



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

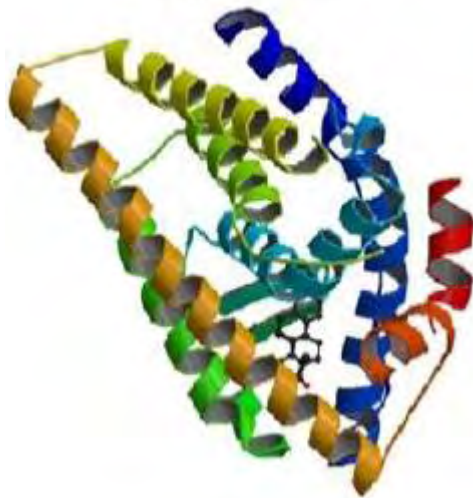


ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΩΝΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ ΤΗ
ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΒΗΤΑ ΜΟΡΦΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ –
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ»

«CHARACTERIZATION OF MITOCHONDRIAL ESTROGEN RECEPTOR
BETA INTERACTING PROTEINS – FUNCTIONAL CONSEQUENCES»

ER_β + estradiol



Διπλωματική εργασία της φοιτήτριας: Τζιόρτζιου Μαρίας
Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Άννα-Μαρία Γ. Ψαρρά

ΛΑΡΙΣΑ 2016

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

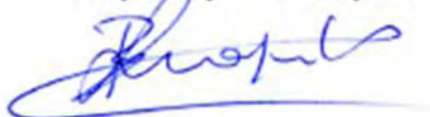
Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.



Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, ΤΒΒ, Π.Θ.



Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας Βιοχημείας - Μεταβολισμού, ΤΒΒ, Π.Θ.



Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	6
Περίληψη	7
Abstract	8
1. Εισαγωγή	10
1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς	10
1.2 Υποδοχείς στεροειδών ορμονών	12
1.3 Υποδοχείς οιστρογόνων	12
1.3.1 Υπότυποι και κατανομή στους ιστούς	13
1.3.2 Μηχανισμοί οιστρογονικής δράσης	16
1.3.3 Υποδοχέας οιστρογόνων β (ERβ)	19
1.3.3.i ERβ και μιτοχόνδρια	20
1.3.3.ii ERβ και καρκίνος	25
1.3.4 Οιστρογόνα και νευροπροστασία	25
2. Σκοπός	27
3. Πειραματικό μέρος	28
3.1 Οργανολογία	28
3.2 Υλικά	28
3.3 Κυτταρικές σειρές	34
3.4 Τεχνικές	34
• Στο χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών	34
• Εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών	41
4. Αποτελέσματα-Συζήτηση	52
4.1 Έλεγχος καθαρότητας κυτταρικών σειρών N2a mtGFP, N2a mtGFPERβ και N2a GFPERβ	52
4.2 Έλεγχος της επίδρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα οιστρογόνων β στη μιτοχονδριακή μεταγραφή	53
4.3 Χαρακτηρισμός των μορίων που αλληλεπιδρούν με τη μιτοχονδριακή μορφή του ERβ	55
5. Συμπεράσματα	92
6. Βιβλιογραφία	96

Εικόνες

Εισαγωγή

Εικόνα 1	11
Εικόνα 2	13
Εικόνα 3	14
Εικόνα 4	16
Εικόνα 5	18

Εικόνα 6	21
Εικόνα 7	23
Εικόνα 8	24

Πειραματικό μέρος

Εικόνα 9	37
Εικόνα 10	38

Αποτελέσματα-Συζήτηση

Εικόνα 11	52
Εικόνα 12	56
Εικόνα 13	57
Εικόνα 14	57
Εικόνα 15	58
Εικόνα 16	59
Εικόνα 17	81
Εικόνα 18	82
Εικόνα 19	83
Εικόνα 20	84
Εικόνα 21	85
Εικόνα 22	86
Εικόνα 23	87

Γραφήματα

Αποτελέσματα-Συζήτηση

Γράφημα 1	54
Γράφημα 2	87
Γράφημα 3	91

Πίνακες

Αποτελέσματα-Συζήτηση

Πίνακας 1	60
Πίνακας 2	71
Πίνακας 3	75
Πίνακας 4	88

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της παρούσας διπλωματικής, κυρία Ψαρρά Άννα-Μαρία, επίκουρο βιοχημείας TBB, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ενταχθώ στην ερευνητική της ομάδα, να δω και να κατανοήσω πλήθος τεχνικών, καθώς και να αποκτήσω επιστημονική σκέψη. Επίσης, την ευχαριστώ για την υπομονή, την υποστήριξη, το ενδιαφέρον και την εμπιστοσύνη της όλο αυτό το διάστημα. Ευχαριστώ ακόμη την κυρία Σκαμνάκη Βασιλική, λέκτορα βιοχημείας-μεταβολισμού TBB και τον κύριο Μαμούρη Ζήση, καθηγητή γενετικής ζωικών πληθυσμών, που αποτέλεσαν μέλη της τριμελούς μου επιτροπής. Επιπλέον, ευχαριστώ τον υποψήφιο διδάκτορα, Γοργογιέτα Βύρωνα, για τη συνεχή βοήθεια κι υποστήριξή του, για την υπομονή του και την ικανότητά και προθυμία του να επεξηγεί και να λύνει απορίες καθ' όλη τη διάρκεια της εργαστηριακής δουλειάς, τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή για την πολύτιμη βοήθειά του στη διαχείριση κι επεξεργασία του όγκου της πληροφορίας που προέκυψε από τη φασματομετρία μάζας, όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας στην οποία εντάχθηκα τόσο για την ομαλή συνεργασία όσο και για το ευχάριστο κλίμα, καθώς και όλα τα υπόλοιπα μέλη που στελεχώνουν το εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη βοήθεια και τον ζήλο που επέδειξαν κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τον συμφοιτητή μου, Υφαντή Άγγελο, για την έμπρακτη στήριξη, εμπύχωση και βοήθειά του αυτά τα τέσσερα χρόνια των σπουδών μου και ιδιαίτερα κατά τη δύσκολη και πιεστική περίοδο εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και όλους εκείνους τους ανθρώπους που γνώρισα κι ένιωσα φίλους μου για τις πολύ όμορφες στιγμές και βιώματα που μου χάρισαν και ήταν συνεχώς στο πλευρό μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βάθους καρδιάς την οικογένειά μου, που μου έδωσε τη δυνατότητα να σπουδάσω και ήταν και είναι πάντα δίπλα μου, σε κάθε δυσκολία ή χαρά, με υπομονή να με βοηθούν, να με στηρίζουν και να μου δίνουν κουράγιο να συνεχίσω την προσπάθεια στο πλαίσιο μιας εποικοδομητικής και δημιουργικής σταδιοδρομίας.

Περίληψη

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) είναι στεροειδείς υποδοχείς της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων με κύριο ενδογενή προσδέτη τους την 17β-οιστραδιόλη. Εντοπίζονται σε δύο μορφές, την α και τη β (ERα και ERβ), με διαφορετικό εντοπισμό σε επίπεδο ιστών, αλλά και με διαφορετική επίδραση σε επίπεδο κυττάρου. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον όλο και περισσότερων ερευνητών επικεντρώνεται στις δράσεις του ERβ στο μιτοχόνδριο, έπειτα από μελέτες που έδειξαν παρουσία του στα οργανίδια αυτά. Τα μιτοχόνδρια είναι ζωτικά οργανίδια για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο, καθώς και για την επιβίωσή του. Παρέχουν περισσότερο από το 90% της απαιτούμενης ενέργειας για το κύτταρο μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αλλά πέραν αυτού εμπλέκονται και σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή της ουρίας, στη βιοσύνθεση της αίμης, καθώς και στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια αποτελούν κομβικά σημεία ελέγχου στην απόκριση του κυττάρου σε καταστάσεις στρες, ρυθμίζοντας μεταξύ άλλων το οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, την κυτταρική διαφοροποίηση και τη γήρανση. Φέρουν το δικό τους γονιδίωμα, που όμως κωδικοποιεί για ένα πολύ μικρό μέρος των πρωτεϊνών που συνολικά εντοπίζονται εντός αυτών. Για το λόγο αυτό, η δραστηριότητά τους βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην εύρυθμη συνεργασία τους με τον πυρήνα, για τη σύνθεση και είσοδο των απαραίτητων μορίων που φέρουν ρόλους-κλειδιά για την ομαλή έκβαση του πλήθους των μεταβολικών και μη μονοπατιών που πραγματοποιούνται μερικώς ή κατ' εξοχήν στα μιτοχόνδρια. Ο ERβ μέσω του πυρήνα επηρεάζει τα επίπεδα μεταγραφής ρυθμιστών των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων με μιτοχονδριακή δράση ή τα επίπεδα μεταγραφής των κωδικοποιούμενων από τον πυρήνα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Παρόλα αυτά, μελέτες δείχνουν πως ο ERβ ασκεί και πιο άμεσες επιδράσεις στα μιτοχόνδρια, μέσω της εισόδου του εντός αυτών, που αφορούν στην κυτταρική επιβίωση σε καταστάσεις στρες, στο ρυθμό μεταγραφής των μιτοχονδριακών γονιδίων, στην παραγωγή ενέργειας κλπ. Στην παρούσα εργασία, ο στόχος ήταν διπλός. Αφενός, θέλαμε να ελέγξουμε την άμεση επίδραση του ERβ, εντός του μιτοχονδρίου, στη μιτοχονδριακή μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις Real Time PCR για τον έλεγχο των επιπέδων mRNA συγκεκριμένων μιτοχονδριακών γονιδίων που κωδικοποιούν για: κυτόχρωμα B, COX I, ND I, ATP6, 16s rRNA, έπειτα από καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς N2a mtGFP παρουσία α-αμανιτίνης, ενός εκλεκτικού αναστολέα της RNA πολυμεράσης II, και παρουσία ή απουσία του ενεργοποιητή του υποδοχέα, την οιστραδιόλη. Σε 2 από τα 5 μιτοχονδριακά γονίδια που μελετήθηκαν φάνηκε αύξηση των επιπέδων mRNA τους παρουσία οιστραδιόλης γεγονός που υποδηλώνει κάποια εμπλοκή του μιτοχονδριακού υποδοχέα στην αύξηση αυτή. Αφετέρου, θέλαμε να εξετάσουμε τα μόρια που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τον ERβ εντός του μιτοχονδρίου, ώστε να διευρύνουμε τις

γνώσεις μας σχετικά με τους πιθανούς ρόλους του μιτοχονδριακού υποδοχέα και τον χαρακτηρισμό των βιοχημικών μονοπατιών στην ρύθμιση των οποίων αυτός εμπλέκεται επηρεάζοντας έτσι την φυσιολογία ολόκληρου του κυττάρου. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση του ERβ με μιτοχονδριακή στόχευση και των μορίων που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα μαζί του με τη χρήση μιτοχονδριακών εκχυλισμάτων από κύτταρα N2a mtGFP και N2a mtGFPERβ και χαρακτηρισμός αυτών με φασματομετρία μάζας και πρωτεομική ανάλυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν εμπλοκή του υποδοχέα σε αρκετά μεταβολικά μονοπάτια των μιτοχονδρίων, όπως οξειδωτική φωσφορυλίωση, μεταβολισμό γλυκόζης, και κύκλο του κιτρικού οξέος, βιοσύνθεση στεροειδών και σε μηχανισμούς εισαγωγής στο μιτοχόνδριο με αρκετά από τα μόρια των μονοπατιών αυτών να σχετίζονται με την παθογένεια νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, όπως νόσος Parkinson, Alzheimer και Huntington. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, αρχίζουμε να σχηματίζουμε μια καλύτερη και ευρύτερη εικόνα της μιτοχονδριακής επίδρασης του ERβ, τόσο σε επίπεδο ρύθμισης της μεταγραφής όσο και σε επίπεδο συμμετοχής σε μεταβολικά μονοπάτια ύψιστης σημασίας για την ομαλή λειτουργία του κυττάρου. Παρόλα αυτά, η παρούσα εργασία αποτελεί ένα μικρό μόνο μέρος της μελέτης που πρέπει να ακολουθήσει ώστε να επιβεβαιωθούν τα παρατηρούμενα αποτελέσματα και να διαλευκανθεί η πλήρης δράση του ERβ στο μιτοχόνδριο.

Abstract

Estrogen receptors (ERs) are steroid receptors, members of the superfamily of nuclear receptors. Their principal ligand in live systems is 17β-estradiol and these receptors exist in two distinct types, ERα and ERβ, with a distinct expression pattern each one of them among different tissues. Furthermore, besides their different localization, they seem to differ as regard their target genes and their actions upon ligand binding and activation. In recent years studies focus on the effects of ERβ into the mitochondrion since increasing number of evidence demonstrate their mitochondrial localization. Mitochondria are organelles vital for the cell, since they are energy producing machines and also play a crucial role in the decision of the cell survival through the induction of apoptosis. They provide more than 90% of the energy required for the cell via the oxidative phosphorylation process and are also involved in many steps of intermediary metabolism, in urea production, heme biosynthesis and β-oxidation of fatty acids. Moreover, mitochondria are key components of the stress response as they play a central role in oxidative stress through generation of reactive oxygen species, cell differentiation and aging. Their genome codes only part of the total proteins detected therein. For this reason, they are based to a great extent to the nucleus, for the synthesis and transport of molecules into them, necessary for the numerous metabolic and non-metabolic pathways taking place into them. As a nuclear transcription factor, ERβ affects the levels of regulators of the synthesis of nuclear encoded mitochondrial targeted transcription factors or

the levels of transcription of the nuclear encoded proteins involved in oxidative phosphorylation. However, studies show that ER β exerts also direct effects on mitochondria, through its import, and regulation of cell survival under stress conditions, the rate of transcription of mitochondrial genes, energy production, etc. This current study is consisted of two parts. First, we wanted to test the effect of ER β concerning mitochondrial transcription of the OXPHOS genes. Thus, Real Time PCR was applied in order to check the mRNA levels of certain mitochondrial genes such as cytochrome B, COX I, ND I, ATP6, 16s rRNA, in N2a mtGFP treated with α -amanitin a selective inhibitor of RNA polymerase II, in the absence or presence of estradiol. An increase in the mRNA levels of 16s RNA and ATP was observed in the presence of estradiol, which indicates a direct involvement of mitochondrial ER β in mitochondrial transcription of these genes. Secondly, we wanted to characterize the molecules that direct or indirect interact with ER β within the mitochondrion in order to broaden our knowledge about the possible roles of the receptor in mitochondria and to clarify the pathways which are directly or indirectly regulated through ER β 's action in the mitochondrial environment, which may have a wider impact at the whole cell physiology. Therefore, we performed immunoprecipitation, of mitochondrial targeted ER β and their interacting molecules from mitochondrial extracts of N2a mtGFP and N2a mtGFPER β cells and proceeded to characterization of these molecules by applying mass spectrometry analysis. Further analysis of the results showed that the receptor involved in several metabolic pathways in mitochondria, such as oxidative phosphorylation, glycolysis, citric acid cycle, steroid biosynthesis and mitochondrial import mechanisms with many of the molecules of such paths associated with the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer and Huntington's. Our results shed light to the elucidation of the role of the mitochondrial ER β , in transcription regulation and in the regulation of many mitochondrial biochemical pathways of paramount importance for the smooth functioning of the cell. Nevertheless, this work is only a small part of the study needed to be followed to confirm the observed results and to further elucidate the effect and the exact mechanisms of action of ER β in the mitochondrion.

1. Εισαγωγή

1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς

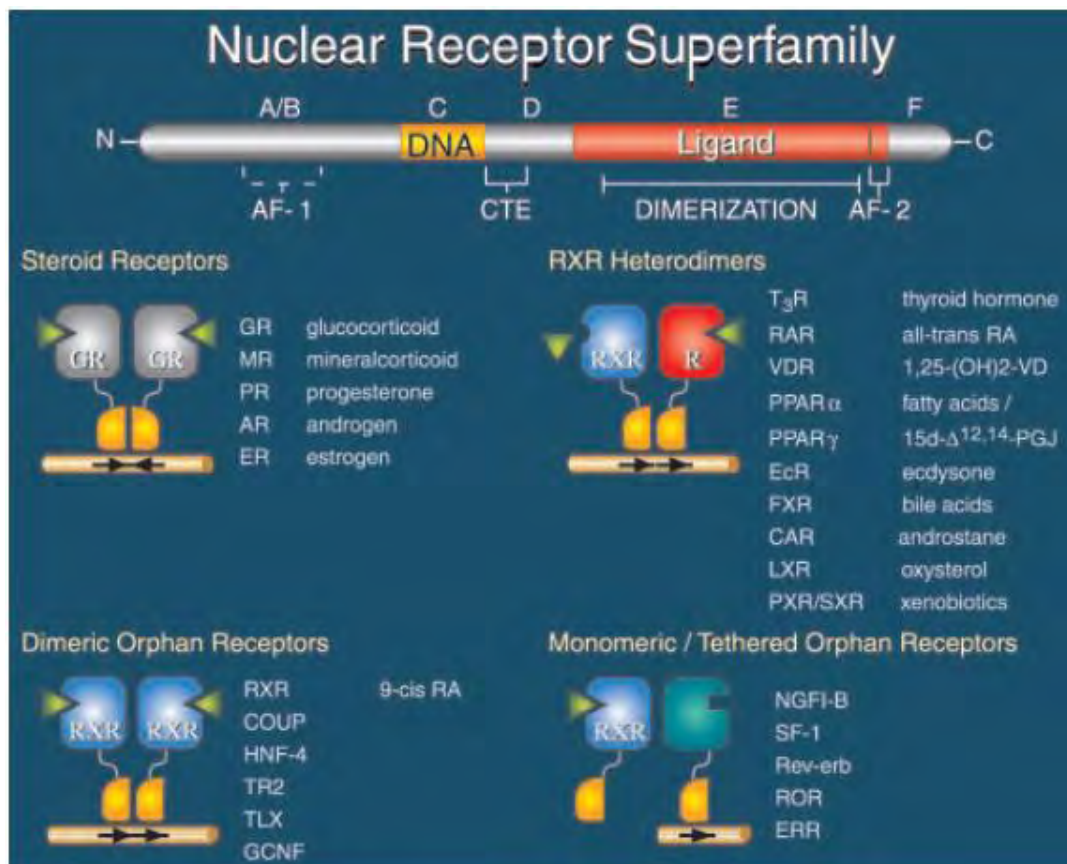
Ο όρος «υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων» περιγράφει μια ποικίλη σειρά μεταγραφικών παραγόντων, που περιλαμβάνουν τόσο υποδοχείς με γνωστούς προσδέτες, όσο και ορφανούς, που δεν έχει αναγνωρισθεί μέχρι τώρα ο προσδέτης τους. Σε αντίθεση με τους λοιπούς υποδοχείς, οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι διαλυτοί μιας και οι προσδέτες τους είναι λιπόφιλα μόρια που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη. Τα λιπόφιλα αυτά μόρια μπορεί να είναι στεροειδείς ορμόνες, καθώς και θυρεοειδικές ορμόνες, λευκοτριένια, λιπαρά οξέα και προσταγλανδίνες (Olefsky, 2001).

Τα μέλη της υπερικογένειας αυτής συμμετέχουν σε αρκετά μονοπάτια ρύθμισης της φυσιολογίας ενός οργανισμού, επηρεάζοντας πλήθος λειτουργιών, όπως τον έλεγχο της ομοιόστασης, την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό (Robinson et al, 2003). Η εμπλοκή τους στη ρύθμιση της μεταγραφής πραγματοποιείται μέσα από ποικίλους διακριτούς μηχανισμούς, οι οποίοι περιλαμβάνουν ενέργειες τόσο μεταγραφικής ενεργοποίησης, όσο και μεταγραφικής απενεργοποίησης. Αυτές οι ενέργειες μπορεί να είναι γενωμικές ή μη, εξαρτώμενες από την ενεργοποίηση του υποδοχέα από τον προσδέτη ή όχι, διαμεσολαβώντας στην επαγωγή ή άρση της μεταγραφικής καταστολής, στη μεταγραφική ενεργοποίηση, ή μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες στην trans καταστολή (Germain et al, 2006).

