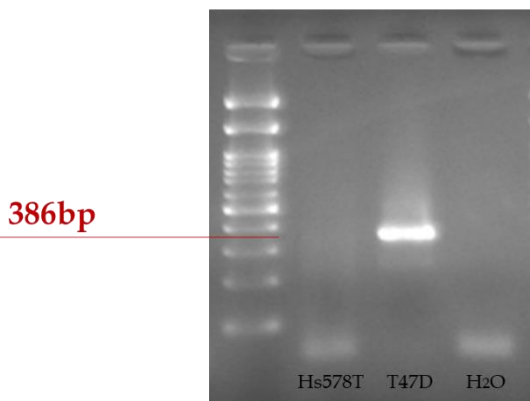
Αρχικά έγινε ανίχνευση των γονιδίων των αντίστοιχων υποδοχέων στο γονιδίωμα της κυτταρικής σειράς Hs578T με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης. Η μπάντα που αντιστοιχεί σε κάθε υποδοχέα βρέθηκε μέσω του προγράμματος Nucleotide BLAST<sup>64</sup>, όπου με την εισαγωγή των αλληλουχιών των ζευγών εκκινήτων για κάθε υποδοχέα, υπολογίζεται το μέγεθος του προϊόντος που αναμένεται σε ζεύγη βάσεων (base pairs, bp). Χρησιμοποιήθηκαν ακόμη κυτταρικές σειρές θετικές σε κάθε γονίδιο στόχο για εξακρίβωση και δείγμα RNase-free νερού ένδειξη ύπαρξης παραπροϊόντων.

Η ανίχνευση της ύπαρξης των ίδιων υποδοχέων έγινε και μέσω έμμεσου ανοσοφθορισμού, δηλαδή την πρόσδεση αντισωμάτων στην αντίστοιχη πρωτεΐνη-υποδοχέα του κυττάρου και εντοπισμός της μέσω μικροσκοπίου. Ταυτοχρόνως, έγινε και αντίστοιχη χρώση κυττάρων μόνο με δευτερεύον αντίσωμα, ώστε να εντοπιστεί η μη ειδική χρώση.

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα των PCR και της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων της (αριστερές εικόνες), ενώ οι κόκκινες γραμμές με τον εκάστοτε αριθμό υποδηλώνουν το αναμενόμενο προϊόν σε ζεύγη βάσεων (bp). Αριστερά βρίσκονται από δυο αντιπροσωπευτικές εικόνες των αποτελεσμάτων του έμμεσου ανοσοφθορισμού, με την αριστερή να περιέχει κύτταρα μόνο με δευτερεύον αντίσωμα, για την ανίχνευση μη ειδικής χρώσης, ενώ η δεξιά περιέχει κύτταρα με πρωτεύον και δευτερεύον αντίσωμα, για την ανίχνευση ύπαρξης των αναζητούμενων πρωτεϊνών-υποδοχέων.

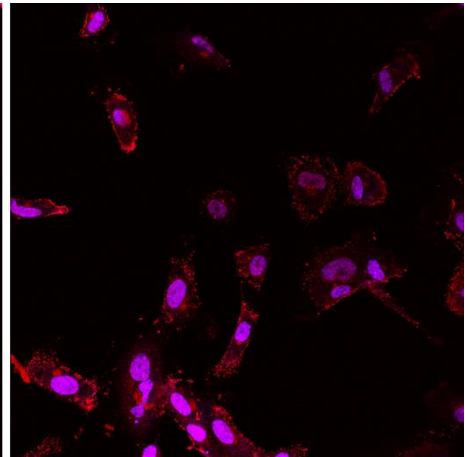
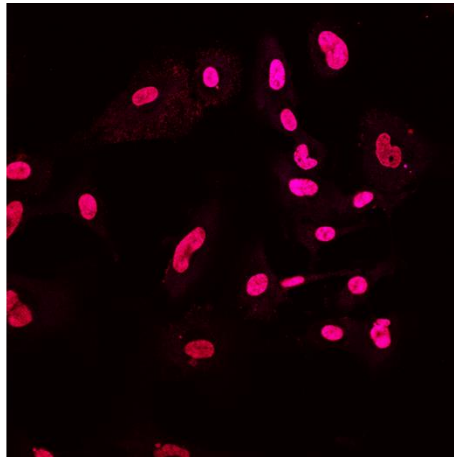
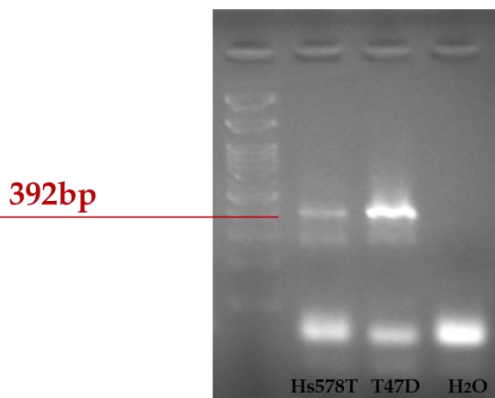


