

Streszczenie

Molekularny mechanizm regulacji autofagii przez 17 β -estradiol i progesteron w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego bydła w przebiegu mammogenezy pęcherzykowej i inwolucji – badania na modelu *in vitro*

Autofagia jest konserwatywnym ewolucyjnie, ściśle regulowanym wewnątrzkomórkowym procesem trawienia własnych składników, aktywowanym w odpowiedzi na zewnętrzne i wewnątrzkomórkowe warunki stresowe w celu utrzymania komórkowej homeostazy. Autofagia zostaje zapoczątkowana w cytoplazmie otoczeniem substratów do trawienia w strukturze pęcherzykowej o podwójnej błonie zwanej autofagosomem. W wyniku jego fuzji z lizosomem dochodzi do ich trawienia w celu uzupełnienia niedostatku składników pokarmowych w komórce. W gruczole mlekowym autofagia jest niezbędna do prawidłowego przebiegu zarówno procesów mammogenezy pęcherzykowej jak i inwolucji. 17 β -estradiol (E2) i progesteron (P4), steroidy płciowe znane ze swej roli w wyznaczeniu i koordynacji przebiegu programu rozwoju gruczołu mlekowego i jego inwolucji, wykazują zdolność indukowania autofagii w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego. Jednak dokładny mechanizm tej regulacji nie został dotąd zbadany. Zatem celem niniejszej pracy doktorskiej było scharakteryzowanie molekularnego mechanizmu regulacji autofagii przez E2 i P4 w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego bydła.

W niniejszej pracy doktorskiej zbadane zostały mechanizmy regulacji autofagii przez 17 β -estradiol i progesteron z wykorzystaniem modeli *in vitro* mammogenezy pęcherzykowej i inwolucji. Komórki nabłonka gruczołu mlekowego bydła linii BME-UV1 hodowane na zrekonstruowanej błonie podstawnej tworzyły trójwymiarowe pęcherzyki zwane mammosferami, składające się z warstwy komórek nabłonka otaczających puste światło pęcherzyka. Ten model hodowli komórkowej umożliwia odtworzenie procesu rozwoju pęcherzyków wydzielniczych gruczołu mlekowego w okresie ciąży. Analiza komórek BME-UV1 hodowanych na modelu 3D, wykonana przy użyciu mikroskopii konfokalnej, potwierdziła wzmożoną autofagię w położonych centralnie komórkach rozwijających się mammosfer w obecności 17 β -estradiolu i progesteronu. Obserwowany efekt był związany regulacją autofagii przez badane hormony, przejawiającą się we wzroście ekspresji genów *ATG5*, *BECN1*, *MAP1LC3B* i ich białkowych produktów, nieznacznym wzroście poziomu ufosforylowanej kinazy AMPK przy jednoczesnym spadku aktywnej kinazy Akt i mTOR, oraz wzroście poziomu ufosforylowanego białka Bcl-2.

Podobne wyniki otrzymano, gdy komórki linii BME-UV1 były hodowane z wykorzystaniem modelu inwolucji *in vitro*. Dwudziestokrotna redukcja zawartości bydłowej surowicy płodowej w pożywce hodowlanej umożliwiła odtworzenie warunków niedostatku składników odżywczych i bioaktywnych, które naturalnie występują w gruczole mlekowym podczas inwolucji. E2 i P4 powodowały wzrost ekspresji genów *BECN1*, *ATG5*, *MAP1LC3B* i ich produktów białkowych. Efekt ten został potwierdzony poprzez wyciszenie ekspresji receptora ER α i analizy z użyciem inhibitorów receptorów estrogenowych i progesteronowych (odpowiednio 4-OHT i RU-486). Udowodniono także, że oba steroidy zwiększają poziom ufosforylowanego białka Bcl-2 oraz aktywnych kinaz Akt, AMPK i ERK. Dodatkowo wykazano, że receptory steroidów tworzą kompleksy z Bekliną1.

W oparciu o przeprowadzone badania wykazano, że regulacja autofagii w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego bydła w obecności E2 i P4 odbywa się przez stymulację ścieżek genomowej i niegenomowej, na drodze regulacji ekspresji genów autofagicznych i aktywacji komórkowych szlaków sygnałowych PI3K/Akt/mTOR, AMPK/mTOR i ERK.

Słowa kluczowe: **autofagia, 17 β -estradiol, progesteron, geny autofagiczne, Beklina1**

Summary

Molecular mechanism of autophagy regulation by 17 β -estradiol and progesterone in bovine mammary epithelial cells during mammary alveologenesis and involution – studies based on *in vitro* models

Autophagy is an evolutionary conserved, highly regulated intracellular self-digestion pathway activated in response to variety of extracellular and intracellular stress conditions to maintain cellular homeostasis. Autophagy is initiated in the cytoplasm by sequestration of cellular components in double-membrane vesicle termed autophagosome. After fusion with lysosome the autophagosomal cargo undergoes degradation to compensate for nutrient deprivation. Autophagy is essential to ensure proper course of both mammary gland development and involution. 17 β -estradiol (E2) and progesterone (P4), sex steroids which are known to determine and coordinate developmental program over the course of mammary gland morphogenesis and involution, were shown to induce autophagy in bovine mammary epithelial cells. Nevertheless, the exact mechanism of this regulation was not explored. Therefore, the aim of the present Ph.D. thesis was to elucidate the mechanisms of autophagy regulation by E2 and P4 in bovine mammary epithelial cells.

In the presented Ph.D. studies autophagy regulation by 17 β -estradiol and progesterone was investigated using *in vitro* models of mammary alveologenesis and involution. BME-UV1 bovine mammary epithelial cells cultured on reconstituted basement membrane formed three-dimensional (3D) acini termed mammospheres, comprised of mammary epithelial cells enclosing a hollow lumen. This 3D culture model enables recreation of the process of alveoli formation which takes place during gestation in the mammary gland. Confocal microscopy analysis of BME-UV1 cells cultured in 3D system confirmed enhanced autophagy induction in the centrally localized cells of developing mammospheres in the presence of 17 β -estradiol and progesterone. The observed effect resulted from several regulatory actions of tested steroid hormones, which increased the expression of *ATG3*, *ATG5*, *BECN1*, *MAP1LC3B* genes and their protein products, slightly increased the level of phosphorylated kinase AMPK in parallel with diminished phosphorylation of Akt and mTOR kinases, and increased the level of phosphorylated Bcl-2 protein.

Similar results were obtained when BME-UV1 cells were cultured using the model of *in vitro* involution. A twenty-fold reduction of foetal bovine serum concentration in the culture medium recreated the naturally occurring decline in the supply of nutrients and bioactive compounds, which occurs in the mammary gland during involution. E2 and P4 were shown to stimulate *BECN1*, *ATG5*, *MAP1LC3B* genes expression and increase the level of their corresponding proteins. The effect was proven by knockdown of estrogen receptor alpha gene and experiments using estrogen and progesterone receptor antagonists (4-OHT and RU-486, respectively). Both steroids were proven to upregulate phosphorylation of Bcl-2 protein, as well as Akt, AMPK and ERK kinases. Additionally, their receptors were shown to form complexes with Beclin1.

Undertaken experiments demonstrated that E2 and P4 enhance autophagy induction in bovine mammary epithelial cells in genomic and non-genomic manner, regulating the expression of autophagy-related genes and influencing the activity of key signaling pathways (PI3K/Akt/mTOR; AMPK/mTOR).

Keywords: autophagy, 17 β -estradiol, progesterone, autophagy-related genes, Beclin1