Όλοι οι υποδοχείς αυτής της οικογένειας εμφανίζουν μια εξελικτικά συντηρημένη δομική οργάνωση που αποτελείται από πέντε ή έξι επικράτειες ομολογίας (Germain et al, 2006). Πιο συγκεκριμένα, φέρουν ένα ευμετάβλητο τόσο σε μέγεθος όσο και στην αλληλουχία αμινοτελικό άκρο, την υψηλά συντηρημένη κεντρική επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain, DBD) που περιλαμβάνει δύο δάκτυλα ψευδαργύρου, μια μικρή περιοχή υπεύθυνη για τον πυρηνικό εντοπισμό του υποδοχέα, καθώς και την μετρίως συντηρημένη περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (Ligand Binding Domain, LBD), που εμπλέκεται και στον ολιγομερισμό του υποδοχέα. Ακόμη, στο καρβοξυτελικό άκρο ορισμένων υποδοχέων εντοπίζεται μια επιπλέον επικράτεια, γνωστή ως επικράτεια F, της οποίας ο ρόλος δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως (Sever et al, 2013).

Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση διαφορετικά κριτήρια, αλλά όσον αφορά στο μηχανισμό δράσης τους, η κατηγοριοποίησή τους περιλαμβάνει τέσσερις ομάδες. Οι υποδοχείς της ομάδας I, όπως οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών, στην ανενεργή τους μορφή, βρίσκονται σε σύμπλοκα με πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat shock proteins, Hsps). Η σύνδεση του προσδέτη επάγει αλλαγή στη διαμόρφωση του υποδοχέα, ο οποίος πλέον «απελευθερώνεται» από το σύμπλοκο με τις Hsps κι επιτρέπεται ο ομοδιμερισμός του. Εκτίθεται η

επικράτεια που φέρει το σήμα για τον πυρηνικό εντοπισμό κι έτσι επέρχεται η μεταφορά του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέτη στον πυρήνα (Sever et al, 2013). Εκεί η DBD καθενός από τα δύο μονομερή προσδένεται σε αλληλουχίες DNA γνωστές ως στοιχεία απόκρισης στην ορμόνη (Hormone Response Elements, HREs) που υπάρχουν ως ανεστραμμένες επαναλήψεις (Olefsky, 2001). Οι υποδοχείς της ομάδας II, όπως ο υποδοχέας του ρετινοϊκού οξέος ή των θυρεοειδικών ορμονών, βρίσκονται εξ αρχής στον πυρήνα και δη προσδεμένοι -ακόμα κι απουσία του προσδέτη- στα HREs που βρίσκονται σε ευθείες κι όχι ανεστραμμένες επαναλήψεις. Σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον ρετινοειδή υποδοχέα X και απουσία του προσδέτη καταστέλλουν τη μεταγραφή, ενώ παρουσία του, συμβαίνει το αντίθετο (Sever et al, 2013). Τέλος, οι υποδοχείς των ομάδων III και IV περιλαμβάνουν «ορφανούς» πυρηνικούς υποδοχείς που λειτουργούν είτε ως ομοδιμερή που προσδέονται σε HREs ευθέων επαναλήψεων (ομάδα III) είτε ως μονομερή (ομάδα IV) (Olefsky, 2001).



Εικόνα 1. Παρουσίαση της δομικής οργάνωσης των πυρηνικών υποδοχέων. Στην εικόνα φαίνονται οι επικράτειες από τις οποίες μπορεί να απαρτίζεται ο υποδοχέας (A-F) από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο. Πολλά μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων σχηματίζουν ομο- ή ετερο-διμερή και τα αμινοξέα που συμμετέχουν στον ολιγομερισμό εντοπίζονται κυρίως στο LBD. Επίσης, μέσω του DBD προσδένονται σε HREs που βρίσκονται σε ευθείες ή ανεστραμμένες επαναλήψεις στο DNA (Olefsky, 2001).

1.2 Υποδοχείς στεροειδών ορμονών

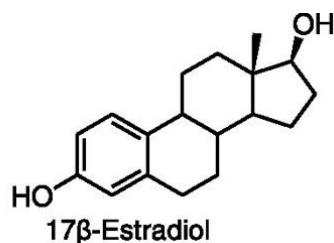
Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Μπορεί να εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ή τον πυρήνα, αλλά τελευταίες μελέτες δείχνουν ότι υπάρχουν και μορφές αυτών συνδεδεμένες με την κυτταρική μεμβράνη. Η ενεργοποίησή τους είναι προσδετο-εξαρτώμενη και η διαδικασία δράσης τους καθώς και η γενική δομική τους οργάνωση έχουν ήδη περιγραφεί στην προηγούμενη ενότητα. Ωστόσο, πέρα από τη γενωμική τους δράση που είναι πιο χρονοβόρα, αφού απαιτούνται αρκετές ώρες για να αλλάξει το πρωτεϊνικό προφίλ ενός κυττάρου αλλά και οι νέες πρωτεΐνες να ασκήσουν τη δράση τους, επιδρούν στο κύτταρο και με πιο άμεσο τρόπο μέσω μη γενωμικών δράσεων. Πιο συγκεκριμένα, χάρη στους υποτύπους που βρίσκονται συνδεδεμένοι με την κυτταρική μεμβράνη, οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών ενεργοποιούν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια και καταρράκτες αντιδράσεων που μέσα σε λίγα μόλις λεπτά επιφέρουν αλλαγές στην κυτταρική λειτουργία (Gupta et al, 2013).

Προσδέτες των υποδοχέων της κατηγορίας αυτής αποτελούν οι στεροειδείς ορμόνες, λιπόφιλα μόρια παράγωγα της χοληστερόλης. Διακρίνονται στα φυλετικά στεροειδή, που περιλαμβάνουν τα οιστρογόνα, την προγεστερόνη και τα ανδρογόνα και συντίθενται στις γονάδες κατά κύριο λόγο, στα κορτικοστεροειδή, που περιλαμβάνουν τα γλυκοκορτικοειδή και αλατοκορτικοειδή και συντίθενται στον φλοιό των επινεφριδίων, και τέλος σε ομοιάζουσες με τα στεροειδή ενώσεις, όπως είναι το ρετινοϊκό οξύ καθώς και η βιταμίνη D με τα παράγωγά της (Gupta et al, 2013). Οι στεροειδείς αυτές ορμόνες έχουν ενδροκρινή δράση, δηλαδή αφού συντεθούν από τα αντίστοιχα ενδροκρινή κύτταρα, απελευθερώνονται στην κυκλοφορία και μέσω του αίματος διανύουν μεγάλες αποστάσεις έως ότου φτάσουν στα κύτταρα-στόχους για να ασκήσουν τη δράση τους. Ωστόσο, λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα τους, δεν μπορούν να ταξιδέψουν ως διαλυτά μόρια, αλλά συνδεδεμένα με ειδικές πρωτεΐνες-μεταφορείς του αίματος (Beato et al, 2000). Αφότου διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη με απλή διάχυση, αλληλεπιδρούν με τον αντίστοιχο υποδοχέα, ο οποίος μπορεί να είναι υποδοχέας οιστρογόνων, ανδρογόνων, γλυκοκορτικοειδών κτλ. Εφόσον, αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτελεί η δράση του υποδοχέα οιστρογόνων β , θα αναλυθεί περαιτέρω αυτή η ομάδα υποδοχέων στεροειδών ορμονών.

1.3 Υποδοχείς οιστρογόνων

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs) είναι υποδοχείς στεροειδών ορμονών με δράση μεταγραφικών παραγόντων που ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Μέσω της ενεργοποίησής τους από τους προσδέτες τους επηρεάζουν πολλές φυσιολογικές λειτουργίες στα θηλαστικά, με κυριότερες, αλλά χωρίς να περιορίζονται σε αυτές, την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη των οργάνων, τη διαμόρφωση των οστών, την

υγεία του καρδιαγγειακού συστήματος, τη γνώση, καθώς και τη συμπεριφορά και στα δύο φύλα (Lee et al, 2012). Επιπλέον, από αναλύσεις της σχέσης των ERs με τον κυτταρικό κύκλο, αποκαλύφθηκε ότι ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Έτσι λοιπόν, λόγω της ευρείας δράσης τους στην φυσιολογία του ανθρώπου, έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται και στην ανάπτυξη ή την πρόοδο πολυάριθμων ασθενειών. Κυριότερες από αυτές είναι ο καρκίνος και πιο ειδικά ο καρκίνος του μαστού, των ωθηκών, του παχέος εντέρου, του προστάτη και του ενδομητρίου, στους οποίους οι ERs μπορούν να αξιοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες. Ακόμη, μελέτες δείχνουν την εμπλοκή τους και σε νόσους όπως η οστεοπόρωση, η παχυσαρκία, νευροεκφυλιστικές νόσοι, αλλά και καρδιαγγειακές παθήσεις (Deeroo et al, 2006). Προσδέτης τους είναι τα οιστρογόνα, με το πιο δραστικό οιστρογόνο που παράγεται στον οργανισμό να είναι η 17β- οιστραδιόλη (E2).



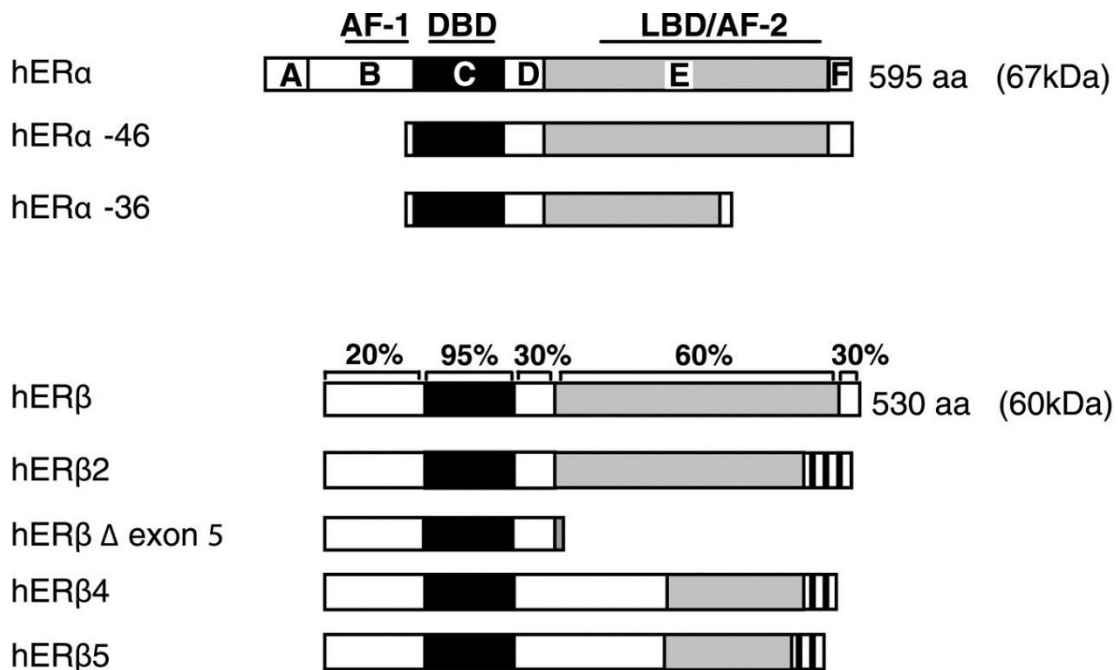
Εικόνα 2. Μοριακή δομή της ενδογενούς 17β-οιστραδιόλης (τροποποίηση εικόνας από Heldring et al, 2007)

1.3.1 Υπότυποι και κατανομή στους ιστούς

Οι ERs υπάρχουν σε δύο κύριες μορφές, τον υποδοχέα οιστρογόνων α (Estrogen Receptor α, ERα) και τον υποδοχέα οιστρογόνων β (Estrogen Receptor β, ERβ), ενώ θεωρείται ότι υπάρχουν και υποπληθυσμοί των κλασικών ERs που εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη. Οι ERα και ERβ κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, τα ESR1 και ESR2, που εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Πιο αναλυτικά, το ESR1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 6 και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 595 αμινοξικών καταλοίπων, μοριακού βάρους 66 KDa, ενώ το ESR2 εδράζεται στο χρωμόσωμα 14 και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 530 αμινοξικών καταλοίπων, μοριακού βάρους 60 KDa (Lee et al, 2012). Ακόμη, έχουν βρεθεί και αρκετά εναλλακτικά μετάγραφα και για τους δύο υποδοχείς.

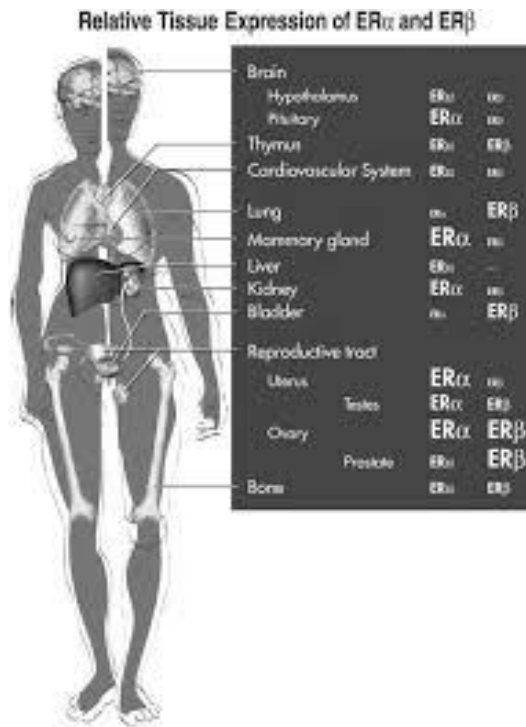
Παρόλο που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, τόσο ο ERα όσο και ο ERβ, διαθέτουν τη χαρακτηριστική δομική οργάνωση των λειτουργικών επικρατειών που αποτελούν χαρακτηριστικό των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη ενότητα. Ακόμη, συγκεκριμένες λειτουργικές επικράτειες των παραπάνω υποδοχέων εμφανίζουν υψηλό βαθμό ομολογίας και δεν είναι άλλες από τις επικράτειες DBD και LBD, με το πρώτο να εμφανίζει 97% ομολογία και το δεύτερο 60%. Αντίθετα, στο αμινοτελικό άκρο που

όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα των πυρηνικών υποδοχέων εμφανίζει μεγάλη ευμεταβλητότητα, το ποσοστό της ομολογίας αγγίζει μόλις το 20-30%. Από τα παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι δύο αυτοί υπότυποι αλληλεπιδρούν με πανομοιότυπες αλληλουχίες στο DNA που αποτελούν στοιχεία απόκρισης σε οιστρογόνα (Estrogen Response Elements, EREs) κι εμφανίζουν παρόμοια συγγένεια σύνδεσης με τους ενδογενείς αλλά και με συνθετικούς προσδέτες (Hall et al, 2001). Να αναφερθεί ακόμη ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση διευκολύνεται από δύο διακριτές επικράτειες (Activation Functions, AF), την ιδιοσυστατικά ενεργή AF-1 που εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο και την εξαρτώμενη από τη σύνδεση του προσδέτη AF-2 που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο, στην επικράτεια LBD. Και οι δύο αλληλουχίες AF στρατολογούν μια σειρά συν-ρυθμιστικών πρωτεϊνών στον συνδεδεμένο με το DNA υποδοχέα (Heldring et al, 2007). Ο ERβ στον άνθρωπο φαίνεται να φέρει μια πιο «αδύναμη» στην απόκριση επικράτεια AF-1, ενώ όσον αφορά στην επικράτεια F και των δύο μορφών, αυτή φαίνεται να επηρεάζει τη δραστηριότητά τους, και οι διαφορές στην επικράτεια αυτή, μεταξύ των δύο υποδοχέων, ίσως να συμβάλουν στην ικανότητα των ERs να ελέγχουν επιλεκτικά την μεταγραφική δραστηριότητα συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων(Lee et al, 2012).



Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των δύο ισομορφών των ERs στον άνθρωπο και των εναλλακτικών τους μεταγράφων. Απεικονίζονται οι έξι επικράτειες (A-F) με τα αντίστοιχα ποσοστά ομολογίας μεταξύ ERα και ERβ. Όπως φαίνεται ο ERβ έχει μικρότερο μοριακό βάρος από τον ERα και περισσότερα εναλλακτικά μετάγραφα. Τα σημεία με τις κάθετες γραμμές στα μετάγραφα 2, 4 & 5 του ERβ απεικονίζουν τις διαφορές αυτών στο καρβοξυτελικό τους άκρο (Heldring et al, 2007).

Μελέτες για την κατανομή των ERs στους ιστούς, μαρτυρούν την ύπαρξη ενός ευκρινούς μοτίβου έκφρασης για τον κάθε έναν από τους δύο υποτύπους. Από τη μία, ο ERα αποτελεί την επικρατούσα μορφή υποτύπου που εκφράζεται σε μαστούς, μήτρα, κόλπο και πολλά ακόμη όργανα-στόχους των οιστρογόνων, ενώ από την άλλη ο ERβ εμφανίζει ένα πιο περιορισμένο μοτίβο έκφρασης κι εντοπίζεται πρωτίστως σε ωοθήκες, προστάτη, όρχεις, σπλήνα, πνεύμονες, υποθάλαμο και θύμο αδένες, ενώ δεν εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στη μήτρα. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί διαφορές και στην τοπική έκφραση των δύο υποτύπων στον εγκέφαλο. Αυτή λοιπόν η διαφορά στην κατανομή των ERα και ERβ, έχει ως αποτέλεσμα διακριτές βιολογικές λειτουργίες για τους ERs κάτι που ενισχύεται από τους διαφορετικούς φαινοτύπους που παρατηρούνται σε knock-out ποντίκια για τον κάθε έναν από τους δύο ERs ξεχωριστά (Hall et al, 2001). Πιο ειδικά, σε knock-out ποντίκια για τον ERα, τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά ήταν στείρα, ενώ στα knock-out ποντίκια για τον ERβ, η γονιμότητα των θηλυκών ήταν σχετικά μειωμένη, ενώ των αρσενικών φυσιολογική. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν έναν πιο σημαντικό ρόλο του ERα στην ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος απ' ό,τι του ERβ (Lee et al, 2012). Να σημειωθεί ακόμα ότι οι δύο υποδοχείς μπορεί να αναγνωρίζουν ίδιες αλληλουχίες DNA, αλλά οι στόχοι τους δεν είναι πάντα ίδιοι, όπως έχει αποδειχθεί από πλήθος πειραμάτων, το οποίο επίσης βοηθά στην κατανόηση των διαφορών που παρατηρούνται στις δράσεις τους όσον αφορά σε εξειδίκευση ιστού (Zhao et al, 2008). Επιπλέον, όταν οι ERα και ERβ συνυπάρχουν στα κύτταρα ενός ιστού, ο ERβ φαίνεται να ανταγωνίζεται την εξαρτώμενη από τον ERα μεταγραφή και η τελική απόκριση να επηρεάζεται από την αναλογία αυτών των δύο, ενώ ο μοριακός μηχανισμός αυτής της δράσης βρίσκεται ακόμα υπό διερεύνηση (Heldring et al, 2007). Ωστόσο, το παραπάνω δεν είναι απόλυτο, καθώς μπορεί να υπάρξει και συνεργασία των δύο υποδοχέων.