## ERα



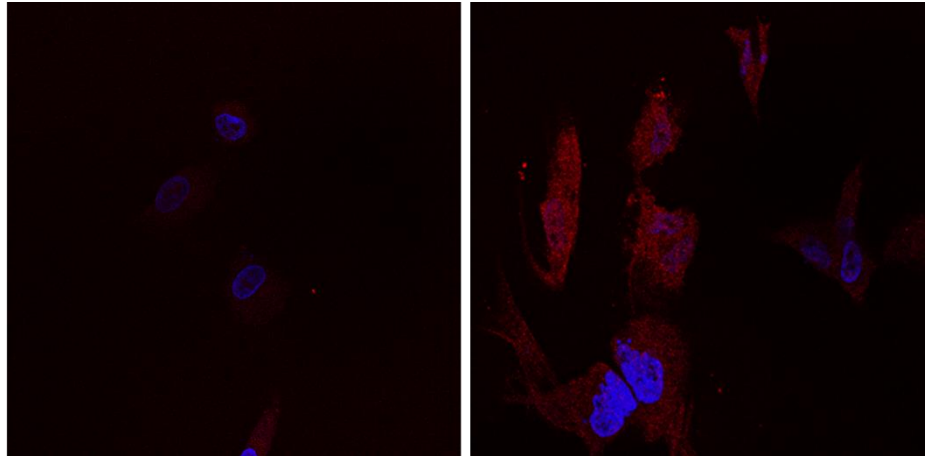
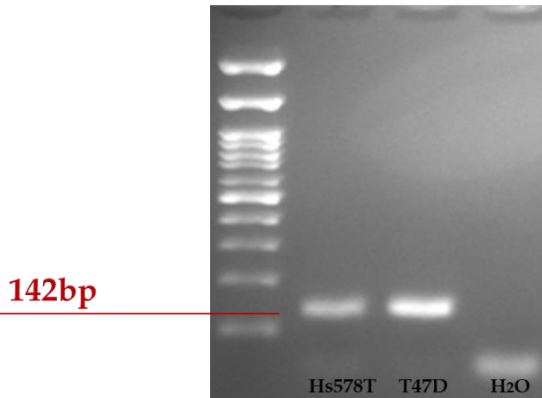
Εικόνα 15 Αριστερά η PCR υποδηλώνει την απουσία έκφρασης του ERα, αποτέλεσμα αναμενόμενο στα 386bp, όπως φαίνεται στα θετικά T47D. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα της PCR, με την απουσία πράσινου σήματος εξαιτίας της φθορίζουσας χρωστικής FITC. Με μπλε χρώμα έχουν σημειωθεί οι πυρήνες των κυττάρων. Η αριστερή εικόνα του ανοσοφθορισμού περιέχει μόνο δευτερόν αντισώμα, ενώ η δεξιά και το αντισώμα του ERα.

## ERβ



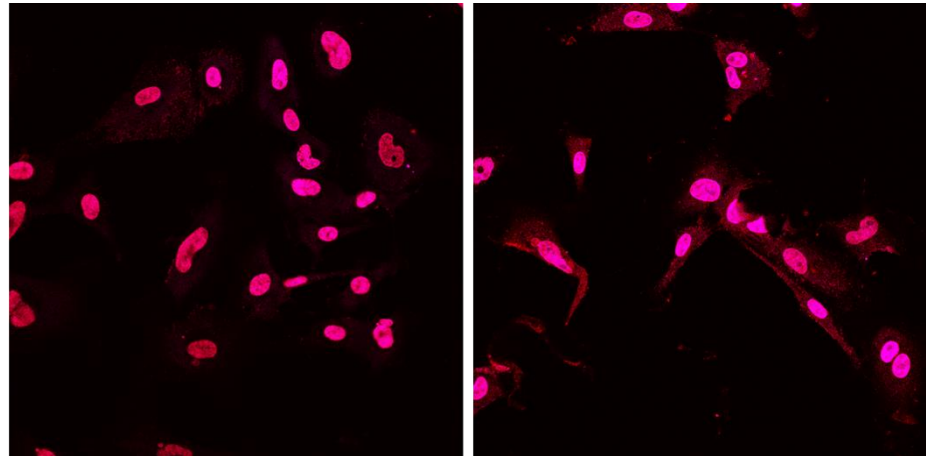
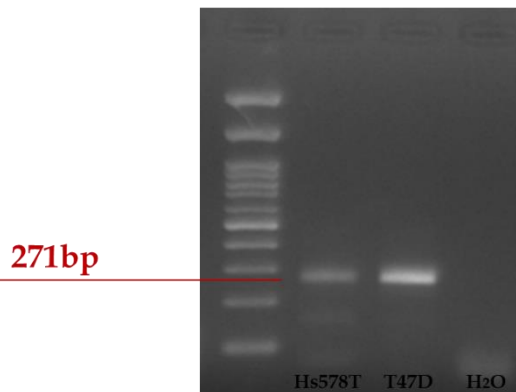
Εικόνα 16 Στα 392bp εμφανίζεται η μπάντα που αντιστοιχεί στον ERβ, όπως στα αντίστοιχα θετικά T47D. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα της PCR, με την κόκκινη χρώση του δευτερονότως αντισώματος. Με μπλε χρώμα έχουν σημειωθεί οι πυρήνες των κυττάρων, αλλά λόγω μη ειδικής χρώσης του δευτερονότως (αριστερή εικόνα), οι πυρήνες εμφανίζονται ως ρόδινοι/ιώδεις. Παρόλη την πολλή μη ειδική χρώση, ο ανοσοφθορισμός εμφανίζει ERβ, μεμβρανικά και κυτταροπλασματικά.

### ERa36



Εικόνα 17 Τόσο η PCR, με την μλάντα στα 142bp, όσο και ο έμμεσος ανοσοφθορισμός, με την κόκκινη χρωστική PE, αποδεικνύουν την ύπαρξη του ERa36 στα Hs578T.

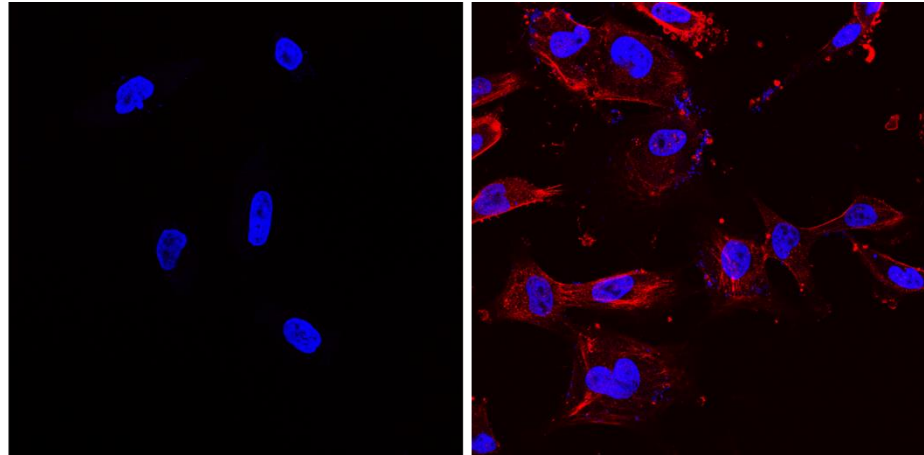
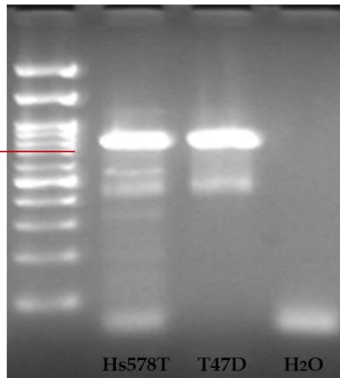
### AR



Εικόνα 18 Η μλάντα που αντιστοιχεί στον AR εμφανίζεται στα 271bp. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα της PCR, με την κόκκινη χρώση του δευτεροδόντως αντισώματος. Με μπλε χρώμα έχουν σημειωθεί οι πυρήνες των κυττάρων, αλλά λόγω μη ειδικής χρώσης του δευτεροδόντως (αριστερή εικόνα), οι πυρήνες εμφανίζονται ως ρόδινοι/ιώδεις. Παρόλη την πολλή μη ειδική χρώση, ο ανοσοφθορισμός εμφανίζει AR κυτταροπλασματικά.

## GP<sub>ER</sub>1

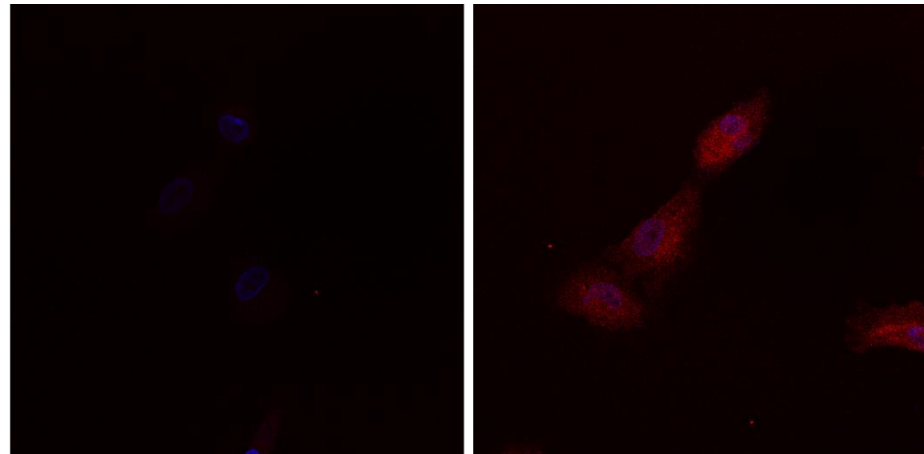
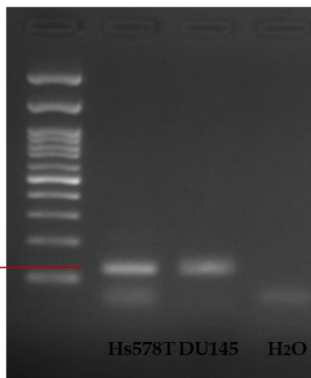
720bp



Εικόνα 19 Οι έντονες μλάντες στα 720bp, καθώς και το αρκετά έντονο μεμβρανικό και κυτταροπλασματικό κόκκινο σήμα του ανοσοφθορισμού, οδηγούν στο συμπέρασμα της μεγάλης έκφρασης του GP<sub>ER</sub>1 από τα Hs578T.