Εικόνα 4. Παρουσίαση της γενικής κατανομής των ER α και ER β στους διαφορετικούς ιστούς
(Mechanisms of Estrogen Receptor-Mediated Agonistic and Antagonistic Effects)

1.3.2 Μηχανισμοί οιστρογονικής δράσης

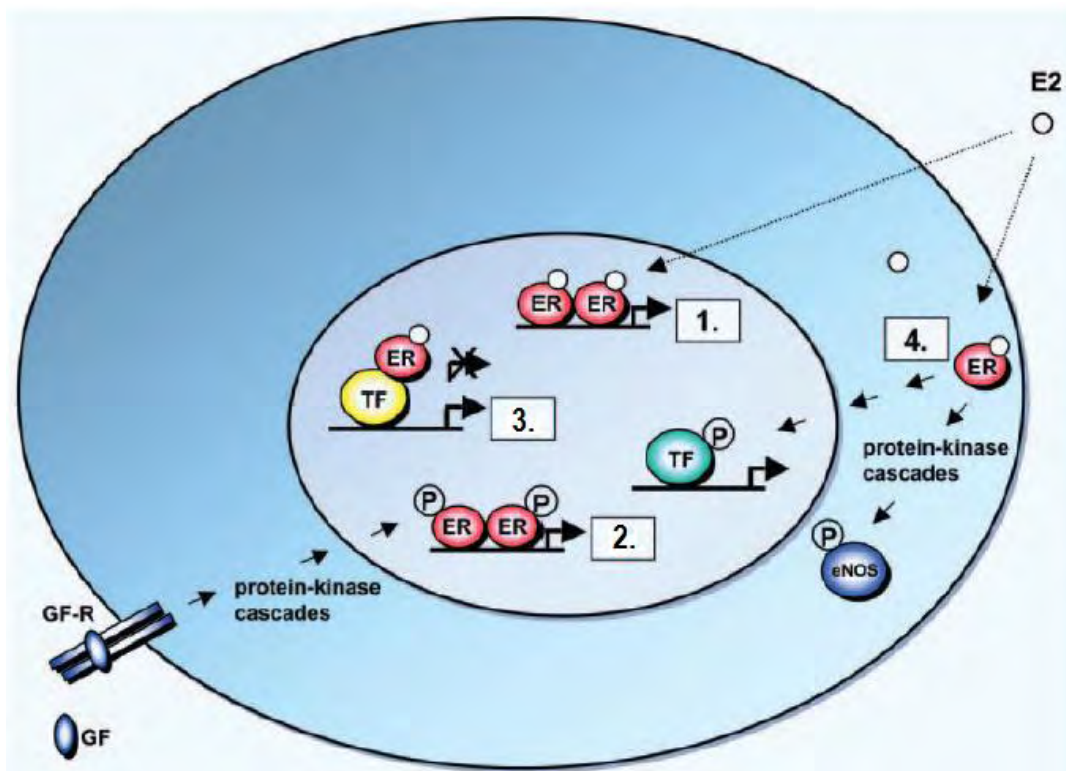
Μελέτες δείχνουν ότι υπάρχουν αρκετά διακριτά μονοπάτια μέσω των οποίων τα οιστρογόνα και οι υποδοχείς τους ίσως να ρυθμίζουν τις διάφορες βιολογικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται. Τα μονοπάτια αυτά περιλαμβάνουν α) τον κλασσικό μηχανισμό εξαρτώμενο από τον προσδέτη, β) την ενεργοποίηση των ERs ανεξάρτητα από την παρουσία του προσδέτη, γ) την γενωμική δράση των ERs ανεξάρτητα από την παρουσία EREs στον υποκινητή των γονιδίων και δ) τη μη γενωμική δράση των οιστρογόνων

Αναλυτικότερα, α) Απουσία της ορμόνης, οι ERs βρίσκονται σε ανενεργή μορφή λόγω του ότι αλληλεπιδρούν με την Hsp90 που παρεμποδίζει την αποικοδόμηση του υποδοχέα και βοηθά στη σωστή διαμόρφωση του υποδοχέα. Παρουσία του προσδέτη, οι ERs, φωσφορυλιώνονται, διμερίζονται κι ασκούν τη δράση τους ως μεταγραφικοί παράγοντες, αλληλεπιδρώντας με τα EREs. Αυτή η αλληλεπίδραση επιτρέπει την κάμψη του DNA που πλέον διευκολύνει την αλληλεπίδραση του συμπλόκου ER-E2 με το μηχανισμό της μεταγραφής καθώς και με συνενεργοποιητές ή συγκαταστολείς, ακετυλοτρανσφεράσες και απακετυλάσες των ιστονών (Lee et al, 2012). Έτσι, η απόκριση του οργάνου-στόχου στη δράση των οιστρογόνων εξαρτάται αφενός μεν από το ρεπερτόριο των ρυθμιστικών παραγόντων που διαθέτει, αφετέρου δε από τα χαρακτηριστικά των υποκινητών των γονιδίων που αποκρίνονται στα οιστρογόνα (Heldring et al, 2007).

β) Εκτός από τη μεσολαβούμενη από την ορμόνη ενεργοποίηση του υποδοχέα, είναι πλέον αποδεκτό ότι η λειτουργία των ERs μπορεί να ρυθμίζεται από εξωκυτταρικά σήματα απουσία της E2. Τα ευρήματα αυτά εστιάζουν πρωτίστως στην ικανότητα πεπτιδίων που λειτουργούν ως αυξητικοί παράγοντες να ενεργοποιούν τους ERs και να αυξάνουν την έκφραση γονιδίων που αποτελούν στόχους των ERs. Η ενεργοποίηση επέρχεται από κινάσες οι οποίες εμπíπτουν στον καταρράκτη αντιδράσεων που ενεργοποιούν οι αυξητικοί παράγοντες. Αυτές φωσφορυλιώνουν τους ERs σε κατάλληλα αμινοξικά κατάλοιπα, με αποτέλεσμα να επιφέρουν τον διμερισμό και την ενεργοποίηση αυτών, που προσδένονται στα EREs χωρίς να χρειάζονται την E2. Ωστόσο, ο βιολογικός ρόλος αυτών των διαδικασιών δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος. Είναι πιθανό ότι το ξεχωριστό αυτό μονοπάτι επιτρέπει την ενεργοποίηση των ERs παρουσία χαμηλών επίπεδων E2, όπως συμβαίνει στα αρσενικά. Εναλλακτικά, αυτό το φαινόμενο ίσως να χρησιμεύει ως μηχανισμός ενίσχυσης των μονοπατιών των αυξητικών παραγόντων κι έτσι να εντείνουν τη μιτογένεση σε ιστούς που εκφράζουν ERs (Hall et al, 2001).

γ) Οι παραπάνω μηχανισμοί εξηγούν τη ρύθμιση γονιδίων από τους ERs όταν φέρουν EREs στον υποκινητή τους. Ωστόσο, από αναφορές σε μελέτες για επαγωγή γονιδίων από το σύμπλοκο ER-E2 στους υποκινητές των οποίων δεν έχουν εντοπιστεί EREs ή ομοιάζουσες με αυτά αλληλουχίες, οδήγησε στην ανακάλυψη ότι οι ERs αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες, μπορούν να ασκήσουν τη γενωμική τους δράση χωρίς άμεση σύνδεση στο DNA (Hall et al, 2001). Αυτός ο μηχανισμός χρησιμοποιείται από αρκετά μέλη της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και χαρακτηρίζεται ως διασταυρούμενη επικοινωνία στη μεταγραφή (transcriptional cross talk). Στην όλη αυτή διαδικασία φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο η επικράτεια DBD των ERs, πιθανότατα για να συμβούν σωστά οι απαραίτητες αλληλεπιδράσεις με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ή για να βοηθήσει στη στρατολόγηση επιπλέον συνενεργοποιητών στον υποκινητή του εκάστοτε γονιδίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της μη εξαρτώμενης από τα EREs γενωμικής δράσης αποτελεί η αλληλεπίδραση των ERs με τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1 (Activation Protein 1), ο οποίος είναι ετεροδιμερές αποτελούμενο από πρωτεΐνες της οικογένειας Fos, Jun κλπ. Τα γονίδια που υπόκεινται σε τέτοια ρύθμιση μπορεί είτε να ενεργοποιούνται, όπως συμβαίνει με το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον IGF-1 (Insulin Like Growth Factor-1) είτε να καταστέλλονται, όπως συμβαίνει με το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (Björnström et al, 2005). Μελέτες δείχνουν ότι η μεταγραφική ρύθμιση μέσω αυτού του μονοπατιού απαιτεί τη συμμετοχή και των δύο επικρατειών AF των ERs που συνεισφέρουν στην προσέλκυση περισσότερων συνενεργοποιητών ώστε να αλληλεπιδράσουν με το μηχανισμό της μεταγραφής. Παρόλα αυτά ο ERβ δεν διαθέτει τόσο λειτουργική επικράτεια AF-1, γεγονός που σημαίνει ότι δεν μπορεί να επέμβει στην ρύθμιση γονιδίων μέσω αυτού του μονοπατιού, διαφοροποιώντας περαιτέρω τη βιολογική δράση των ERα και ERβ (Hall et al, 2001).

δ) Έχουν παρατηρηθεί και πιο άμεσες επιπτώσεις της δράσης των ERs σε οστά, μαστούς, αγγεία και νευρικό σύστημα, μέσα σε μόλις μερικά λεπτά από την έκθεση σε E2, που προτείνουν ότι οι ERs ίσως εξάγουν μη γενωμικές επιδράσεις. Αυτές οι άμεσες επιπτώσεις περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση κινασών και φωσφατασών που συμμετέχουν σε πλήθος αντιδράσεων, έχοντας ποικίλα αποτέλεσμα, όπως την αύξηση της ροής ιόντων διαμέσου των μεμβρανών, την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης για παραγωγή cAMP κλπ (Heldring et al, 2007). Αυτό το μονοπάτι πιθανότατα διεξάγεται μέσω των υποπληθυσμών που εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη. Δεν είναι ακόμη πολλά γνωστά για τους υποπληθυσμούς αυτούς. Μελέτες σε πειραματόζωα δείχνουν ότι και αυτοί οι υποδοχείς έχουν ίδια δομή με τους πυρηνικούς με τη διαφορά ότι βρίσκονται συζευγμένοι με G πρωτεΐνες. Στον αντίποδα, μελέτες άλλης ομάδας δείχνουν την ύπαρξη μεμβρανικών ERs διακριτών από τους πυρηνικούς. (Kelly & Wagner, 1999). Περαιτέρω μελέτες για τον πλήρη προσδιορισμό αυτών των υποδοχέων και αυτής της μη γενωμικής δράσης σαφώς και είναι απαραίτητες, καθώς το μονοπάτι αυτό θα μπορέσει να χρησιμοποιηθεί και ως στόχος φαρμάκων (Hall et al, 2001).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών οιστρογονικής δράσης.

1. Ο κλασικός μηχανισμός δράσης των ERs. Το σύμπλοκο E2- ERs προσδέεται απευθείας στα EREs που φέρουν οι υποκινητές των γονιδίων-στόχων. 2. Ενεργοποίηση των ERs ανεξάρτητα από την παρουσία του προσδέτη. Οι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν καταρράκτες αντιδράσεων στα οποία συμμετέχουν κινάσες που οδηγούν στη φωσφορυλίωση και άρα ενεργοποίηση των ERs, οι οποίοι προσδέονται στα EREs απουσία της E2. 3. Γενωμική δράση των ERs ανεξάρτητα από την παρουσία EREs στον υποκινητή των γονιδίων. 4. Μη γενωμικές δράσεις. Το μεμβρανικό σύμπλοκο E2-ERs ενεργοποιεί καταρράκτες αντιδράσεων μέσω των κινασών που οδηγεί με τη σειρά του σε

αλλαγή των ιδιοτήτων των πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος, όπως για παράδειγμα η ενεργοποίηση της ενδοθηλιακής νιτρικής συνθάσης (eNOS) (Björnström et al, 2005).

1.3.3 Υποδοχέας οιστρογόνων β (ERβ)

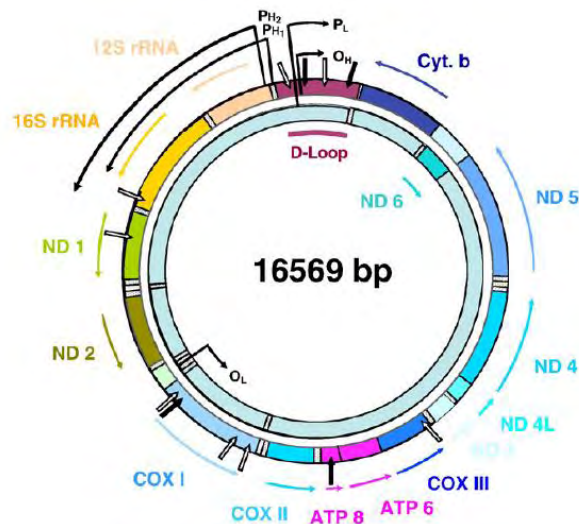
Ο ERβ κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1996 από τον προστάτη ενός αρουραίου, από μια ερευνητική ομάδα, ενώ έψαχναν για εναλλακτικούς υποδοχείς ανδρογόνων (Kuiper et al, 1996). Έκτοτε, είναι γνωστό ότι το γονίδιο ESR2 που κωδικοποιεί για τον ERβ στον άνθρωπο εδράζεται στην περιοχή q23.2 του χρωμοσώματος 14. Η πρωτεΐνη παράγεται από 8 εξόνια, ενώ έχουν βρεθεί αρκετές ισομορφές λόγω εναλλακτικού ματίσματος που μπορεί να διαφέρουν σε κάποια από τα εξόνια και κατ' επέκταση σε κάποιες λειτουργικές περιοχές. Δεδομένου του ότι στην προηγούμενη ενότητα οι υποδοχείς οιστρογόνων περιγράφηκαν πολύ αναλυτικά, δεν θα ξαναγίνει αναφορά στη δομή του ERβ, παρά μόνο θα τονιστούν κάποιες βασικές διαφορές του σχετικά με τον ERα. Πρώτον, η επικράτεια AF-1 του ERβ φαίνεται να εμφανίζει μειωμένη λειτουργικότητα, γεγονός που σημαίνει ότι βασίζεται πιο πολύ στην επικράτεια AF-2 για τη μεταγραφική του δραστηριότητα κι έτσι δεν μπορεί να συμμετάσχει πλήρως σε καθένα από τα τέσσερα μονοπάτια της οιστρογονικής δράσης που περιγράφηκαν παραπάνω. Δεύτερον, στην επικράτεια LBD, η κοιλότητα σύνδεσης του προσδέτη είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με του ERα κι αυτό ίσως να εμπλέκεται στην επιλεκτική συγγένεια που εμφανίζουν οι δύο υποδοχείς για τους προσδέτες (Zhao et al, 2008). Τρίτον, ενώ ο ERα και ο ERβ έχουν υψηλό ποσοστό ομολογίας στην επικράτεια DBD, ο ERβ εμφανίζει μικρότερη συγγένεια για τα EREs. (Deroo et al, 2010). Τα παραπάνω συνηγορούν στο ότι ο ERβ δεν είναι τόσο ισχυρός μεταγραφικός παράγοντας όσο ο ERα κι όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, δεν φαίνεται να έχει τόσο ισχυρό ρόλο στην ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος όπως ο ERα (Yang et al, 2004). Η ανακάλυψή του και η διαφορετική κατανομή και βιολογική του δράση σε σχέση με τον ERα κέντρισαν το ενδιαφέρον των ερευνητών, αλλά υπάρχουν δύο κύρια εμπόδια στη μελέτη του συγκεκριμένου υποδοχέα. Κατ' αρχάς, δεν υπάρχουν αθάνατες κυτταρικές σειρές που να εκφράζουν ενδογενώς τον ERβ, κατά προτίμηση απουσία του ERα για να είναι πιο ξεκάθαρα τα αποτελέσματα. Η εύρεση τέτοιων κυτταρικών σειρών αποτελεί πρόκληση και χρήζει ιδιαίτερης σημασίας. Έπειτα, δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα αντισώματα έναντι του ERβ με υψηλή εξειδίκευση για την ανίχνευση των ενδογενών επιπέδων του (Deroo et al, 2010). Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω, πολλά αποτελέσματα ερευνών σχετικά με τον ERβ είτε δεν είναι πλήρως κατανοητά είτε δεν είναι ευρέως αποδεκτά.

Το 2004, μια ομάδα ερευνητών δημοσίευσε ότι είχε εντοπίσει τον ERβ στα μιτοχόνδρια πολλών διαφορετικών κυτταρικών σειρών, ανεξάρτητα από το στάδιο διαφοροποίησής τους και είχε ελέγξει αυτή την παρατήρηση με πλήθος διαφορετικών τεχνικών. Όλα τα αποτελέσματα συνηγορούσαν στο ότι ο ERβ αποτελεί μιτοχονδριακή πρωτεΐνη, γεγονός που ίσως να εξηγεί όσα αναφέρθηκαν παραπάνω περί μη ισχυρής δράσης του ERβ ως πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα. (Solakidi et al 2006; Chen et al 2009; Yang et al, 2004) Ενώ, μελέτες των γονιδίων-στόχων του

στον πυρήνα, δείχνουν ότι πρόκειται στην πλειοψηφία τους για γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (Simpkins et al, 2008). Έκτοτε, ακολούθησαν πολλές μελέτες για τον έλεγχο της μιτοχονδριακής του επίδρασης.

1.3.3.i ERβ και μιτοχόνδρια

Τα μιτοχόνδρια είναι ζωτικά οργανίδια για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο, καθώς και για την επιβίωσή του. Παρέχουν περισσότερο από το 90% της απαιτούμενης ενέργειας για το κύτταρο μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αλλά πέραν αυτού εμπλέκονται και σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή της ουρίας, στη βιοσύνθεση της αίμης, καθώς και στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια αποτελούν συστατικά-κλειδιά στην απόκριση του κυττάρου σε καταστάσεις στρες, παίζουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, στην κυτταρική διαφοροποίηση και τη γήρανση (Psarra and Sekeris, 2008). Κάθε οργανίδιο φέρει πολλαπλά αντίγραφα ενός κυκλικού μορίου DNA δίχως ιντρόνια. Στον άνθρωπο, το γονιδίωμα αυτό έχει μέγεθος 16.6 kb και φέρει 37 γονίδια που κωδικοποιούν για περίπου 13 πρωτεΐνες από τις 3000 που εντοπίζονται συνολικά στα οργανίδια αυτά. Από τα 37 αυτά γονίδια, τα 13 κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας, και τα εναπομείναντα κωδικοποιούν για δύο rRNAs και 22 tRNAs που χρειάζονται για τη σύνθεση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (Chen et al, 2009). Οι δύο αλυσίδες του DNA έχουν μια ασύμμετρη κατανομή των πουρινών και των πυριμιδινών, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται βαριές και ελαφριές αλυσίδες. Η ελαφριά αλυσίδα μεταγράφεται από έναν κυρίαρχο υποκινητή, ενώ η βαριά από δύο γειτονικούς υποκινητές που εντοπίζονται στην περιοχή ελέγχου που περιλαμβάνει και μια εκτοπισμένη θηλιά (D-loop) (Psarra and Sekeris, 2008). Στο D-loop έχουν βρεθεί 4 θέσεις που θεωρούνται EREs στο μιτοχόνδριο (mtEREs) και μελέτες έχουν δείξει την πρόσδεση ERs και άλλων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στις θέσεις αυτές (Sekeris, 1990; Chen et al, 2009).