## OX<sub>ER</sub>1

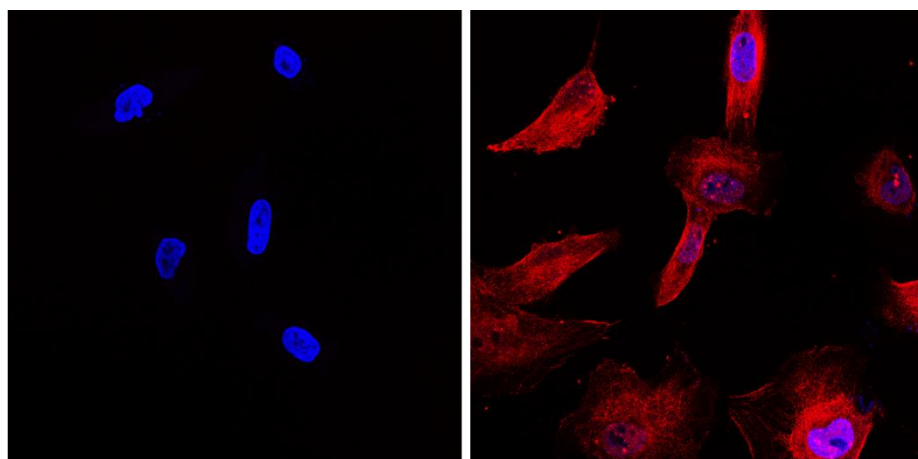
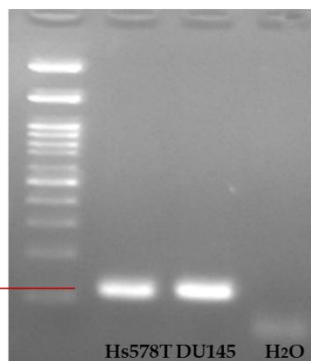
118bp



Εικόνα 20 Τόσο η PCR (μλάντα στα 118bp) όσο και ο ανοσοφθορισμός (κόκκινο σήμα χρωστικής PE) υποδηλώνουν την έκφραση του OX<sub>ER</sub>1 στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά.

## ZIP9

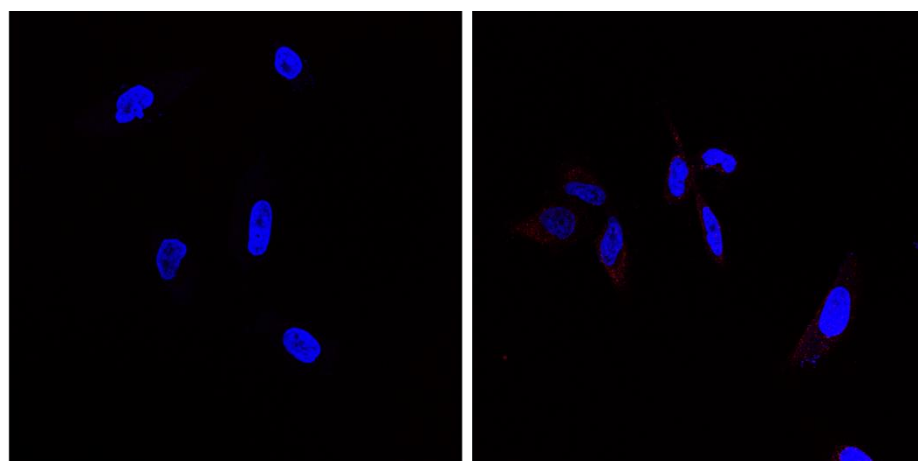
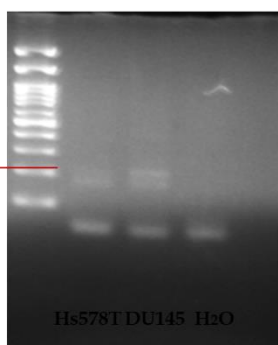
114bp



Εικόνα 21 Τα Hs578T φαίνεται να εκφράζουν τον υποδοχέα ZIP9. Η μλάντα εμφανίζεται στο αναμενόμενο ύψος (114bp) και το κόκκινο σήμα του ανοσοφθορισμού είναι έντονο τόσο μεμβρανικά, όσο και κυτταροπλασματικά, αλλά και ελάχιστα πυρηνικά.

## GPRC6A

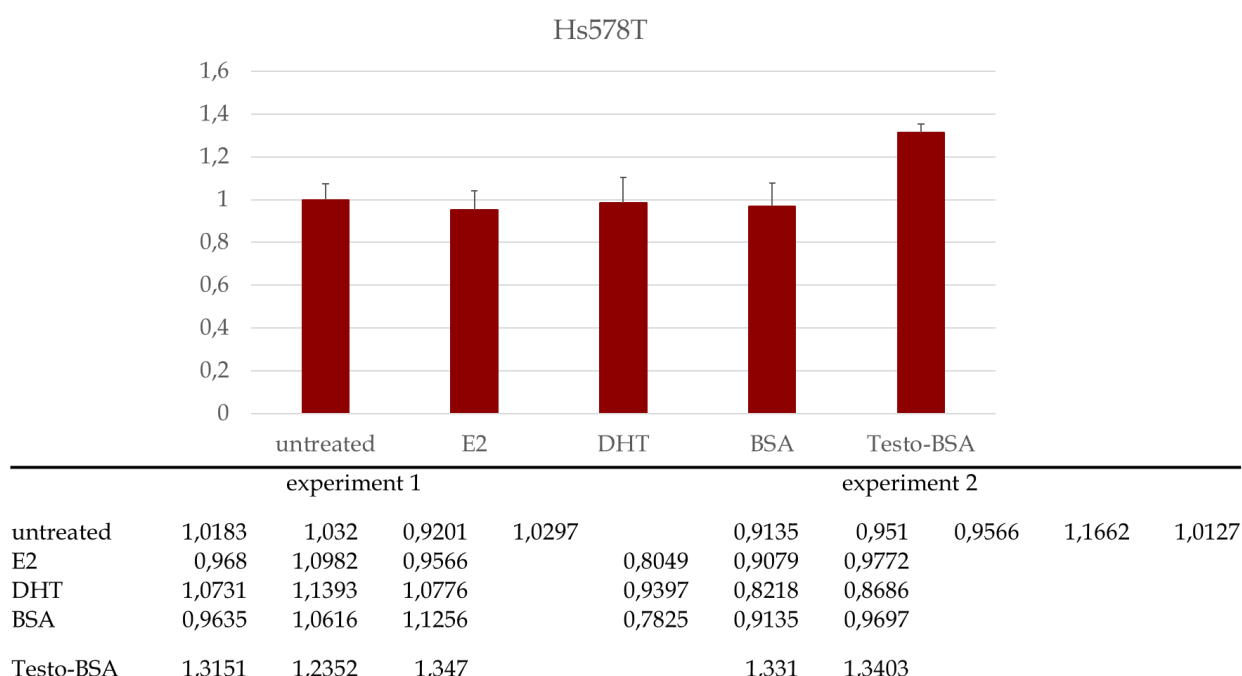
209bp



Εικόνα 22 Η PCR απέδωσε μια ισχνή μλάντα. Η ελάχιστη κόκκινη χρώση του ανοσοφθορισμού οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχει πολύ μικρή κυτταροπλασματικά έκφραση του υποδοχέα GPRC6A, μάλλον.

## ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΑΝΔΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ Hs578T

Η μελέτη της επίδρασης οιστραδιόλης, διϋδροτεστοστερόνης και μεμβρανικώς συνδεόμενου συμπλόκου τεστοστερόνης-αλβουμίνης ορού βοδιού στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της σειράς Hs578T έγινε με την καλλιέργεια κυττάρων χωρίς επίδραση και με προσθήκη των παραπάνω ορμονών σε συγκέντρωση  $10^{-6}$  στο θρεπτικό τους υλικό για έξι ημέρες. Κατά την έβδομη ημέρα, ο φθορισμός της χρωστικής MTT στα 595nm έδειξε τα εξής αποτελέσματα:



Εικόνα 23 Όλα τα αποτελέσματα είναι κανονικοποιημένα με βάση τα δείγματα χωρίς την επίδραση ορμονών (untreated). Ο πίνακας δείχνει τις τριπλέτες (για τα untreated χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω οπές κυττάρων) για τις δυο επαναλήψεις του πειράματος (experiment 1 & experiment 2). Το διάγραμμα είναι φτιαγμένο με βάση τους μέσους όρους των τιμών των αντίστοιχων οπών για τα κύτταρα χωρίς επίδραση ορμονών (untreated), κύτταρα με επίδραση 17β-οιστραδιόλης (E2), διϋδροτεστοστερόνης (DHT), αλβουμίνης ορού βοδιού (BSA) και συμπλόκου τεστοστερόνης-αλβουμίνης ορού βοδιού (Testo-BSA). Όλες οι επιδράσεις έγιναν σε συγκέντρωση  $10^{-6}$ M. Στο διάγραμμα φαίνεται ότι η μόνη ουσία με εμφανή επίδραση ήταν το σύμπλοκο τεστοστερόνης-BSA, προκαλώντας αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού.

## *Συμπεράσματα*

Τα κύτταρα Hs578T καρκίνου του μαστού ανήκουν στην κατηγορία των τριπλώς αρνητικών καρκίνων του μαστού, δηλαδή δεν εκφράζουν τον κλασικό υποδοχέα των οιστρογόνων, προγεστερόνης και την πρωτεΐνη HER2<sup>18</sup>. Η έλλειψη έκφρασης του κλασικού υποδοχέα των οιστρογόνων ERα επαληθεύεται με τα αποτελέσματα της PCR και το έμμεσο ανοσοφθορισμού. Αντιθέτως, τα κύτταρα Hs578T φαίνεται να εκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων ERβ, καθώς και την ισομορφή του ERα, ERα36. Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη του ERβ σε τριπλώς αρνητικές καρκινικές σειρές μαστού και συγκεκριμένα και στα Hs578T<sup>65</sup>. Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός, έδειξε ότι ο ERβ ίσως εκφράζεται κυτταροπλασματικά και μεμβρανικά, ενώ δεν είναι εύκολο να παρατηρηθεί αν βρίσκεται πυρηνικά λόγω έντονου μη ειδικού σήματος. Ο ERα36, που έχει βρεθεί σε άλλες τριπλώς αρνητικές καρκινικές σειρές<sup>66</sup>, φαίνεται να εκφράζεται σε μικρό βαθμό κυτταροπλασματικά. Ο κλασικός υποδοχέας των ανδρογόνων (AR) δείχνει, παρά την μη ειδική χρώση, να εκφράζεται επίσης σε μικρό βαθμό κυτταροπλασματικά.

Άλλος ένας υποδοχέας των οιστρογόνων, της οικογένειας των συζευγμένων με πρωτεΐνη G, ο GPER1, φαίνεται να εκφράζεται αρκετά έντονα στα κύτταρα Hs578T, κυρίως μεμβρανικά. Ο συγκεκριμένος έχει επίσης φανεί να εκφράζεται σε τριπλώς αρνητικά κύτταρα καρκίνου του μαστού<sup>67</sup>. Ο OXER1, εντοπίζεται κυτταροπλασματικά, πιθανώς λόγω παλμιτοϋλίωσης που του επιτρέπει να κινείται από και προς την μεμβράνη. Ο υποδοχέας ZIP9 εμφανίζεται έντονα, τόσο κυτταροπλασματικά, όσο και μεμβρανικά. Τέλος, πολύ χαμηλό σήμα εμφανίζει ο GPRC6A και εκτιμάται ότι τα Hs578T εκφράζουν τον συγκεκριμένο υποδοχέα, σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

Συνολικά, τα αποτελέσματα της PCR συμφωνούν με εκείνα του έμμεσου ανοσοφθορισμού, υποδεικνύοντας έκφραση των ERβ, ERα36, AR, GPER1,

OXER1 και ZIP9, πιθανή ελάχιστη έκφραση του GPRC6A και έλλειψη έκφρασης του ERα.