Εικόνα 6. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών έχει μήκος 16.6 kb και κωδικοποιεί για ένα μόνο μέρος από τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την πλήρη λειτουργικότητά του, γι αυτό και βρίσκεται σε συνεχή επικοινωνία με τον πυρήνα. Οι δύο αλυσίδες του DNA έχουν μια ασύμμετρη κατανομή των πουρινών και των πυριμιδινών, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται βαριές και ελαφριές αλυσίδες. Η ελαφριά αλυσίδα μεταγράφεται από έναν κυρίαρχο υποκινητή (PL), ενώ η βαριά από δύο γειτονικούς υποκινητές (PH1 & PH2) που εντοπίζονται στην περιοχή ελέγχου που περιλαμβάνει και μια εκτοπισμένη θηλιά (D-Loop). Η μεταγραφή που ξεκινά από τους υποκινητές PH2 & PL δίνει πολυκιστρονικά μόρια mRNA που έχουν σχεδόν το μήκος ολόκληρου του mtDNA, ενώ από τον PH1 τα μόρια mRNA έχουν πιο μικρό μήκος (Psarra and Sekeris, 2008).

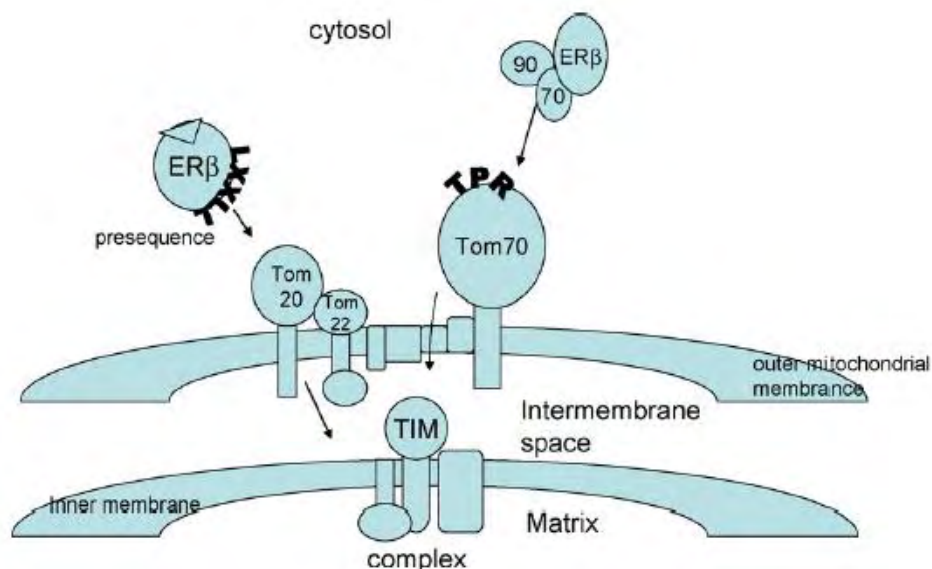
Εφόσον τα ίδια τα μιτοχόνδρια μπορούν να συνθέσουν μόνο ένα πολύ μικρό μέρος από τα συστατικά που χρειάζονται για την πλήρη λειτουργία τους, είναι πολύ σημαντική η επικοινωνία τους με το υπόλοιπο κύτταρο. Άρα λοιπόν, η δραστηριότητά τους βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην είσοδο και κατάλληλη αναδίπλωση πρωτεϊνών. Οι περισσότερες πρωτεΐνες που εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια κωδικοποιούνται από γονίδια του πυρήνα, συντίθενται στο κυτταρόπλασμα ως προ-πρωτεΐνες κι έπειτα μεταφέρονται σε υποδοχείς στην επιφάνεια του μιτοχονδρίου υπεύθυνους για την εισαγωγή μορίων μέσα στα οργανίδια αυτά. Ωστόσο, για να εισέλθει μια πρωτεΐνη του κυττάρου στο μιτοχόνδριο, θα πρέπει να φέρει κάποιο «σήμα» που να αναγνωρίζεται από τους υποδοχείς. Αυτό το σήμα είναι γνωστό ως αλληλουχία-οδηγός και εντοπίζεται στα 20-50 αμινοξικά κατάλοιπα του αμινοτελικού άκρου των πρωτεϊνών, ενώ έχουν βρεθεί και πρωτεΐνες που φέρουν αυτό το σήμα σε εσωτερικές αλληλουχίες ή πρωτεΐνες χωρίς αυτό το σήμα αναγνωρίζονται μέσω αναγνωριστικών ακολουθιών των Hsps (Simpkins et al, 2008).

Οι περισσότερες γνωστές πυρηνικές πρωτεΐνες με μιτοχονδριακή δράση εισέρχονται στα οργανίδια αυτά μέσω του συμπλόκου της τρانشλοκάσης της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, γνωστό ως σύμπλοκο TOM. Το σύμπλοκο αυτό αναγνωρίζει την αλληλουχία-οδηγό και βοηθά στην είσοδο των πρωτεϊνών αυτών στο μιτοχόνδριο. Περιλαμβάνει τους υποδοχείς Tom20, Tom70, Tom22, το κανάλι Tom40 και τη μικρή Tom6-7, με τους δύο πρώτους υποδοχείς να αποτελούν

τους κυρίαρχους του συμπλόκου και τα υπόλοιπα μέλη να είναι συστατικά του πόρου της μετατόπισης. Αφού διασχίσουν την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, οι πρωτεΐνες είτε υφίστανται διαλογή και κατάλληλη αναδίπλωση είτε μεταφέρονται στο σύμπλοκο της τρανσλοκάσης της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, γνωστό ως σύμπλοκο TIM για είσοδο στη μήτρα. Οι υποδοχείς Tom20 και Tom22 φαίνεται να αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο μοτίβο στην αλληλουχία-οδηγό που έχει ως εξής: φΧΧφφ, όπου φ είναι κάποιο υδρόφοβο αμινοξύ κατά προτίμηση η λευκίνη (L), ενώ Χ είναι ένα οποιοδήποτε αμινοξύ. Ενώ, ο υποδοχέας Tom70 θεωρείται υπεύθυνος για την είσοδο στο μιτοχόνδριο πρωτεϊνών που δεν φέρουν αλληλουχία-οδηγό. Πιο ειδικά, υπάρχουν πρωτεΐνες που κατά την είσοδο κι έλευση τους από τις δύο μιτοχονδριακές μεμβράνες πρέπει να αποκτήσουν συγκεκριμένη διαμόρφωση ή και να χάσουν την αναδίπλωσή τους, προκειμένου να επιτευχθεί η μεταφορά. Για το λόγο αυτό βρίσκονται συζευγμένες με Hsps που βοηθούν στη σωστή αναδίπλωση, στη ρύθμιση της αποικοδόμησής τους, αλλά και στη μεταφορά τους σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Έτσι, στις περιπτώσεις τέτοιων πρωτεϊνών, η μεταφορά διενεργείται μέσω αλληλεπίδρασης των Hsps με το μοτίβο TPR (Tetratricopeptide Repeat) και τον υποδοχέα Tom70. Άρα, λοιπόν, σύμφωνα με τα παραπάνω, πώς φαίνεται να γίνεται η μιτοχονδριακή μεταφορά του ERβ που είναι και το αντικείμενο μελέτης της εργασίας αυτής; Φαίνεται να έχει 3 εναλλακτικούς τρόπους στόχευσης των μιτοχονδρίων:

- i. Μέσω αλληλεπίδρασης του Tom70 με τις Hsp70/Hsp90 με τις οποίες βρίσκεται σε σύμπλοκο στην ανενεργή του μορφή.
- ii. Μέσω αλληλεπίδρασης των Tom20 και Tom22 με το χαρακτηριστικό μοτίβο LXXLL -που υποθέτουν ότι μπορεί να υπάρχει ως αλληλουχία-οδηγός στο αμινοτελικό του άκρο, είτε ως εσωτερική αλληλουχία- όταν συνδεθεί με τον προσδέτη.
- iii. Μέσω αλληλεπίδρασης του Tom70 με την Hsp70, μέσω μια εσωτερικής ακολουθίας, όταν βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση.

Η δυναμική κατάσταση του ER με και χωρίς προσδέτη μπορεί να διευκολύνει την μετακίνησή του με βάση υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις στα μιτοχόνδρια (Simpkins et al, 2008).



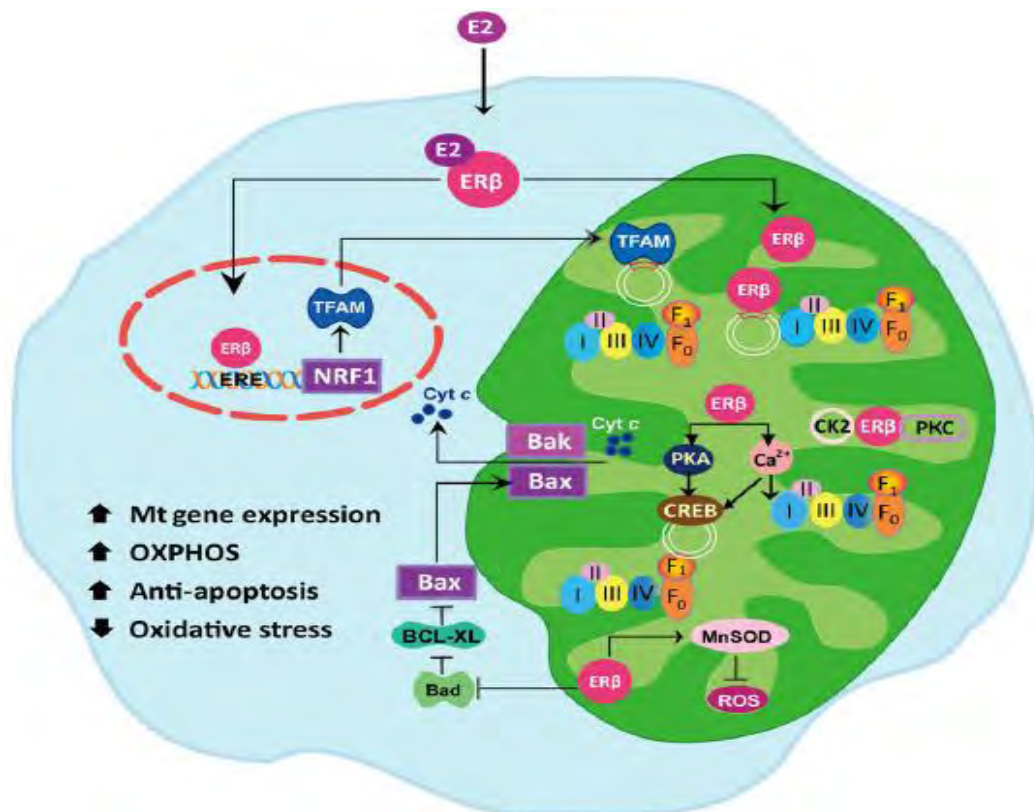
Εικόνα 7. Ένα απλοποιημένο διάγραμμα της διαδικασίας εισόδου του ERβ στο μιτοχόνδριο μέσω του συμπλόκου TOM. Το σύμπλοκο αυτό μπορεί να «εισάγει» πρωτεΐνες στο μιτοχόνδριο μέσω των υποδοχέων Tom20/Tom22 ή μέσω του Tom70. Οι Tom20/Tom22 αναγνωρίζουν το χαρακτηριστικό μοτίβο LXXLL στον ενεργοποιημένο ERβ κι έπειτα τον μεταφέρουν στο σύμπλοκο TIM της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Εναλλακτικά, ο μη ενεργοποιημένος ERβ μεταφέρεται μέσω αλληλεπίδρασης των Hsp70/Hsp90 με τις οποίες βρίσκεται σε σύμπλοκο με το μοτίβο TPR του υποδοχέα Tom70. (Simpkins et al, 2008)

Ωστόσο, από τη στιγμή της εισόδου του ERβ στο μιτοχόνδριο, ποιες μπορεί να είναι δράσεις του; Γενικά, είναι γνωστό ότι τα οιστρογόνα ασκούν μεγάλη επίδραση τόσο στη δράση όσο και στη βιογένεση των μιτοχονδρίων είτε άμεσα είτε έμμεσα. Για παράδειγμα μέσω του πυρήνα, επηρεάζουν τα επίπεδα μεταγραφής ρυθμιστών των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων με μιτοχονδριακή δράση. Έχει προταθεί ότι τα οιστρογόνα ίσως να ρυθμίζουν τη μεταγραφή του μεταγραφικού παράγοντα NRF-1 που με τη σειρά του ρυθμίζει τη μεταγραφή σημαντικών μεταγραφικών παραγόντων που δρουν στο μιτοχόνδριο, όπως για παράδειγμα ο TFAM (Klinge, 2008). Παρόλα αυτά η επίδρασή τους στη λειτουργία του μιτοχονδρίου δεν περιορίζεται μόνο εκεί, αφού οι ενεργοποιημένοι ή μη ERs φαίνεται να εισέρχονται στα οργάνιδια αυτά. Η δράση τους εντός μιτοχονδρίου αφορά τη μεταγραφή των μιτοχονδριακών γονιδίων, την απόπτωση, την παραγωγή ATP αλλά και το οξειδωτικό στρες (Chen et al. 2009; Psarra & Sekeris, 2008; Liao et al, 2015).

Πιο ειδικά, μελέτες έχουν δείξει ότι ο εντοπισμένος στο μιτοχόνδριο ERβ προσδένεται στα θεωρούμενα mtEREs που έχουν βρεθεί στο D-loop, όπως προαναφέρθηκε ή ασκεί τη δράση του μέσω ρύθμισης της φωσφορυλίωσης του CREB που επηρεάζει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή μέσω πρόσδεσης σε στοιχεία απόκρισης στο cAMP (CRE). Έτσι λοιπόν, οι αλληλεπιδράσεις του ERβ άμεσα ή έμμεσα με το mtDNA προτείνουν ότι τα οιστρογόνα μπορούν να ρυθμίσουν τη μιτοχονδριακή μεταγραφή αλλά και να τροποποιήσουν την παροχή ενέργειας στο κύτταρο. Την παραπάνω θεωρία ενισχύει το γεγονός πως μελέτες έχουν δείξει τον ERβ να επάγει αύξηση στη μεταγραφή των κωδικοποιούμενων από το μιτοχονδριακό DNA υπομονάδων I,III και IV της κυτοχρωμικής οξειδάσης (Liao et al, 2015). Πέρα από τα παραπάνω, μελέτες δείχνουν τον ERβ να εμπλέκεται στην επιβίωση του

κυττάρου και σε αντι-αποπτωτικές διαδικασίες. Μπορεί να αλληλεπιδράσει με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bad, οπότε αυτή πλέον δεν μπορεί να εμποδίσει τη δράση της αντι-αποπτωτικής Bcl-2. Αποτέλεσμα είναι η καταστολή της Bax και άρα η παρεμπόδιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα. (Liao et al, 2015). Όσον αφορά στο ρόλο του στο οξειδωτικό στρες, έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί τη μιτοχονδριακή μαγγανική δισμουτάση σουπεροξειδίου, MnSOD, η οποία καταλύει τη διάσπαση των ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου. Παρεμποδίζοντας τη συσσώρευση των ελευθέρων ριζών, δεν μπορεί να επέλθει η καταστροφική για το μιτοχόνδριο απώλεια της «στεγανότητας» της εσωτερικής μεμβράνης κάτι που αν συνέβαινε θα οδηγούσε σε κατάρρευση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Άμεσο επακόλουθο είναι η διόγκωση των οργανιδίων αυτών και η απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που σηματοδοτεί την απόπτωση (Simpkins et al, 2008).

Επιπρόσθετα, ο ERβ έχει βρεθεί στον εγκέφαλο ποντικού να αλληλεπιδρά με τη μιτοχονδριακή κινάση της καζεΐνης 2 (CK2) καθώς και με την φωσφοκινάση C (PKC), οι οποίες συμβάλλουν στη βιογένεση της μιτοχονδριακής τρανσλοκάσης της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής αντλίας καλίου, αντίστοιχα. Τέλος, ειδικοί ρυθμιστές (modulators) των ER έχει δειχθεί να παίζουν ρόλο στη ροή ιόντων ασβεστίου στο μιτοχόνδριο, επηρεάζοντας έτσι τη φωσφορυλίωση των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, άρα και τη λειτουργικότητά τους (Liao et al, 2015).



Εικόνα 8. Οι θεωρούμενες επιδράσεις του εντοπισμένου στο μιτοχόνδριο ERβ. Ο mtERβ ρυθμίζει τα OXPHOS μέσω άμεσης πρόσδεσης στα mtEREs στο D-loop ή ενεργοποιώντας το ενδομιτοχονδριακό μονοπάτι σηματοδότησης εξαρτώμενο από το ασβέστιο και τη φωσφορυλίωση του CREB ή έμμεσα μέσω δράσης στον πυρήνα όπου επηρεάζει τη μεταγραφή του

TFAM. Έχει επίσης δειχθεί ότι παρεμποδίζει τη δράση της Bad οπότε καταστέλλονται οι αλληλεπιδράσεις με την Bcl-XL, οδηγώντας σε αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα. Ακόμη, διεγείρει τη δραστηριότητα της MnSOD οδηγώντας στη μείωση των ελευθέρων ριζών στο μιτοχόνδριο. (Liao et al, 2015).

1.3.3.ii ERβ και καρκίνος

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους ερευνητές έχει η εμπλοκή ή μη του ERβ σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπου μπορεί να έχει επαγωγική ή προστατευτική δράση, ανάλογα με τον ιστό. Για παράδειγμα, στον καρκίνο του παχέος εντέρου, στους καρκινικούς ιστούς φαίνεται να εμφανίζεται σε χαμηλότερα επίπεδα κάτι που οδηγεί στην υπόθεση ότι ίσως να έχει προστατευτική δράση στην καρκινογένεση του συγκεκριμένου ιστού, ενώ στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού φαίνεται να μπορεί να αξιοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης (Deroo et al, 2010). Γενικά, ο ERα είναι το κύριο μόριο που εμπλέκεται στους σχετιζόμενους με τα οιστρογόνα καρκίνους, επειδή τα επίπεδά του σχετίζονται με την πρόοδο των ασθενών που υπόκεινται σε θεραπεία με ανταγωνιστές των οιστρογόνων. Μελέτες παρουσιάζουν τον ERβ να έχει κυρίως αντι-πολλαπλασιαστική δράση και μειωμένα επίπεδα αυτού έχουν σημειωθεί στη διαδικασία καρκινογένεσης του προστάτη και του μαστού στον άνθρωπο παρουσιάζοντάς το γονίδιο που τον κωδικοποιεί ως ογκοκατασταλτικό (Zhao et al, 2008). Ωστόσο, η παραπάνω παρατήρηση δεν είναι ευρέως αποδεκτή, καθώς άλλες μελέτες δείχνουν τόσο πολλαπλασιαστική όσο κι αντι-πολλαπλασιαστική δράση για τον ERβ. Γενικά, τα αποτελέσματα είναι διφορούμενα και διαφοροποιούνται από ιστό σε ιστό, ενώ φαίνεται πιθανόν να ασκεί την καρκινογενετική του δράση επεμβαίνοντας στη μιτοχονδριακή λειτουργία προκειμένου να επιτευχθεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η επιβίωση (Liao et al, 2015)

1.3.4 Οιστρογόνα και Νευροπροστασία

Ο νευρικός ιστός παρουσιάζει υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις και ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες, κάτι που τον καθιστά ευάλωτο σε τοξίνες ή οτιδήποτε άλλο μπορεί να επηρεάσει τη δομική οργάνωση ή την παραγωγή ενέργειας από τα μιτοχόνδρια. Είναι γνωστό ότι τα οιστρογόνα ασκούν ποικίλες δράσεις στα νευρικά κύτταρα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, αλλά επίσης φαίνεται να έχουν κι έναν νευροπροστατευτικό ρόλο σε παθολογικές καταστάσεις του νευρικού ιστού. Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως για το ρόλο των μιτοχονδρίων στην απόφαση για την επιβίωση ενός κυττάρου ή όχι, είναι λογικό να αποτελούν κύριο σημείο της νευροπροστατευτικής δράσης που εμφανίζουν τα οιστρογόνα. Πράγματι, υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν αυτή τη συσχέτιση, φανερώνοντας αντιοξειδωτική δράση των οιστρογόνων σε νευρικά κύτταρα ή αύξηση στην παραγωγή ATP σε καταστάσεις στρες. Ωστόσο, τα οιστρογόνα φαίνεται να ασκούν αυτή την προστατευτική δράση με ποικίλους μηχανισμούς που όμως φαίνεται να είναι πιο άμεσοι, ανεξάρτητοι από την ενεργοποίηση των ERs (Arnold et al, 2012; Simpkins et al, 2008).