Η μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού υπό την επίδραση 17β-οιστραδιόλης και διυδροτεστοστερόνης δεν έδειξε κάποια αξιοσημείωτη διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα χωρίς την επίδραση κάποιας ουσίας. Αντιθέτως, το σύμπλοκο τεστοστερόνης-αλβουμίνης αυξάνει αρκετά το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων Hs578T. Παρατηρώντας τον ρυθμό πολλαπλασιασμού υπό την επίδραση της BSA και με δεδομένο ότι από το διάλυμα τεστοστερόνης-BSA είχαν απομακρυνθεί ελεύθερα μόρια τεστοστερόνης με διάλυμα ενεργού άνθρακα και δεξτράνης, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αύξηση αυτή οφείλεται καθαρά στο μεμβρανικά συνδεδεμένο ανδρογόνο. Η σύνδεση αυτή χρήζει περαιτέρω μελέτης, καθώς είναι άγνωστο αν η τεστοστερόνη-BSA συνδέεται σε κάποιον GPCR όπως ο OXER1, ο ZIP9 και ο GPRC6A, σε κάποια ενδεχόμενη ισομορφή του κλασικού AR ή εάν ο ίδιος ο AR έχει υποστεί παλμιτοϋλίωση και βρισκόμενος στη μεμβράνη δεσμεύει εξωτερικά ανδρογόνα και επάγει αυτή την πολλαπλασιαστική δράση.

## Σοζήτηση

Όταν μια ασθενής διαγνωστεί με τριπλώς αρνητικό καρκίνο του μαστού η πρόγνωση θεωρείται γενικά δυσμενής. Η κατηγορία αυτή λόγω, τόσο των ποικίλων και άγνωστων μηχανισμών που την χαρακτηρίζουν, όσο και της ιδιαιτερότητάς της να μην εκφράζει των κλασικό υποδοχέα των οιστρογόνων δεν επιδέχεται μεγάλου φάσματος θεραπειών.

Η μελέτη αυτού του είδους του καρκίνου του μαστού είναι εξαιρετικά σημαντική. Η χαρτογράφηση των ίδιων των κυττάρων, αλλά και των μονοπατιών που ενεργοποιούνται από διάφορες ουσίες, όπως οι στεροειδείς ορμόνες, μπορεί να οδηγήσει στην εύρεση νέων θεραπειών με λιγότερες παρενέργειες. Οι στοχευμένες θεραπείες μπορούν να οδηγήσουν σε καλύτερη πρόγνωση για την ασθενή, ποιοτική και μακροχρόνια επιβίωση. Ταυτόχρονα, ίσως να μπορεί να αποφευχθεί η έκθεση σε χημειοθεραπεία, η οποία επιβαρύνει βάνανυσα τον οργανισμό της ασθενούς.

Η σημασία, όμως, της αποκάλυψης της λειτουργίας των τριπλώς αρνητικών καρκίνων δεν σταματά σε κλινικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, η ένδειξη ύπαρξης υποδοχέων των οιστρογόνων πέραν του κλασικού, όπως στα κύτταρα Hs578T, μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη εναλλακτικών μονοπατιών δράσης των οιστρογόνων. Έτσι, τα Hs578T, και πιθανώς άλλες παρόμοιες σειρές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλα για τη κατανόηση της λειτουργίας του υποδοχέα ERβ, αλλά και των ERα36 και GPER1, καθώς και για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης τους.

Η ανακάλυψη της δέσμευσης των ανδρογόνων σε μεμβρανικούς υποδοχείς ανοίγει το δρόμο για τη μελέτη πολλών πιθανών μηχανισμών. Από τη μια μεριά, η ύπαρξη των GPCR υποδοχέων με την ικανότητα δέσμευσης ανδρογόνων και από την άλλη, πιθανά εναλλακτικά μονοπάτια του AR σημαίνουν ότι υπάρχουν αρκετές ανεξερευνήτες περιοχές της



δράσης αυτών των ορμονών. Ο αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού των Hs578T υπό την επίδραση ανδρογόνων που δεν μπορούν να εισέλθουν στο κύτταρο λόγω μεγέθους, όπως το σύμπλοκο τεστοστερόνης-BSA, αποδεικνύει ότι τα κύτταρα αυτά αποτελούν εξαιρετικό μοντέλο μελέτης για έναν ακόμη λόγο · την μεμβρανική δέσμευση ανδρογόνων και κάποιο εναλλακτικό, άγνωστο μονοπάτι σηματοδότησης.

## Βιβλιογραφία

1. Venta, L. A., Dudiak, C. M., Salomon, C. G. & Flisak, M. E. Sonographic evaluation of the breast. *Radiographics* **14**, 29–50 (1994).
2. Cooper, A. *On the Anatomy of the Breast*. (Harrison and Co Printers, London, 1840).
3. Pandya, S. & Moore, R. G. Breast development and anatomy. *Clin. Obstet. Gynecol.* **54**, 91–95 (2011).
4. Medscape. <https://reference.medscape.com/article/1273133-overview>.
5. John Hopkins Medicine Pathology. <https://pathology.jhu.edu/breast/>.
6. World Health Organization. <https://www.who.int/>.
7. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/>.
8. AJCC. *AJCC Cancer Staging Manual (8th edition)*. (Springer International Publishing AG, 2018).
9. Brierley, J., Gospodarowicz, M. & Wittekind, C. *TNM Classification of Malignant Tumours (8th edition)*. (Wiley-Blackwell, Oxford, 2017).
10. Carlson, R. W. *et al.* Breast Cancer. Clinical practice guidelines in oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **7**, 122–192 (2009).
11. Frank, G. A., Danilova, N. V., Andreeva, Y. Y. & Nefedova, N. A. WHO Classification of tumors of the breast, 2012. *Arkh. Patol.* **75**, 53–63 (2013).
12. Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C. & Lakhani, S. R. Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch.* **465**, 1–14 (2014).
13. Narayanan, R. & Dalton, J. Androgen Receptor: A Complex Therapeutic Target for Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. **8**, 108 (2016).
14. BREASTCANCER.ORG. <https://www.breastcancer.org/>.
15. Ross, J. S., Hatzis, C., Symmans, W. F., Pusztai, L. & Hortobágyi, G. N. Commercialized Multigene Predictors of Clinical Outcome for Breast

- Cancer LEARNING OBJECTIVES Oncologist ® Breast Cancer.  
*Oncologist* **13**, 477–493 (2015).
16. Hackett, A. J. *et al.* Two syngeneic cell lines from human breast tissue: The aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 1795–1806 (1977).
  17. Cellosaurus - a knowledge resource on cell lines.  
[https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_0332](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0332).
  18. Kathryn, J. C., Sireesha V, G. & Stanley, L. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis* **32**, 35–48 (2012).
  19. Waks, A. G. & Winer, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **321**, 288–300 (2019).
  20. Joshi, H. & Press, M. F. Molecular Oncology of Breast Cancer. in *The Breast* 282-307.e5 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-323-35955-9.00022-2.
  21. Cortazar, P. *et al.* Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* **384**, 164–172 (2014).
  22. McMurry, J. *Organic Chemistry*. (Cengage Learning, Boston, 2016).
  23. Nicolaou, K. C. & Montagnon, T. *Molecules That Changed the World*. (Wiley-VCH, Weinheim, 2008).
  24. Gupta, M. K. & Chia, S.-Y. Ovarian Hormones: Structure, Biosynthesis, Function, Mechanism of Action, and Laboratory Diagnosis. in *Clinical Reproductive Medicine and Surgery* 1–30 (Springer, New York, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-6837-0\_1.
  25. Avendaño, C. & Menéndez, J. C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*

- (*Second Edition*) (Elsevier Science, Amsterdam, 2015).
26. McEwan IJ, Brinkmann AO. *Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders*. [Updated 2016 Jun 12]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.nc>.
  27. Huang, P., Chandra, V. & Rastinejad, F. Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 247–272 (2010).
  28. Aranda, A. & Pascual, A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol. Rev.* **81**, 1269–1304 (2001).
  29. Lumen Learning. <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology2/chapter/intracellular-hormone-receptors/>.
  30. Kampa, M. et al. Early membrane initiated transcriptional effects of estrogens in breast cancer cells: First pharmacological evidence for a novel membrane estrogen receptor element (ERx). *Steroids* **77**, 959–967 (2012).
  31. Deng, Q. et al. Androgen Receptor Localizes to Plasma Membrane by Binding to Caveolin-1 in Mouse Sertoli Cells. *Int. J. Endocrinol.* **2017**, 1–8 (2017).
  32. Baker, J. L. et al. Functional Divergence of the Nuclear Receptor NR2C1 as a Modulator of Pluripotentiality During Hominid Evolution. *Genetics* **203**, 905–922 (2016).
  33. Green, S. et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**, 134–139 (1986).
  34. Kavousipour, S. et al. Interconnection of Estrogen/Testosterone Metabolism and Mevalonate Pathway in Breast and Prostate Cancers. *Curr. Mol. Pharmacol.* **10**, 86–114 (2017).
  35. Turner, N. C., Neven, P., Loibl, S. & Andre, F. Advances in the

- treatment of advanced oestrogen-receptor-positive breast cancer. *Lancet* **389**, 2403–2414 (2017).
36. Austin, D. *et al.* Estrogen receptor-beta is a potential target for triple negative breast cancer treatment. *Oncotarget* **9**, 33912–33930 (2018).
  37. Sellitto, A. *et al.* Insights into the Role of Estrogen Receptor  $\beta$  in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. **12**, 1477 (2020).
  38. Wang, Z. *et al.* Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ 66. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**, 1023–1027 (2005).
  39. Pelekanou, V. *et al.* ER $\alpha$ 36, a new variant of the ER $\alpha$  is expressed in triple negative breast carcinomas and has a specific transcriptomic signature in breast cancer cell lines. *Steroids* **77**, 928–934 (2012).
  40. Gibson, D. A. & Saunders, P. T. K. Estrogen dependent signaling in reproductive tissues – A role for estrogen receptors and estrogen related receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **348**, 361–372 (2012).
  41. Zajac, J., Davey, R. & Rana, K. Human androgen deficiency: insights gained from androgen receptor knockout mouse models. *Asian J. Androl.* **16**, 169 (2014).
  42. De Amicis, F. *et al.* Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **121**, 1–11 (2010).
  43. Huang, R. *et al.* Androgen Receptor Expression and Bicalutamide Antagonize Androgen Receptor Inhibit  $\beta$ -Catenin Transcription Complex in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* **43**, 2212–2225 (2017).
  44. Chottanapund, S. *et al.* Effect of androgens on different breast cancer cells co-cultured with or without breast adipose fibroblasts. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **138**, 54–62 (2013).