Παρόλα αυτά, αποτελέσματα μελετών πάνω στην εγκεφαλική ισχαιμία που δείχνουν ότι για την νευροπροστατευτική δράση των οιστρογόνων απαιτείται κάποιος χρόνος επώασης, όπως για παράδειγμα 24 ώρες, κίνησαν υποψίες για την πιθανότητα εμπλοκής των ERs στον όλο μηχανισμό. Έτσι, ξεκίνησαν και πειράματα για τον έλεγχο της εμπλοκής των ERs στην προστατευτική δράση των οιστρογόνων. Στοιχεία που υποστηρίζουν μια νευροπροστατευτική δράση για τον ERα έχουν προέλθει από μελέτες που υποδεικνύουν ότι αυτή η δράση των οιστρογόνων είχε χαθεί σε knock-out ποντίκια για τον ERα που είχαν αφαιρεθεί οι ωοθήκες. Σε αντίθεση, σε knock-out ποντίκια για τον ERβ που είχαν αφαιρεθεί οι ωοθήκες, η νευροπροστατευτική δράση των οιστρογόνων δεν φαινόταν διαφορετική σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια που είχαν αφαιρεθεί οι ωοθήκες. Έτσι, έβγαινε το συμπέρασμα ότι ένας από τους προστατευτικούς μηχανισμούς των οιστρογόνων στον εγκέφαλο περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ERα (Brann et al, 2007). Άλλη ομάδα έχει αναφέρει και τον ERβ στον μηχανισμό νευροπροστασίας, καθώς knock-out ποντίκια για τον ERβ παρουσίαζαν σημαντική απώλεια νευρώνων και σμίκρυνση του εγκεφάλου στα δύο έτη ζωής, προτείνοντας ότι η απώλεια προέκυπτε κατά τη διάρκεια της ζωής του ζώου, παρά κατά το στάδιο της ανάπτυξης. Σύμφωνα λοιπόν με τους ερευνητές αυτούς, τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο ERβ είναι σημαντικός για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των νευρώνων. Γενικά, σαν σύνολο τα υπάρχοντα δεδομένα προτείνουν νευροπροστατευτική δράση και για τους 2 υποδοχείς στον εγκέφαλο, χωρίς να προτείνουν κάποιον σαφή μηχανισμό. Επίσης, δεν είναι ξεκάθαρη η δράση του ενός και του άλλου, αλλά φαίνεται ο ERα να απαιτείται για την προστασία τραυματισμένων ιστών μέσω των οιστρογόνων, ενώ ο ERβ για την επιβίωση των νευρώνων κατά τη διάρκεια της ζωής (Dhandapani et al, 2002).

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι αφενός ο έλεγχος της επίδρασης του (Estrogen receptor β) ER β στη μιτοχondριακή μεταγραφή γονιδίων που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση κι αφετέρου ο χαρακτηρισμός των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά εντός του μιτοχondρίου. Πιο αναλυτικά, μέσω του χαρακτηρισμού των μορίων με τα οποία άμεσα ή έμμεσα αλληλεπιδρά ο ER β θα μπορέσουμε να διευρύνουμε τις γνώσεις μας σχετικά με τους πιθανούς ρόλους του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια και τον χαρακτηρισμό των βιοχημικών μονοπατιών στην ρύθμιση των οποίων άμεσα ή έμμεσα εμπλέκεται στο μιτοχondριακό περιβάλλον, επηρεάζοντας έτσι την φυσιολογία ολόκληρου του κυττάρου. Η μελέτη αυτή επιτεύχθηκε με τη συλλογή μιτοχondριακού κλάσματος από N2a κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν σταθερά την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) με μιτοχondριακή στόχευση είτε την βήτα μορφή του υποδοχέα οιστρογόνων με τη μορφή χιμαιρικής πρωτεΐνης με GFP και με μιτοχondριακή στόχευση. Με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων έναντι είτε του ER β είτε της GFP πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση του ER β και των συνκατακρημνισθέντων με αυτόν πρωτεϊνών από το μιτοχondριακό περιβάλλον. Έπειτα, οι πρωτεΐνες που κατακρημνίστηκαν χαρακτηρίστηκαν με τη μέθοδο της φασματομετρίας μάζας, σε συνεργασία με τον Δρ. Παναγιώτου Γ. και Σαμιωτάκη Μ. από το Ερευνητικό Κέντρο Βιοιατρικών Επιστημόνων 'Αλεξάντερ Φλέμινγκ'. Στη συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία των αποτελεσμάτων και ομαδοποίηση των αλληλεπιδρώντων μορίων ανάλογα με τη βιοχημική οδό στην οποία αυτά εμπλέκονται με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι ο ER β άμεσα ή έμμεσα αλληλεπιδρά με μόρια που εμπλέκονται σε βιοχημικές οδούς όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση, ο μεταβολισμός της γλυκόζης, ο κύκλος του κιτρικού οξέος, η βιοσύνθεση στεροειδών και μηχανισμοί εισαγωγής στο μιτοχόνδριο. Ενώ όσον αφορά στην άμεση εμπλοκή του ER β στη ρύθμιση της μιτοχondριακής μεταγραφής, αυτή επιβεβαιώθηκε με προσδιορισμό του παραγόμενου μιτοχondριακού mRNA παρουσία α -αμανιτίνης (ειδικό αναστολέα της πυρηνικής πολυμεράσης) και απουσία ή παρουσία οιστραδιόλης με εφαρμογή της τεχνικής Real Time PCR.

3. Πειραματικό μέρος

3.1 Οργανολογία

i. Εντός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών:

- Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss Optronic Germany
- Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Newbauer)
- Αυτόματος πιπιεταδόρος (HTL Lab Solution)
- Επωαστήρας: New Brunswick (an Eppendorf Company) Galaxy 170S
- Επωαστήρας: SHEL LAB
- Υδατόλουτρο (Selecta®)
- Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: Entrofriger- BLII/ PS Selecta®
- Laminar Flow Hood Tel Star AV-30/70

ii. Εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών:

- Θερμοκυκλοποιητής (eppendorf mastercycler gradient)
- Μηχάνημα Real Time PCR (Stratagene Mx 3005p)
- Ζυγός (Kern EN)
- Ζυγός (Kern 440-47N)
- Hood (Biosan)
- Ομογενοποιητής Potter Erlejhern (WiseStrir® HS-30E)
- Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYS TM
- Φυγόκεντρος Helme Z36HK
- Φυγόκεντρος Eppendorf
- Πιπέτες – Air displacement pipettes όγκων 0,1-2 μl, 2-20 μl, 20-200 μl, 100-1.000 μl
- Heatblock (Kisker)
- Συσσκευή ηλεκτροφόρισης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell
- Συσσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot
- Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S
- Μηχάνημα εμφάνισης W.B και gel: FluoChemE/ ProteinSimple
- Σκοτεινός θάλαμος και σετ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak
- Vortex (Biovortex V1)
- Quick spin (NIPPON Genetics EUROPE GmbH)

3.2 Υλικά

i. Χημικά:

ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

- Αιθανόλη (Sigma)
- Αμανιπίνη (Fluka)
- Βιοαιθανόλη (Kalochen)
- Πενικιλίνη-Στρεπταμυκίνη (Gibco)
- DMSO (Sigma)

- E2 (Sigma)
- FBS (Gibco)
- L-glutamin (Gibco)
- Trypsin-EDTA 5% 10× (Gibco)

Για PCR

- Αγαρόζη (Nippon Genetics)
- Γλυκερόλη (Punreac)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών για DNA (Generuler 1kb, Invitrogen)
- Bromophenol blue (Fluka)
- Kit απομόνωσης DNA (Invitrogen)
- Kit Taq Polymerase (Invitrogen): Taq polymerase, PCR Buffer 10×, dNTPs, 50mM MgCl₂
- ddH₂O water for injection (Βιοσερ)
- Midori green (Nippon Genetics)
- Xylene cyanol (Fluka)

Για απομόνωση RNA, αντίστροφη μεταγραφή και Real Time PCR

- Αιθανόλη (Sigma)
- Ισοπροπανόλη (Sigma)
- Χλωροφόρμιο (CHCl₃) (Sigma)
- ddH₂O water for injection (Βιοσερ)
- Kit RQ1 RNase-Free (Promega): RQ1 RNase-Free DNase 10× Reaction Buffer, RQ1 RNase-Free DNase, RQ1 DNase Stop Solution
- Kit SuperScript II RT (Invitrogen): dNTPs, DTT, random hexamers, First Strand Buffer 5×, RNase OUT
- Trizol (Sigma)
- Sybr green® (Applied Biosystems by Life Technologies)

Για κλασμάτωση μιτοχονδρίων

- Μαννιτόλη (Sigma)
- Σουκρόζη (Sigma)
- DTT (Serva)
- EDTA (Sigma)
- Hepes (Serva)
- KCl (EMSURE)
- KOH (Sigma)
- MgCl₂ (Sigma)
- PBS 10× (Gibco)
- PMSF (AppliChem)
- Tris pH=7.5 (Serva)

Για ανοσοκατακρήμνιση

- Διάλυμα Bradford 5× (Bio-Rad)
- Γλυκερόλη (AppliChem)
- Κυανούν της βρωμοφαινόλης (Research Organics)
- Μεθανόλη (Sigma)
- Οξικό οξύ (Scharlau)
- Φορμαλίνη (Punreac)
- AgNO₃ (Fluka)
- Beads
- DTT (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- NaCl (Sigma)
- Na₂S₂O₃ (Sigma)
- NP-40 (Fluka)
- Na-deoxycholate (Sigma)
- Protease Inhibitors (Roche)
- PMSF (AppliChem)
- Tris (Serva)

Για σταντάρισμα ανοσοκατακρήμνισης

- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών για πρωτεΐνες (pagemuler prestain marker, Invitrogen)
- Μεθανόλη (Sigma)
- Acrylamide/Bis acrylamide 40 % (Bio-Rad)
- APS (Sigma)
- ddH₂O water for injection (Βιοσερ)
- Developer (Carestream)
- ECL A και ECL B (GenScript Biology Cro)
- Fixer (Carestream)
- KCl (EMSURE)
- KH₂PO₄ (Merck)
- NaCl (Scharlau)
- Na₂HPO₄ (EMSURE)
- TEMED (AppliChem)
- Tris
- Tween 20 (BioChemica)
- Skimmed milk powder (Regilait)
- SDS (Sigma)

ii. Θρεπτικά Υλικά:

- Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 1g/l Glucose (Life Technologies - Invitrogen)
- Dulbecco's modified eagle medium DMEM without phenol red Gibco® 1g/l Glucose (Life Technologies - Invitrogen)

→ Πλήρες θρεπτικό μέσο: 10% FBS, 1% L-Gln, 1% P/S

iii. Διαλύματα:

• **DTT 1M**

Για 10 ml, διαλύονται 1,54 gr DTT 1M σε ddH₂O. Ακολουθεί ανάδευση με μαγνητάκι, αλιγκοτς του 1 ml και φύλαξη στους - 20° C.

• **PMSF 200 mM**

Για 2 ml, διαλύονται 0,07 gr PMSF 200 mM σε ισοπροπανόλη. Αλιγκοτς των 200 μl και φύλαξη στους - 20° C.

• **Διάλυμα Bradford:**

Stock 5×. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1×, αραιωμένο με ddH₂O. Η αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford είναι 1:1000.

• **Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:**

Για την παρασκευή 0.2 l διαλύματος ζυγίζονται 36,342 gr Tris τα οποία διαλύονται σε dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 12 N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

• **APS 10 %:**

Παρασκευάζεται διαλύοντας 100 mg APS σε 1 ml ddH₂O. Αποθηκεύεται στους - 20 °C και κατά τη διάρκεια χρήσης του παραμένει τοποθετημένο σε πάγο.

• **Sample Buffer 2×:**

Το SB περιέχει: 1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue

• **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρισης (Running Buffer) 10×:**

Για διάλυμα 1 l, ζυγίζονται 30.3 gr Tris base και 144.00 gr γλυκίνης τα οποία διαλύονται ddH₂O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου

• **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρισης (Running Buffer) 1×:**

Αποτελείται από Running Buffer 10× και dH₂O σε αναλογία όγκων 1:9. Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε αναλογία 0.1 %. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

• **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10×:**

Αποτελείται από 10 % Running Buffer 10×, 20 % μεθανόλη και 0.05 % SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH₂O. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10×:**

Για ποσότητα 1l, ζυγίζονται: 2 g KCl, 80 g NaCl, 17,8 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1×:**

Το stock buffer PBS 10× αραιώνεται σε κατάλληλο όγκο dH₂O ή ddH₂O και προστίθεται Tween-20 σε αναλογία 1 %. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Διαλύματα για εμφάνιση σήματος:**

Αραιώνουμε 45 ml από το stock του Developer σε 127,5 ml dH₂O. Ομοίως για το Fixer. Διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Loading Buffer:**

Για 10 ml, ζυγίζουμε 0,0125 gr bromophenol blue και 0,0125 gr xylene cyanol, ενώ προσθέτουμε 1 ml γλυκερόλη 100% και μέχρι τα 10 ml dH₂O. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **TAE 50×:**

Για 1l, διαλύουμε 242,2 gr Tris σε 600 ml ddH₂O, προσθέτουμε αργά 57,1 ml υγρού οξικού οξέος και 100 ml EDTA 0,5 M, pH = 8. Συμπληρώνουμε με ddH₂O μέχρι των επιθυμητό όγκο.

- **Buffer A:**

Χρησιμοποιείται στη διαδικασία κλασμάτωσης μιτοχονδρίων και η σύστασή του είναι η ακόλουθη: Hepes-KOH 20mM pH 7.5, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, PMSF 0,1 mM και σουκρόζη 250 mM..

- **Buffer B:**

Χρησιμοποιείται στη διαδικασία κλασμάτωσης μιτοχονδρίων και η σύστασή του είναι η ακόλουθη: Tris 20mM pH 7.5, μαννιτόλη 0,21 mM, EDTA 2,5 mM και σουκρόζη 0,07 mM

- **RIPA Buffer:**

Αποτελείται από Tris/HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, NP-40 1% και Na-deoxycholate 0,25%. Φυλάσσεται στους 4 °C και όταν στον όγκο RIPA που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για το εκάστοτε πείραμα, προστίθενται αναστολείς πρωτεασών.

- **Διαλύματα για χρώση πηκτικής ακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο:**

Fixing Solution:

Αποτελείται από 50% μεθανόλη, 5% οξικό οξύ και 45% ddH₂O

Washing Solution:

Αποτελείται από 50% μεθανόλη και 50% ddH₂O

Sensitizing Solution:

Αποτελείται από ddH₂O με περιεκτικότητα σε Na₂S₂O₃, 0,02%

Staining Solution:

Αποτελείται από ddH₂O με περιεκτικότητα σε AgNO₃, 0,1 %. Χρησιμοποιείται κρύο (4 °C)

Developing Solution:

Αποτελείται από ddH₂O με περιεκτικότητα σε φορμαλίνη και Na₂CO₃, 0,04% και 2% αντίστοιχα

Stop Solution:

Αποτελείται από 5% οξικό οξύ

Storing Solution:

Αποτελείται από 1% οξικό οξύ

iv. Αντισώματα

Για ανοσοκατακρύμνιση

- mouse-IgG: control
- Αντίσωμα έναντι GFP από επίμυ (Roche)
- Αντίσωμα έναντι ERβ από επίμυ, MCA (SEROTEC)
- Αντίσωμα έναντι ERβ από κόνικλο, ERβ H150 (Santa Cruz)

Για σταντάρισμα ανοσοκατακρύμνισης

➤ Πρωτογενή Αντισώματα

- Αντίσωμα έναντι ERβ από επίμυ, MCA (SEROTEC)
- Αντίσωμα έναντι GFP από επίμυ (Roche)

→ Διαλυμένα σε PBST×1 και 2% γάλα

➤ Δευτερογενή Αντισώματα:

- Αντίσωμα έναντι mouse IgG-HRP (Pierce), 1:50.000

→ Διαλυμένο σε PBST×1 και 2% γάλα

v. Αναλώσιμα:

- Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι τύπου Falcon των 15 ml και των 50 ml (Sarstedt)
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης Whatman 0,45 μm (Protran)
- Πλάκες με 6 διακριτές θέσεις (πηγάδια) ανάπτυξης των κυττάρων (6×well plate) (Sarstedt)
- Φλάσκες για καλλιέργεια κυττάρων, επιφάνειας 25 cm² και 75 cm² (Sarstedt)
- Τρυβλία καλλιέργειας 150×20 mm
- Σιφώνια Serological Pipette των 2, 5, 10 & 25 ml (Sarstedt)
- Ρύγχχοι – Tips όγκων 0,1-2 μl, 2-20 μl, 20-200 μl, 100-1.000 μl

- Χαρτί Whatman
- Cryovials για φύλαξη των κυττάρων σε βαθειά κατάψυξη (Sarstedt)
- Eppendorfs των 0,2 ml, των 1,5 ml & των 2 ml
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur (Kimble)

3.3 Κυτταρικές σειρές

Για τα πειράματα της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές N2a που υπερεκφράζουν σταθερά GFP με αλληλουχία-οδηγό για είσοδο στο μιτοχόνδριο (mtGFP), αποικία 19, N2a που υπερεκφράζουν σταθερά τον πυρηνικό ERβ του ανθρώπου σε χιμαιρική πρωτεΐνη με το GFP (GFPERβ), αποικία 25 και N2a που υπερεκφράζουν σταθερά τον ERβ με αλληλουχία-οδηγό για είσοδο στο μιτοχόνδριο σε χιμαιρική πρωτεΐνη με το GFP (mtGFPERβ), αποικία 38.

Τα N2a είναι νευροβλαστωματικά κύτταρα προερχόμενα από τον οργανισμό *Mus musculus*, κοινώς το ποντίκι. Όσον αφορά στις συνθήκες καλλιέργειάς τους, αναπτύσσονται παρουσία πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM 1g/l Glucose κι εμφανίζουν αργό ρυθμό ανάπτυξης. Επιπλέον, φέρουν τις εξής ιδιαιτερότητες:

1) το μέγιστο της επιφάνειας της φλάσκας που μπορούν να καλύψουν κατά την ανάπτυξή τους είναι το 70% αυτής. Εάν ξεπεράσουν το ποσοστό αυτό, αρχίζουν να αποκολλώνται από την επιφάνεια προσκόλλησης κι επιπλέον στο θρεπτικό μέσο, χωρίς όμως να είναι νεκρά.

2) αποκολλώνται πολύ εύκολα από την επιφάνεια καλλιέργειάς τους, γι' αυτό και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά της μεταφορά τους ώστε να μην αναταράσσεται πολύ η επιφάνειά τους.

3.4 Τεχνικές

• Στο χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών

i. Απόψυξη κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου μπορεί να βρίσκονται φυλαγμένες σε βαθειά κατάψυξη, είτε στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ είτε στο υγρό άζωτο στους $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η διαδικασία της απόψυξης είναι κοινή και για τις δύο θερμοκρασίες φύλαξης.

Σημαντικό πριν την έναρξη της διαδικασίας είναι να ετοιμάσουμε όλα όσα θα χρειαστούμε, προκειμένου από τη στιγμή που το φιαλίδιο (cryovial) θα ξεπαγώσει, τα κύτταρα να μείνουν όσο λιγότερο γίνεται σε επαφή με το τοξικό για αυτά DMSO. Γενικά, καλό είναι οι κινήσεις να εφαρμοστούν όσο πιο γρήγορα γίνεται, ώστε να εξασφαλιστεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων θα επιβιώσει από αυτή τη στρεσογόνο για αυτά διεργασία.

Πιο αναλυτικά, ξεκινάμε προσθέτοντας έναν α όγκο θρεπτικού σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα τύπου Falcon των 15 ml. Έπειτα, το φιαλίδιο εξάγεται από την κατάψυξη και μεταφέρεται γρήγορα εντός ξηρού πάγου στον χώρο των κυτταροκαλλιεργειών. Προκειμένου να ξεπαγώσει, το κρατάμε προσεκτικά για 3-4 λεπτά εντός του υδατόλουτρου στους 37 °C, χωρίς να το αφήσουμε από το χέρι. Το κρατάμε εντός του νερού με τέτοιο τρόπο, ώστε το νερό να μην έρχεται σε επαφή με το καπάκι, αλλά ταυτόχρονα να καλύπτει τον μεγαλύτερο όγκο του παγωμένου περιεχομένου. Θεωρούμε ότι το περιεχόμενο του φιαλιδίου έχει ξεπαγώσει σε ικανοποιητικό βαθμό όταν το μεγαλύτερο ποσοστό του έχει υγροποιηθεί κι έχει μείνει μια μικρή ποσότητα πάγου. Τότε, ανοίγεται στο εσωτερικό της συσκευής καθέτου νηματικής ροής που εξασφαλίζει ασηπτικές συνθήκες και το περιεχόμενό του μεταφέρεται στο Falcon που πριν προσθέσαμε θρεπτικό. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 1000 rpm και σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να πάρουμε τα κύτταρά μας στο ίζημα. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης, ετοιμάζουμε μια νέα φλάσκα καλλιέργειας σημειώνοντας στο εξωτερικό της όλα τα απαραίτητα στοιχεία (κυτταρική σειρά, ημερομηνία παγώματος και ξεπαγώματος, passage). Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο αναρροφάται, το ίζημα επαναδιαλύεται καλά σε 5 ml πλήρους θρεπτικού μέσου και το μεταφέρουμε στη φλάσκα. Εάν η επιφάνεια της φλάσκας είναι 75 cm² (T-75), συμπληρώνουμε θρεπτικό μέχρι τα 15 ml τελικού όγκου. Ελέγχουμε τη φλάσκα στο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων ούτως ώστε να παρατηρήσουμε τη μορφολογία και των αριθμό των ξεπαγωμένων κυττάρων κι ακολούθως την τοποθετούμε σε επωαστικό κλίβανο σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5.0 % CO₂ και θερμοκρασία 37°C. Οι συνθήκες αυτές ευνοούν αρχικά την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια της φλάσκας κι έπειτα την αύξηση κι ανάπτυξή τους.

ii. Θρυψινοποίηση

Όταν τα καλλιεργούμενα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί σε υπέρμετρο βαθμό κι έχουν καλύψει τη μεγαλύτερη επιφάνεια της φλάσκας ή έχουν αρχίσει να σχηματίζουν συσσωματώματα -κάτι που είναι ανεπιθύμητο-, εφαρμόζουμε τη διαδικασία της θρυψινοποίησης. Επίσης, η θρυψινοποίηση εφαρμόζεται και σε χειρισμούς όπου απαιτείται η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας για περαιτέρω επεξεργασία, όπως στην περίπτωση της ψύξης και της μέτρησης των κυττάρων για στρώσιμο, διεργασίες που θα περιγραφούν πιο αναλυτικά σε επόμενες υποενότητες.

Κατά τη θρυψινοποίηση λοιπόν, εκμεταλλευόμαστε την ικανότητα της θρυψίνης, ενός πρωτεολυτικού ενζύμου, να διασπά τις πρωτεΐνες που συγκρατούν τα κύτταρα της καλλιέργειας σε συνοχή μεταξύ τους, αλλά και προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας. Κάθε θρυψινοποίηση είναι ένα πέραςμα (passage), τον αριθμό του οποίου πρέπει απαραίτητως να σημειώνουμε επάνω στη φλάσκα μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Ξεκινάμε με αναρρόφηση του θρεπτικού μέσου από τη φλάσκα και προσθήκη θρυψίνης. Η ποσότητα θρυψίνης που εφαρμόζεται ποικίλει ανάλογα

με την κυτταρική σειρά που χειριζόμαστε, αλλά συνήθως προσθέτουμε 1 ml σε φλάσκες T-25 και 2 ml σε φλάσκες T-75. Φροντίζουμε ώστε η θρυψίνη να διαβρέχει όλη την επιφάνεια της φλάσκας και την παρατηρούμε στο μικροσκόπιο. Έπειτα, τοποθετούμε τη φλάσκα στον επωαστικό κλίβανο για 1- 2 λεπτά. Προσέχουμε ιδιαίτερα το χρόνο έκθεσης των κυττάρων στη θρυψίνη, γιατί μπορεί η πρωτεολυτική της δράση να προκαλέσει σημαντική ζημιά στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Όταν έχει δράσει στην πλειοψηφία των κυττάρων, τότε τα βλέπουμε να επιπλέουν στον όγκο της θρυψίνης που τους προσθέσαμε, είτε μεμονωμένα είτε ως συσσωματώματα. Για να σταματήσουμε τη δράση της θρυψίνης, προσθέτουμε στη φλάσκα θρεπτικό υλικό, ο όγκος του οποίου είναι τετραπλάσιος από τον όγκο της θρυψίνης που χρησιμοποιήσαμε αρχικά. Έπειτα, το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε Falcon των 15 ml και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στα 1000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, αναρροφούμε το υπερκείμενο και η τύχη του ιζήματος εξαρτάται από το λόγο που εφαρμόσαμε τη θρυψινοποίηση, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Εάν τα κύτταρα προορίζονται για ανακαλλιέργεια, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε έναν α όγκο κλασσικού θρεπτικού μέσου, ανάλογα με την ποσότητά του κι επιστρέφεται ένα μέρος αυτού στην φλάσκα. Όταν δουλεύουμε με κυτταρικές σειρές που παρουσιάζουν υψηλό ρυθμό ανάπτυξης, επιστρέφουμε περίπου το 1/10 του όγκου επαναδιαλυτοποίησης, ενώ για κυτταρικές σειρές με πιο αργό ρυθμό, όπως τα N2a που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, επιστρέφουμε το 1/4 και συμπληρώνουμε με τον κατάλληλο όγκο θρεπτικού μέσου (μέχρι τα 5 ml για T-25 και μέχρι τα 15 ml για T-75). Παρατηρούμε τη φλάσκα στο μικροσκόπιο για να ελέγξουμε εάν επιστρέψαμε ικανοποιητικό αριθμό κυττάρων και τη μεταφέρουμε στον κλίβανο επώασης. Μετά τη θρυψινοποίηση, τα κύτταρα χάνουν τη χαρακτηριστική μορφολογία τους κι εμφανίζονται στρογγυλά. Η τύχη του ιζήματος όταν ο λόγος της θρυψινοποίησης είναι το πάγωμα ή το στρώσιμο θα περιγραφεί παρακάτω.

iii. Ψύξη κυττάρων

Είναι σημαντικό να αποθηκεύουμε κύτταρα για μελλοντικές μελέτες. Η κρυοσυντήρηση εξασφαλίζει ότι θα έχουμε απόθεμα κυττάρων ακόμα και σε περίπτωση κάποιας μόλυνσης ή γενικά κάποιου ατυχήματος. Η μόλυνση των κυττάρων, με χειρότερο εχθρό τους το μυκόπλασμα, μπορεί να συμβεί ακόμα και στα πιο καλά οργανωμένα εργαστήρια, ανεξάρτητα από τα μέτρα προστασίας ή την προσοχή του χειριστή των κυττάρων και η αντικατάσταση αυτών με νέα, απαλλαγμένα από μολύνσεις κύτταρα κοστίζει πολύ. Επίσης, να σημειωθεί ότι το πάγωμα είναι προτιμότερο να συμβαίνει όταν τα κύτταρα βρίσκονται στο μέγιστο ρυθμό ανάπτυξής τους ή έχουν καλύψει σχεδόν το 100% της επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας.

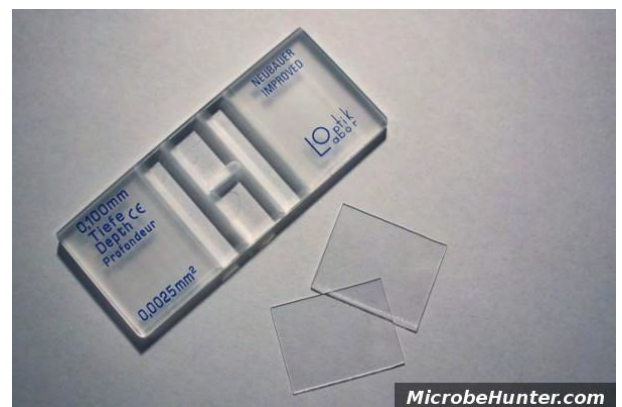
Τα κύτταρα κατά την κρυοσυντήρηση φυλάσσονται σε ειδικά φιαλίδια με χωρητικότητα 1 ml. Το διάλυμα του παγώματος περιέχει αντί για πλήρες θρεπτικό μέσο, FBS που αποτελεί το 90% του συνολικού όγκου και DMSO, που αποτελεί

το υπόλοιπο 10%. Το DMSO λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας που μειώνει το σημείο πήξης του μέσου και θα επιτρέψει ένα βραδύτερο ρυθμό ψύξης, μειώνοντας σημαντικά τον κίνδυνο σχηματισμού κρυστάλλων πάγου, που μπορεί να βλάψουν τα κύτταρα και να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, είναι ιδιαίτερα τοξικό και δεν επιθυμούμε μεγάλη έκθεση των κυττάρων σε αυτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το FBS προστίθεται ώστε να εξασφαλιστεί η βιωσιμότητα και ανάκτηση του μεγαλύτερου ποσοστού των κυττάρων μετά την απόψυξη. Άρα, σύμφωνα με αυτά, κάθε φιαλίδιο περιέχει 100 μl DMSO και 900 μl FBS με τα επαναδιαλυτοποιημένα κύτταρα.

Η διαδικασία έχει ως εξής: Ξεκινάμε τη θρυψινοποίηση, όπως περιγράφηκε πολύ αναλυτικά στην προηγούμενη υποενότητα. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρισης ετοιμάζουμε δύο φιαλίδια στα οποία σημειώνουμε όλα τα απαραίτητα στοιχεία (κυτταρική σειρά, ημερομηνία και passage). Συνήθως, παγώνουμε δύο-δύο φιαλίδια αλλά αυτό εξαρτάται κι από το συνολικό αριθμό των κυττάρων που έχουμε, από το αν θα κρατήσουμε κύτταρα για ανακαλλιέργεια και τι ποσότητα θα ανακαλλιιεργήσουμε. Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης, το υπερκείμενο αναρροφάται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 2 ml FBS. Θέλουμε 0,9 ml FBS για κάθε φιαλίδιο. Τα εναπομείναντα 0,2 ml επιστρέφονται στη φλάσκα για ανακαλλιέργεια, όπου και συμπληρώνουμε με τον αντίστοιχο όγκο θρεπτικού ανάλογα με τη φλάσκα. Σημειώνουμε passage και η φλάσκα επιστρέφεται στον επωαστικό κλίβανο. Το επόμενο βήμα του παγώματος πρέπει να γίνει πολύ γρήγορα και προσεκτικά, λόγω της κυτταροτοξικότητας του DMSO. Προσθέτουμε λοιπόν 0,1 ml DMSO σε κάθε vial, χωρίς καθυστερήσεις. Άμεσα και με συνεχόμενη ανάδευση, τα φιαλίδια αποθηκεύονται στην κατάψυξη.

iv. Μέτρηση και στρώσιμο κυττάρων

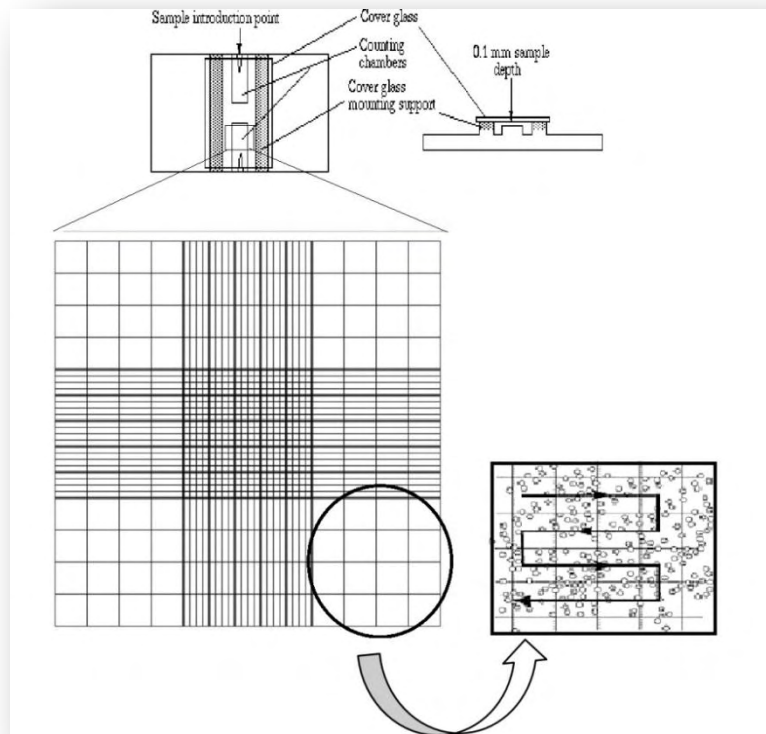
Σε περιπτώσεις που πρέπει να μελετηθεί η κυτταρική απόκριση στην επίδραση ορισμένων ουσιών, χρειαζόμαστε ίσο αριθμό κυττάρων σε πλάκες καλλιέργειας με πηγαδάκια (well-plates για παράδειγμα 6×wells). Τότε εφαρμόζεται η διαδικασία του μετρήματος. Ωστόσο, το μέτρημα δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί απευθείας στη φλάσκα, διότι δεν μπορούμε να έχουμε μια τάξη μεγέθους του όγκου των κυττάρων που παρατηρούμε. Για το λόγο αυτό, η μέτρηση των κυττάρων γίνεται στο αιμοκυτταρόμετρο, που φαίνεται στην εικόνα δεξιά.



Εικόνα 9. Αιμοκυτταρόμετρο

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που φέρει δύο παράλληλους πανομοιότυπους θαλάμους. Στην κεντρική περιοχή

του αιμοκυτταρόμετρου τοποθετείται μια καλυπτρίδα που καλύπτει τους δύο θαλάμους και η απόστασή τους από την καλυπτρίδα έχει βάθος 0,1 mm. Στο πλάι και μεταξύ κάθε θαλάμου υπάρχει μια εσοχή που τελικά σχηματίζει το γράμμα Η. Στην εσοχή αυτή μεταφέρονται τα διαλυτοποιημένα κύτταρα που με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνονται στον έναν από τους δύο θαλάμους.



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση της επιφάνειας ενός αιμοκυτταρόμετρου

Πιο ειδικά, κάθε θάλαμος φέρει ένα τετραγωνισμένο πλέγμα στο οποίο γίνεται η μέτρηση των κυττάρων. Το πλέγμα αυτό αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1 mm. Τα 5 από αυτά σχηματίζουν έναν σταυρό, ο οποίος βοηθά στο κεντράρισμα της πλάκας στο μικροσκόπιο. Εμείς μετράμε μόνο τα κύτταρα που βρίσκονται εντός των 4 γωνιακών τετραγώνων ξεκινώντας από το τεταρτημόριο πάνω αριστερά και ακολουθώντας τη φορά του ρολογιού καταλήγουμε στο τελευταίο τεταρτημόριο κάτω αριστερά. Ωστόσο, και το κάθε τεταρτημόριο χωρίζεται σε 16 επιμέρους τετράγωνα και η πορεία που ακολουθούμε κατά τη μέτρηση είναι αυτή που απεικονίζεται παραπάνω, με αρχή το πρώτο τετράγωνο πάνω αριστερά και τέλος το πρώτο τετράγωνο κάτω δεξιά.

Η διαδικασία ξεκινάει με θρυψινοποίηση. Μετά τη φυγοκέντριση αναρροφούμε το υπερκείμενο και ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος, το επαναδιαλυτοποιούμε πολύ καλά σε μικρό ή μεγάλο όγκο πλήρους θρεπτικού, έτσι που το διάλυμα να μην φαίνεται πολύ πυκνό από τον υπερβολικό αριθμό κυττάρων, ούτε και να υπάρχουν συσσωματώματα. Τα δύο τελευταία είναι ανεπιθύμητα, διότι δυσχεραίνουν τη σωστή μέτρηση. Έπειτα, μεταφέρουμε 10 μl

από τα επαναδιαλυτοποιημένα κύτταρα στο αιμοκυτταρόμετρο και αφού το κεντράρουμε στο μικροσκόπιο στην περιοχή του σταυρού, ξεκινάμε το μέτρημα από το πρώτο τεταρτημόριο, με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Αφού μετρηθούν και τα 4 τεταρτημόρια, υπολογίζουμε το μέσο όρο των κυττάρων. Έπειτα, αυτός πολλαπλασιάζεται με 10^4 ώστε να βρούμε πόσα κύτταρα έχουμε ανά ml επαναδιαλυτοποιημένων κυττάρων. Κάθε φορά που στρώνουμε κύτταρα σε πλάκες καλλιέργειας με πηγαδάκια, ξέρουμε πόσα πηγαδάκια θα χρειαστούμε και μάλιστα τι αριθμό κυττάρων επιθυμούμε ανά πηγαδάκι και ο μεταξύ τους πολλαπλασιασμός μας δίνει το συνολικό αριθμό κυττάρων που χρειαζόμαστε για το πείραμά μας. Επομένως, για να βρω πόσα ml από το επαναδιαλυτοποιημένο κυτταρικό ίζημα χρειάζομαι ώστε σε αυτά να περιέχεται ο κατάλληλος αριθμός κυττάρων, πραγματοποιώ την εξής διαίρεση: $\frac{\text{κύτταρα που θέλω}}{\text{κύτταρα που έχω}}$. Ένα μέρος από τα εναπομείναντα διαλυτοποιημένα κύτταρα επιστρέφεται για ανακαλλιέργεια.

Ο όγκος που λαμβάνεται, φυγοκεντρείται εκ νέου στις ίδιες συνθήκες χρόνου, θερμοκρασίας και στροφών. Έπειτα, το ίζημα διαλυτοποιείται σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο και μοιράζεται ίσος όγκος αυτού σε κάθε πηγαδάκι. Ο τελικός όγκος θρεπτικού των πλακών καλλιέργειας με 6 πηγαδάκια είναι 2 ml ανά πηγαδάκι.

v. Προσθήκη ουσιών και συλλογή κυττάρων

Η προσθήκη ουσιών, είναι ένας από τους λόγους που επιλέγεται η τοποθέτηση των κυττάρων σε πλάκες με πηγαδάκια (well plates). Ουσιαστικά σε κάθε πηγαδάκι επικρατεί διαφορετική συνθήκη και πάντα υπάρχει ένα πηγαδάκι που δεν έχει υποστεί κάποια κατεργασία ώστε να λειτουργήσει ως μάρτυρας (control) για σύγκριση με τις υπόλοιπες συνθήκες. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε κατά πόσο ο ενδογενής μιτοχονδριακός ERβ ελέγχει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή, επηρεάζοντας τα επίπεδα έκφρασης των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, μετά την ενεργοποίησή του από την οιστραδιόλη.