45. Sutton, L. M. *et al.* Decreased Androgen Receptor Expression Is Associated With Distant Metastases in Patients With Androgen Receptor-Expressing Triple-Negative Breast Carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **138**, 511–516 (2012).
46. Rakha, E. A. *et al.* Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* **109**, 25–32 (2007).
47. Trzaskowski, B. *et al.* Action of Molecular Switches in GPCRs - Theoretical and Experimental Studies. *Curr. Med. Chem.* **19**, 1090–1109 (2012).
48. Fossépré, M., Leherte, L., Laaksonen, A. & Vercauteren, D. P. On the Modularity of the Intrinsic Flexibility of the  $\mu$  Opioid Receptor: A Computational Study. *PLoS One* **9**, e115856 (2014).
49. Katzung, B. C. *Εισαγωγή στη Φαρμακολογία*. (Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Θεσσαλονίκη, 2009).
50. Berg, J. *Biochemistry*. (Freeman and Co, New York, 2010).
51. Bologa, C. G. *et al.* Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 207–212 (2006).
52. Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J. & Dong, J. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology* **146**, 624–632 (2005).
53. Steiman, J., Peralta, E. A., Louis, S. & Kamel, O. Biology of the estrogen receptor, GPR30, in triple negative breast cancer. *Am. J. Surg.* **206**, 698–703 (2013).
54. Girgert, R., Emons, G. & Gründker, C. Inactivation of GPR30 reduces growth of triple-negative breast cancer cells: possible application in targeted therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **134**, 199–205 (2012).
55. Hosoi, T. *et al.* Identification of a Novel Human Eicosanoid Receptor

- Coupled to Gi/o. *J. Biol. Chem.* **277**, 31459–31465 (2002).
56. Jones, C. E. *et al.* Expression and Characterization of a 5-oxo-6 E ,8 Z ,11 Z ,14 Z -Eicosatetraenoic Acid Receptor Highly Expressed on Human Eosinophils and Neutrophils. *Mol. Pharmacol.* **63**, 471–477 (2003).
  57. Kalyvianaki, K. *et al.* Membrane androgen receptors (OXER1, GPRC6A AND ZIP9) in prostate and breast cancer: A comparative study of their expression. *Steroids* **142**, 100–108 (2019).
  58. Kalyvianaki, K. *et al.* Antagonizing effects of membrane-Acting androgens on the eicosanoid receptor OXER1 in prostate cancer. *Sci. Rep.* **7**, 1–14 (2017).
  59. Berg, A. H., Rice, C. D., Rahman, M. S., Dong, J. & Thomas, P. Identification and Characterization of Membrane Androgen Receptors in the ZIP9 Zinc Transporter Subfamily: I. Discovery in Female Atlantic Croaker and Evidence ZIP9 Mediates Testosterone-Induced Apoptosis of Ovarian Follicle Cells. *Endocrinology* **155**, 4237–4249 (2014).
  60. Thomas, P., Pang, Y., Dong, J. & Berg, A. H. Identification and Characterization of Membrane Androgen Receptors in the ZIP9 Zinc Transporter Subfamily: II. Role of Human ZIP9 in Testosterone-Induced Prostate and Breast Cancer Cell Apoptosis. *Endocrinology* **155**, 4250–4265 (2014).
  61. Pi, M. *et al.* Identification of a Novel Extracellular Cation-sensing G-protein-coupled Receptor. *J. Biol. Chem.* **280**, 40201–40209 (2005).
  62. Pi, M., Parrill, A. L. & Quarles, L. D. GPRC6A Mediates the Non-genomic Effects of Steroids\*. *J. Biol. Chem.* **285**, 39953–39964 (2010).
  63. ATCC. [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-126.aspx?geo\\_country=gr#documentation](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-126.aspx?geo_country=gr#documentation).
  64. . BLAST: Basic Local Alignment Search

[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).

65. Schüler-Toprak, S. *et al.* Agonists and knockdown of estrogen receptor  $\beta$  differentially affect invasion of triple-negative breast cancer cells in vitro. *BMC Cancer* **16**, 951 (2016).
66. Pelekanou, V. *et al.* ER $\alpha$ 36, a new variant of the ER $\alpha$  is expressed in triple negative breast carcinomas and has a specific transcriptomic signature in breast cancer cell lines. *Steroids* **77**, 928–934 (2012).
67. Hsu, L.-H., Chu, N.-M., Lin, Y.-F. & Kao, S.-H. G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 306 (2019).
68. Rakha, E. A. *et al.* Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.* **12**, 207 (2010).
69. Hong, C., Lee, J., Zheng, H., Hong, S.-S. & Lee, C. Porous silicon nanoparticles for cancer phototherapy. *Nanoscale Res. Lett.* **6**, 321 (2011).
70. Vembadi, A., Menachery, A. & Qasaimeh, M. A. Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, (2019).