Πιο ειδικά, την ημέρα 0, εφόσον ο αριθμός των συγκεκριμένων κυττάρων θεωρείται ικανοποιητικός (70-80 % πληρότητα), πραγματοποιούμε θρυψινοποίηση, μέτρημα και στρώσιμο των κυττάρων σε μια πλάκα με 6 διακριτές θέσεις (πηγαδάκια) ανάπτυξης των κυττάρων (6*well plate) με επιθυμητό αριθμό τα 350.000 κύτταρα/πηγαδάκι και χρησιμοποιούμε ως θρεπτικό μέσο πλήρες DMEM cis με FBS ειδικά κατεργασμένο ώστε να απαλειφθεί η παρουσία στεροειδών ορμονών. Την ημέρα 2 γίνεται η προσθήκη των ουσιών. Οι συνθήκες είναι οι εξής:

- 1) Control

- 2) Παρουσία οιστραδιόλης που αποτελεί τον ενεργοποιητή του υποδοχέα σε τελική συγκέντρωση 10^{-9} M
- 3) Παρουσία α-αμανιτίνης, σε τελική συγκέντρωση 10 µg/ml. Ο μοριακός στόχος της α-αμανιτίνης είναι η RNA πολυμεράση II, η οποία καταλύει τη μεταγραφή γονιδίων στον πυρήνα. Για το ένζυμο αυτό η α-αμανιτίνη αποτελεί έναν ισχυρό κι εξειδικευμένο αναστολέα (Gong et al, 2004), συνεπώς ό,τι επαγωγή σύνθεσης mRNA παρατηρηθεί αυτή θα είναι αποτέλεσμα μιτοχondριακής μεταγραφής
- 4) Παρουσία α-αμανιτίνης τελικής συγκέντρωσης 10 µg/ml και οιστραδιόλης με τελική συγκέντρωση 10^{-9} M

Τόσο η οιστραδιόλη όσο και η αμανιτίνη διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες, αιθανόλη και DMSO, αντίστοιχα. Για να μπορούμε να συγκρίνουμε τα τελικά αποτελέσματα μεταξύ των τεσσάρων διαφορετικών κατεργασιών, πρέπει το περιβάλλον των κυττάρων να είναι το ίδιο και κάθε φορά να αλλάζει μόνο η χημική ουσία που επιδρά στα κύτταρα. Συνεπώς, λόγω του ότι η οιστραδιόλη και η αμανιτίνη φέρουν διαφορετικούς διαλύτες οι οποίοι φυσιολογικά δεν αποτελούν μέρος του πλήρους θρεπτικού μέσου, προσθέτουμε επιπλέον τα εξής:

<u>Control:</u> πλήρες DMEM cis με x µl αιθανόλης και y µl DMSO	<u>Οιστραδιόλη (E2):</u> πλήρες DMEM cis με x µl E2 και y µl DMSO
<u>α-αμανιτίνη:</u> πλήρες DMEM cis με x µl αιθανόλης και y µl αμανιτίνης	<u>α-αμανιτίνη + E2:</u> πλήρες DMEM cis με x µl E2 και y µl αμανιτίνης

Δηλαδή, προς επεξήγηση των παραπάνω, προσθέτουμε τόσα µl E2 ώστε στον τελικό όγκο η συγκέντρωσή της να είναι 10^{-9} M. Επιπλέον, για να έχουμε το ίδιο περιβάλλον και στα πηγαδάκια από όπου απουσιάζει η E2, εφόσον αυτή διαλύεται σε αιθανόλη, προσθέτουμε τόσα µl αιθανόλης στα πηγαδάκια από όπου η E2 απουσιάζει, όσα τα µl της E2 που προσθέσαμε στα πηγαδάκια με αυτή. Ομοίως για την αμανιτίνη και τον διαλύτη της, το DMSO.

Ο χρόνος επώασης διαρκεί συνολικά 6 ώρες. Πρώτα προσθέτουμε την αμανιτίνη στα αντίστοιχα πηγαδάκια κι ακολουθεί επώαση για 5 ώρες. Την 5^η ώρα της επώασης προσθέτουμε και την οιστραδιόλη για επώαση μιας ώρας.

Μετά το πέρας των απαιτούμενων ωρών επώασης των κυττάρων με τις συγκεκριμένες ουσίες, γίνεται συλλογή (harvesting) και λύση ή αποθήκευση των κυττάρων. Συνήθως για το harvesting αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό, πραγματοποιούμε μια έκπλυση με PBS 1× και συλλέγουμε τα κύτταρα με το διάλυμα αυτό. Ωστόσο, επειδή όπως ήδη αναφέρθηκε τα N2a είναι κύτταρα που αποκολλώνται πολύ εύκολα από την πλάκα καλλιέργειας, για τα κύτταρα αυτά η

συλλογή γίνεται με το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Τα κύτταρα αποκολλώνται από την πλάκα καλλιέργειας με ειδικό εργαλείο κι ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 1000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα βρίσκονται στο ίζημα, ενώ το θρεπτικό μέσο στο υπερκείμενο. Επιθυμούμε να αφαιρέσουμε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο όγκο υπερκείμενου γίνεται διότι εάν το θρεπτικό παραμείνει, αναστέλλει κάποιους χειρισμούς που θα ακολουθήσουν. Τέλος, φυλάμε το ίζημα στους -80 °C έως ότου το χρησιμοποιήσουμε.

- Εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών

- i. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για να ενισχυθεί επιλεκτικά ένα μόνο αντίγραφο ή μερικά αντίγραφα ενός κομματιού DNA σε αρκετές τάξεις μεγέθους, δημιουργώντας χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA χωρίς της μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου. Ο τελικός αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η τεχνική αυτή βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών αντιδράσεων που διαφέρουν στη θερμοκρασία και το χρόνο. Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια:

- 1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA και μετατροπή του σε μονόκλωνο
- 2) Υβριδισμός συνθετικών νουκλεοτιδίων που καλούνται εκκινητές με την αλληλουχία στόχο
- 3) Σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων του DNA που λειτουργεί ως μήτρα με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών με τα δράση του ενζύμου Taq πολυμεράση.

Όλη η αντίδραση της PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται: DNA στόχος, εκκινητές (primers), μείγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), Taq πολυμεράση, ιόντα Mg^{2+} απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα με $pH \approx 8.2$ για τη δράση του ενζύμου.

Στην παρούσα εργασία, έγινε έλεγχος της καθαρότητας κυτταρικών σειρών από μικροβιακές μολύνσεις. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος, προηγήθηκαν 3 διαδικασίες: η απομόνωση του DNA από δείγμα που λήφθηκε από κάθε κυτταροκαλλιέργεια με τη χρήση kit της Invitrogen, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του γονιδίου του μυκοπλάσματος (αν υπάρχει) και ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Βασιστήκαμε στο εξής πρωτόκολλο:

Συστατικά	Όγκος για αντίδραση 25 μ l	Τελική συγκέντρωση
10X PCR buffer minus Mg	10 μ l	1X
10mM dNTP mixture	2 μ l	0.2 mM each

50mM MgCl ₂	3 μl	1.5 mM
Primer mix (10mM each)	5 μl	0.5 μM each
Template DNA	1-20 μl	n/a
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0.2-0.5 μl	1.0-2.5 units
Autoclaved distilled water	To 100 μl	n/a

Στην αντίδραση της PCR τα δείγματα περιελάμβαναν και ένα αρνητικό control που στερούνταν DNA και ένα θετικό control που περιελάμβανε DNA από κάποια μολυσμένη κυτταρική σειρά. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις PCR, μια με εκκινητές για ενίσχυση της ακτίνης που είχε το ρόλο του δείκτη ποιότητας και ποσότητας του απομονωμένου DNA και μια με εκκινητές ειδικούς για το γονιδίωμα του μυκοπλάσματος. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Μόριο	Αλληλουχία	Εταιρεία
Μυκόπλασμα	R: CCRTGCACCAYCTGTCWHHHNBGWWAACCTC	Invitrogen
	F: GAAAGYGTGGGGAGCAAAYAGGATTAGATA	
β-ακτίνη	R: CGTTCGTCCGCATGGAGTCCT	Invitrogen
	F: GGAGCAATGATCTTGATCTT	

Το πρόγραμμα στον θερμοκυκλοποιητή περιλαμβάνει ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης των αλυσίδων στους 94 °C που πραγματοποιείται μόνο στην αρχή κι έπειτα το πρόγραμμα των κύκλων:

- 1) Αποδιάταξη στους 94 °C για 10 δευτερόλεπτα
- 2) Υβριδισμός στους 55 °C για 20 δευτερόλεπτα
- 3) Επέκταση στους 72 °C για 1 λεπτό

Το πρόγραμμα αυτό επαναλαμβάνεται για 30 κύκλους. Μετά το τέλος της αντίδρασης, τα δείγματα επωάζονται για άλλα 10 λεπτά στους 72 °C. Τα αποτελέσματα της PCR ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, με περιεκτικότητα σε αγαρόζη 2% και τάση 100 V. Η οπτικοποίηση των προϊόντων της PCR γίνεται με τη χρήση της midori green παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας. Το χημικό αυτό κάνει ακριβώς την ίδια δουλειά με το βρωμιούχο αιθίδιο στην ανίχνευση δίκλωνου DNA, με τη διαφορά ότι είναι πολύ λιγότερο τοξικό κι επικίνδυνο για τον άνθρωπο.

ii. Απομόνωση ολικού RNA με Trizol

Το Trizol γενικά, είναι ένα φωτοευαίσθητο αντιδραστήριο που φυλάσσεται στους 4 °C και χρησιμοποιείται στην απομόνωση RNA, DNA και πρωτεϊνών. Στην παρούσα μελέτη το χρησιμοποιήσαμε για την απομόνωση ολικού RNA. Κύτταρα που έχουν συλλεχθεί από πιάτα καλλιέργειας και φυλάσσονται στους -80 °C, διαλυτοποιούνται σε 500 μl Trizol κι ακολουθεί επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί προσθήκη 100 μl χλωροφόρμιου/δείγμα, επιδιώκεται καλή ανάμειξη με το χέρι και πάλι επώαση για 2-3 λεπτά σε

θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 15 λεπτά στα 11000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης αυτής βλέπουμε να έχουν σχηματιστεί 3 φάσεις:

- 1) Η υδατική στην οποία περιέχεται το RNA,
- 2) Η μέση φάση που περιέχει το DNA και
- 3) Η οργανική που περιέχει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια

Εφόσον εμείς επιθυμούμε το RNA, συλλέγουμε την υδατική φάση με ιδιαίτερα προσεκτικούς χειρισμούς σε ξεχωριστό eppendorf για το κάθε δείγμα. Προσθέτουμε 250 μl ισοπροπανόλη/δείγμα, αναδεύουμε πάρα πολύ καλά και αφήνουμε τα δείγματα για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 11000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C. Η προσθήκη της ισοπροπανόλης οδηγεί σε κατακρήμνιση του RNA, συνεπώς μετά τη φυγοκέντρωση αυτή το RNA βρίσκεται υπό μορφή ίζηματος. Αφαιρούμε όσο καλύτερα γίνεται την ισοπροπανόλη και στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε αιθανόλη 80% και πραγματοποιείται και μια τρίτη φυγοκέντρωση για 5 λεπτά στα 8000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C. Εφόσον η αιθανόλη είναι οργανικός διαλύτης όπως και η ισοπροπανόλη, η προσθήκη της στα δείγματα έχει την ίδια επίδραση. Συνεπώς και τώρα το RNA βρίσκεται στο ίζημα. Αφαιρούμε την αιθανόλη και αφήνουμε για ελάχιστο χρόνο ανοιχτά τα καπάκια ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη που δεν μπορέσαμε να απομακρύνουμε. Έπειτα, επαναδιαλυτοποιούμε το απαλλαγμένο από οργανικούς διαλύτες ίζημα σε ddH₂O και ακολουθεί ένα βήμα ποσοτικοποίησης των επιπέδων του ολικού RNA που έχει απομονωθεί από το κάθε δείγμα ξεχωριστά. Η ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται με αραιώση 1:100 ενός μέρους του απομονωμένου RNA και φωτομέτρηση αυτού στα 260 nm και 280 nm, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και έλεγχο της καθαρότητάς του (πρόσμειξη από πρωτεΐνες) αντίστοιχα.

iii. Πέψη με DNase

Με την παραπάνω διαδικασία απομόνωσης RNA, κανείς δεν μας εξασφαλίζει ότι δεν θα έχουμε και DNA στο δείγμα μας. Για το λόγο αυτό πραγματοποιούμε κι ένα βήμα πέψης με DNase, χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο της Promega, το RQ1 RNase-Free DNase που βοηθά στην αποδόμηση τόσο δίκλωνου όσο και μονόκλωνου DNA. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης θα πρέπει να είναι 10 μl εκ των οποίων το 1 μl RQ1 RNase-Free DNase 10× Reaction Buffer και 3 μl είναι το ένζυμο RQ1 RNase-Free DNase. Τα υπόλοιπα 6 μl είναι δείγμα RNA και ddH₂O. Ο όγκος αυτών των 2 δεν αποφασίζεται στην τύχη. Πρέπει να προσθέσουμε τόσα μl από το απομονωμένο δείγμα, ώστε στα 10 μl της αντίδρασης να υπάρχουν 3 μg RNA. Άρα λοιπόν, σύμφωνα με τον τύπο:

Οπτική απορρόφηση στα 260 nm \times 50 \times 100 ,

βρίσκουμε πόσα ng RNA έχουμε ανά ml δείγματος. Έπειτα με απλή μέθοδο των τριών υπολογίζουμε τα ml που χρειαζόμαστε για την αντίδραση της πέψης και συμπληρώνουμε μέχρι τα 10 με ddH₂O. Στη συνέχεια ακολουθούν οι εξής διαδικασίες:

- 1) Θέρμανση των δειγμάτων στους 37 °C για 30 λεπτά, ώστε να δράσει το ένζυμο
- 2) Προσθήκη 1 ml σε κάθε δείγμα από το αντιδραστήριο RQ1 DNase Stop Solution ώστε να μεταβληθεί το pH και να καταστεί ανενεργό το ένζυμο.
- 3) Θέρμανση όλων των δειγμάτων στους 65 °C για 5 λεπτά.

iv. Αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR)

Η RT-PCR αποσκοπεί στην μετατροπή του RNA σε cDNA. Στην παρούσα εργασία το βήμα αυτό πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο SuperScript II Reverse Transcriptase της Invitrogen. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- 1) Σε ένα tube των 0,2ml, προστίθενται 10 ml από την παραπάνω αντίδραση πέψης με DNase καθώς και 1 ml τυχαίων εξαμερών (random hexamers) και 1 ml μείγμα dNTPs.
- 2) Θέρμανση στους 65 °C για 5 λεπτά.
- 3) Γρήγορη μεταφορά στον πάγο, spin και προσθήκη των συστατικών του παρακάτω πίνακα

5x First-Stand Buffer	4 ml
DTT 1M	2 ml
RNaseOUT (40u/μL)	1 ml

- 4) Ανάδευση των δειγμάτων κι επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 5) Προσθήκη 1 ml από το ένζυμο SuperScript II RT, ανάδευση κι επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- 6) Επώαση στους 42 °C για 50 λεπτά
- 7) Τερματισμός της αντίδρασης με επώαση των δειγμάτων στους 70 °C για 15 λεπτά

Μετά το πέρας των παραπάνω αντιδράσεων παράγεται cDNA που φυλάσσεται στους -20 °C, ενώ το RNA που δεν χρησιμοποιήθηκε φυλάσσεται στους -80 °C.

v. PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Είναι μια πολύ ευαίσθητη τεχνική με μεγάλη εξειδίκευση καθώς μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και ένα αντίγραφο ενός

μεταγράφου. Αυτό που τη διαφοροποιεί από την κλασσική PCR είναι ότι παρακολουθεί την ενίσχυση του μορίου-στόχου σε πραγματικό χρόνο, δηλαδή κατά της διάρκειας της αντίδρασης κι όχι στο τέλος της. Υπάρχει μια αρχική φάση, μια εκθετική και μια φάση πλατώ (κορεσμού). Κατά την αρχική φάση το προϊόν της αντίδρασης δεν είναι ακόμη ανιχνεύσιμο, λόγω της μικρής ποσότητας στην οποία βρίσκεται. Ακολουθεί μία εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο και στη φάση πλατώ έχει επέλθει κορεσμός. Να σημειωθεί ότι όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του μορίου-στόχου στον όγκο της αντίδρασης, τόσο πιο νωρίς θα ξεκινήσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις.

Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Στην παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο SYBR Select Master Mix της Applied Biosystem. Το διάλυμα αυτό αποτελεί μείγμα AmpliTaq DNA πολυμεράσης (UP), SYBR GreenER χρωστικής, dNTPs, UDG ενζύμου και ρυθμιστικών διαλυμάτων. Πιο συγκεκριμένα κάθε αντίδραση τελικού όγκου 20 μl, περιείχε:

SYBR Green	10 μl
Εκκινητής F	0,5 μl
Εκκινητής R	0,5 μl
ddH ₂ O	8 μl
cDNA	1 μl

Επιπλέον, εφόσον οι κυτταρικές σειρές της παρούσας εργασίας προέρχονται από ποντικό και τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν χαμηλό βαθμό συντήρησης τόσο μεταξύ διαφορετικών ειδών, όσο και μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους, οι εκκινητές έπρεπε να είναι ειδικά σχεδιασμένοι για το μιτοχονδριακό γονιδίωμα του ποντικού. Έτσι, με αναζήτηση στη βιβλιογραφία βρέθηκαν εκκινητές για τα γονίδια που αναφέρθηκαν παραπάνω από 2 διαφορετικές ερευνητικές ομάδες που ασχολούνταν επίσης με την κυτταρική σειρά N2a (Manczak et al, 2010; Liu et al, 2011)). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Μόριο	Αλληλουχία	Εταιρεία
Κυτόχρωμα β – Cyt b	F: TTATCGCGGCCCTAGCAA	Invitrogen
	R: TAATCCTGTTGGGTTGTTTGATCC	
COX I	F: GAAGAGACAGTGTTCATGTGGTGT	Invitrogen
	R: TCCTGGGCCTTTCAGGAATA	
ND I	F: CCCCTTCGACCTGACAGAAG	Invitrogen
	R: GGGCCGGCTGCGTATT	
ATP 6	F: AATTACAGGCTTCCGACACAAAC	Invitrogen

	R: TGG AATTAGT GAAATTGGAGTTCCT	
16s rRNA	F: GCCTGCC CAGTGACTAAAGTTT	Invitrogen
	R: AAC AAGTGATTATGCTACCTTTGCA	
COX IV	F: CCATGTCACGATGCTGTCTG	Invitrogen
	R: CTCCCAAATCAGAACGAGCG	

Το θερμικό προφίλ που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

1 κύκλος → 2 min στους 52 °C

1 κύκλος → 2 min στους 95 °C

40 κύκλοι → 15 sec στους 95 °C, 15 sec στους 55 °C, 1 min στους 72 °C

1 κύκλος → 1 min στους 95 °C, 30 sec στους 55 °C

vi. Κλασμάτωση μιτοχονδρίων

Για συλλογή ικανοποιητικής ποσότητας μιτοχονδριακού κλάσματος, καλλιεργούμε τα κύτταρα σε τρυβλία καλλιέργειας των 150×20 mm. Η όλη διαδικασία της μιτοχονδριακής κλασμάτωσης εκτυλίσσεται στον πάγο κι έχει ως εξής: Μετά την αφαίρεση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, γίνονται μια με δύο εκπλύσεις με PBS 1× κι έπειτα προστίθεται το διάλυμα ομογενοποίησης ή αλλιώς Buffer A. Για κάθε 1 ml του Buffer A που χρησιμοποιούμε, προσθέτουμε και 10 μl Protease Inhibitors, 2 μl DTT και 0,5 μl PMSF. Τα κύτταρα συλλέγονται με το διάλυμα αυτό έπειτα από τη χρήση κατάλληλου εργαλείου κι αποχύνονται σε ειδικό φιαλίδιο του Potter Elvehjem ομογενοποιητή. Ακολουθεί ομογενοποίηση στα 2000 rpm, όπου εφαρμόζουμε 2 σετ των 10 φορών πάνω-κάτω με μεσοδιάστημα ενός λεπτού. Συλλέγουμε το κυτταρικό εναίωρημα και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στα 2500 rpm, στους 4 °C. Με τη φυγοκέντρηση αυτή απομακρύνονται πυρήνες, κυτταρικές μεμβράνες και άσπαστα κύτταρα. Συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στα 12000 rpm, στους 4 °C. Τώρα, στο ίζημα βρίσκονται μιτοχόνδρια, λυσοσώματα κι ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ στο υπερκείμενο έχουν απομείνει χαμηλότερου μοριακού βάρους οργανίδια. Αφαιρούμε το υπερκείμενο κι επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα στο οποίο βρίσκονται τα μιτοχόνδρια σε Buffer B. Η διαδικασία της φυγοκέντρησης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές και τέλος το ίζημα που απομένει αποτελεί το μιτοχονδριακό κλάσμα (MITO) που φυλάσσεται στους -80 °C. Το υπερκείμενο της δεύτερης φυγοκέντρωσης (12000 rpm) αποτελούσε το μετα-μιτοχονδριακό κλάσμα, το post-mitochondrial (PM) και αποτελούνταν από κυτταρόπλασμα και κυτταρικά οργανίδια. Ενώ ό,τι είχε εναπομείνει στο φιαλίδιο της ομογενοποίησης, αποτελούσε το total extract που περιείχε κυτταρικά οργανίδια, κυτταρόπλασμα, μεμβράνες κι άσπαστα κύτταρα.

vii. Ανοσοκατακρήμνιση (Immunoprecipitation-IP)

Η ανοσοκατακρήμνιση αποτελεί μία μορφή χρωματογραφίας συγγένειας. Σε αυτήν, ως στερεή φάση χρησιμοποιούνται σφαιρίδια από αγαρόζη ή κάποιο ανάλογο υλικό. Πάνω στα σφαιρίδια βρίσκονται ομοιοπολικά δεσμευμένες πρωτεΐνες A ή πρωτεΐνες G, που προέρχονται από βακτήρια κι έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν με μεγάλη συγγένεια την Fc περιοχή ορισμένων τύπων IgG ανοσοσφαιρινών. Έτσι, σχηματίζονται σύμπλοκα σφαιριδίων-πρωτεϊνών A/G-αντισωμάτων, όπου δεσμεύεται επιλεκτικά το αντιγόνο προς κατακρήμνιση και μαζί οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με αυτό.

Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει την δημιουργία συμπλόκων των πρωτεϊνών A και G που ήδη είναι δεσμευμένες στα σφαιρίδια με τα αντισώματα, λύση των μιτοχονδρίων, επώαση του μιτοχονδριακού εκχυλίσματος με το σύμπλοκο πρωτεΐνης A/G-αντισώματος και συλλογή των πρωτεϊνών που κατακρημνίστηκαν. Πιο αναλυτικά:

Προετοιμασία αντισωμάτων

Χρησιμοποιούμε μείγμα των σφαιριδίων που φέρουν πρωτεΐνη A με σφαιρίδια που είναι συνδεδεμένα με πρωτεΐνη B. Θέλουμε συνολικά 50 μl σφαιριδίων για κάθε δείγμα. Τα σφαιρίδια φυλάσσονται σε περίσσεια 70 % αιθανόλης για να μην στεγνώσουν. Η αιθανόλη απομακρύνεται σε πρώτη φάση με φυγοκέντρηση των σφαιριδίων για 3 min στα 2000 rpm, στους 4 °C. Έπειτα, προστίθεται 1 ml RIPA buffer, τα σφαιρίδια αναδεύονται για 5 λεπτά, στους 4 °C και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στα 2000 rpm, στους 4 °C. Αυτό το στάδιο επαναλαμβάνεται μια φορά ακόμη. Ακολούθως, χωρίζουμε τα σφαιρίδια σε τόσα ίσα μέρη, ανάλογα με τον αριθμό των διαφορετικών αντισωμάτων που θα χρησιμοποιήσουμε ή ανάλογα με τα διαφορετικά κλάσματα που έχουμε. Ακόμη, κρατάμε σφαιρίδια και για το στάδιο pre-clearance που θα περιγραφεί παρακάτω. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη των αντισωμάτων στα σφαιρίδια. Προσθέτουμε x μl RIPA buffer και όσα μl από το εκάστοτε αντίσωμα απαιτούνται ώστε να υπάρχουν 2 μg αυτού στο τελικό διάλυμα. Προκειμένου να σχηματιστούν τα επιθυμητά σύμπλοκα, σύμφωνα με τα παραπάνω, πραγματοποιείται επώαση 4 ωρών των αντισωμάτων με τα σφαιρίδια υπό ανάδευση, στους 4 °C.

Προετοιμασία μιτοχονδριακού εκχυλίσματος

Στο χρονικό διάστημα επώασης των αντισωμάτων με τα σφαιρίδια, προετοιμάζουμε το μιτοχονδριακό εκχύλισμα. Πρώτα, επαναδιαλυτοποιούμε το σύνολο των μιτοχονδριακών ιζημάτων σε έναν α όγκο RIPA buffer, ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος. Για κάθε 1 ml RIPA buffer που χρησιμοποιούμε, προσθέτουμε και 10 μl Protease Inhibitors, 2 μl DTT και 0,5 μl PMSF. Τα 3 αυτά συστατικά προστίθενται σε κάθε διάλυμα που χρησιμοποιείται για διαδικασίες λύσης κυττάρων ή οργανιδίων, ώστε όταν κατά τη λύση απελευθερώνονται πρωτεολυτικά ένζυμα να μην καταστρέφονται οι πρωτεΐνες. Έπειτα,

ομογενοποιούμε τα μιτοχόνδρια με τη χρήση υπερήχων, εφαρμόζοντας 3 σετ των 10 δευτερολέπτων με μεσοδιάστημα ενός λεπτού. Κατά τη διαδικασία αυτή, το δείγμα βρίσκεται στον πάγο. Μετά το βήμα αυτό, προστίθεται στο εκχύλισμα PBS 1× που φέρει κι αυτό τους κατάλληλους αναστολείς πρωτεασών, όπως το RIPA. Η αναλογία όγκων των PBS και RIPA στο τελικό διάλυμα πρέπει να είναι 4:1. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 13000 rpm, στους 4 °C και το υπερκείμενο προστίθεται σε eppendorf με σφαιρίδια, αλλά χωρίς αντίσωμα για επώαση μια ώρα υπό ανάδευση, στους 4 °C. Το βήμα αυτό ονομάζεται pre-clearance κι εφαρμόζεται ώστε να απομακρυνθεί από το εκχύλισμα ένα ορισμένο ποσοστό πρωτεϊνών που μπορεί να συνδεθούν μη ειδικά με τα αντισώματα

Μετά το πέρας των απαραίτητων χρόνων επώασης, το μιτοχονδριακό εκχύλισμα διαμοιράζεται ισόποσα σε κάθε eppendorf με διαφορετικό αντίσωμα κι ακολουθεί επώαση για 16 ώρες υπό ανάδευση, στους 4 °C. Την επόμενη μέρα, φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 4 λεπτά στα 3000 rpm, στους 4 °C, ώστε να απομακρύνουμε τα συστατικά του εκχυλίσματος που δεν κατακρημνίστηκαν (unbound). Ακολουθούν 4 εκπλύσεις με PBS 1× κι έπειτα, προσθέτουμε στα σφαιρίδια sample buffer 2×. Αναδεύουμε προσεκτικά και τα θερμαίνουμε στους 95 °C για 2 λεπτά. Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 2000 rpm, στους 20 °C και συλλέγουμε σε νέο eppendorf το υπερκείμενο. Επαναλαμβάνουμε το βήμα με το sample buffer και αφού συλλέξουμε για δεύτερη φορά το υπερκείμενο, πραγματοποιούμε μια τελευταία φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 2000 rpm, στους 20 °C, ώστε να απομακρύνουμε τυχόν υπολείμματα σφαιριδίων που μπορεί να συλλέχθηκαν μαζί με το υπερκείμενο. Έτσι, πλέον έχουμε συλλέξει τις πρωτεΐνες που κατακρημνίστηκαν.

viii. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Για πηκτή πάχους 1,5 mm και περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδα 9%, η σύσταση έχει ως εξής:

Πηκτή διαχωρισμού (separating)

ddH ₂ O	3,9 ml
1,5 M Tris HCl pH= 8,8	1,875 ml
SDS 10%	75 μl
Bis Acr. 40%	1,688 ml
Temed	3,75 μl
APS 10%	37,5 μl

Αφού πήξει η πηκτή διαχωρισμού, ετοιμάζουμε την πηκτή επιστοίβαξης (stacking).

ddH ₂ O	3,038 ml
1,5 M Tris HCl pH= 6,8	0,315 ml
SDS 10%	37,5 μ l
Bis Acr. 40%	0,375 ml
Temed	3,75 μ l
APS 10%	18,75 μ l

Φορτώνουμε τα δείγματα κι εφαρμόζεται τάση ίση με 0,02 A. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι 2 με 2μιση ώρες.

ix. Silver Staining για 2D gels συμβατό με φασματομετρία μάζας

Το silver staining είναι μια μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών που έπεται της ηλεκτροφόρησης πηκτών ακρυλαμιδίου και χαρακτηρίζεται από την υψηλή ευαισθησία της, τα φθηνά αναλώσιμα και την ευκολία της εφαρμογής της. Η λογική του silver staining είναι απλή. Οι πρωτεΐνες δεσμεύουν ιόντα αργύρου, τα οποία μπορούν να μειωθούν σε αριθμό υπό κατάλληλες συνθήκες με σκοπό την δημιουργία εμφανούς εικόνας από τον άργυρο. Η διαδικασία έχει ως εξής:

Μετά την ηλεκτροφόρηση, κόβεται το stacking και το separating επωάζεται με το fixing solution για 20 λεπτά. Ακολουθούν 2 πλύσεις των 5 λεπτών η κάθε μια με το washing solution, τις οποίες διαδέχονται 3 πλύσεις των 3 λεπτών έκαστη με ddH₂O και μια τέταρτη με και 5 μ g/ml DTT. Έπειτα, σε διάστημα ενός λεπτού πρέπει να προστεθεί και να αφαιρεθεί το sensitizing solution, ενώ η πηκτή βρίσκεται υπό ανάδευση. Πραγματοποιούμε 3 πλύσεις με ddH₂O που διαρκούν μερικά δευτερόλεπτα και επωάζουμε την πηκτή για 20 λεπτά με κρύο staining solution στους 4 °C. Μετά το πέρας της επώασης, η πηκτή εκπλένεται με ddH₂O 2 φορές, από ένα λεπτό κάθε φορά. Επόμενο βήμα είναι η εμφάνιση των πρωτεϊνών που έβαψε ο νιτρικός άργυρος, χρησιμοποιώντας το developing solution. Προσθέτουμε ορισμένη ποσότητα αυτού, αναδεύουμε και ανανεώνουμε κάθε 25 περίπου δευτερόλεπτα. Επαναλαμβάνουμε όσες φορές χρειαστεί και όταν δούμε ότι οι επιθυμητές ζώνες εμφανίζονται σε ικανοποιητικό βαθμό, σταματάμε την αντίδραση εμφάνισης με το stop solution. Τέλος, η πηκτή αποθηκεύεται με το storing solution που την κρατά ενυδατωμένη στους 4 °C έως τη στιγμή της ανάλυσής της με φασματομετρία μάζας.

x. Φασματομετρία μάζας (Mass spectrometry-MS)

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια αναλυτική τεχνική για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό του τύπου των χημικών ουσιών που υπάρχουν σε ένα δείγμα, μέσα από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μάζας κάθε ένωσης. Πιο ειδικά, ένα δείγμα που βρίσκεται σε αέρια φάση και σε συνθήκες υψηλού κενού, «βομβαρδίζεται» με ηλεκτρόνια σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης, οπότε τα μόρια της ένωσης

μετατρέπονται σε θραύσματα (fragments) με θετικό συνήθως φορτίο. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων, τα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζα/ηλεκτρικό φορτίο (m/z), αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Με κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z . Το διάγραμμα της έντασης του μετρούμενου ρεύματος (σε σχετικές και όχι απόλυτες μονάδες) σε συνάρτηση με το λόγο m/z ονομάζεται φάσμα μαζών (mass spectrum) της ουσίας. Επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα ένα φορτίο ο λόγος m/z αντιστοιχεί αριθμητικά με το μοριακό βάρος του ιόντος. Στην παρούσα εργασία τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη MS, αρχικά επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού linux, για αφαίρεση των μορίων που ήταν κοινά μεταξύ των συνθηκών control και των δειγμάτων. Το λογισμικό αυτό φέρει το πλεονέκτημα ότι σε σύντομο χρονικό διάστημα και με τη χρήση κατάλληλων εντολών μπορούμε να ολοκληρώσουμε διεργασίες που με τη χρήση του υπολογιστικού φύλλου excel θα απαιτούνταν πολύς χρόνος. Έπειτα, τα μόρια των δειγμάτων απαλλαγμένα πια από τα κοινά μόρια με τη συνθήκη control αναλύθηκαν με βάση το πρόγραμμα David Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis ώστε να κατηγοριοποιηθούν σε μονοπάτια ανάλογα με τη βιολογική τους δράση.

xi. Εξισορρόπηση και ηλεκτρομεταφορά

Ωστόσο, μπορεί μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, να θέλουμε να εφαρμόσουμε κάποια ανοσοτεχνική αντί της χρώσης της πηκτής με νιτρικό άργυρο. Τότε, πραγματοποιούμε μεταφορά των πρωτεϊνών της πηκτής σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης έπειτα από την εφαρμογή κατάλληλης τάσης. Πιο ειδικά, όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση γίνεται εξισορρόπηση, δηλαδή η εμβάπτιση της μεμβράνης, των σφουγγαριών, των χαρτιών whatman, καθώς και της πηκτής, στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς για 15 λεπτά. Για να ξεκινήσει η ηλεκτρομεταφορά, πρέπει η πηκτή και η μεμβράνη να τοποθετηθούν με συγκεκριμένο τρόπο σε μια ειδική κασετίνα. Αναλυτικότερα, στη μαύρη πλευρά της κασετίνας, τοποθετείται πρωτίστως, ένα σφουγγαράκι, ένα χαρτί whatman, ενώ με το δεύτερο «ψαρεύουμε» την πηκτή από το διάλυμα. Ακολουθεί η μεμβράνη, δύο ακόμη χαρτιά whatman και ένα σφουγγαράκι, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στο να μην υπάρχουν φυσαλίδες μεταξύ πηκτής και μεμβράνης, διότι στα σημεία αυτά, δημιουργείται κενός χώρος και οι πρωτεΐνες δεν μεταφέρονται στη μεμβράνη. Έπειτα η κασετίνα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς με συγκεκριμένη φορά, προστίθεται το διάλυμα, καθώς και παγκάκιστες, διότι κατά της διαδικασία αυτή αναπτύσσονται πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Ρυθμίζεται η τάση στα 0,35 A και η διαδικασία διαρκεί 70 λεπτά.

xii. Blocking με γάλα κι επώαση με πρώτο αντίσωμα

Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε διάλυμα PBST 1× 10% γάλα. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται προκειμένου οι μη ειδικές θέσεις στη μεμβράνη να καλυφθούν από τα αντισώματα του γάλακτος για να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες εμφάνισης ψευδούς θετικού αποτελέσματος ή μεγάλου Background, λόγω μη ειδικής σύνδεσης του αντισώματος που θα εφαρμοστεί. Ακολουθεί 1 έκπλυση με PBST 1× και προστίθεται στη μεμβράνη το πρωτογενές αντίσωμα για επώαση 16 ωρών (overnight). Φροντίζουμε ώστε το πρωτογενές αντίσωμα να εφαρμοστεί στη μεριά της μεμβράνης που κατά την ηλεκτρομεταφορά ερχόταν σε επαφή με την επιφάνεια της πηκτής.

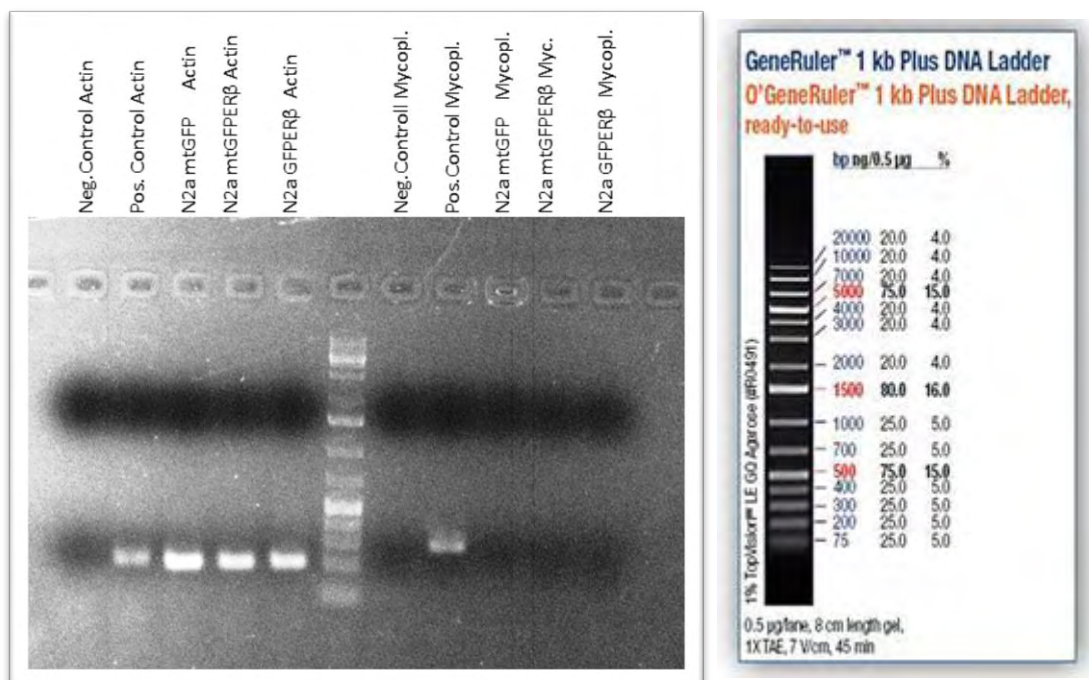
xiii. Προσθήκη δευτερογενούς αντισώματος και ανοσοαποτύπωση κατά Western

Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει συγκεκριμένες επιτόπους των Fc περιοχών των πρωτογενών αντισωμάτων και είναι ειδικό έναντι του ζώου από το οποίο έχει παραχθεί το πρωτογενές αντίσωμα. Επιπλέον, το δευτερογενές αντίσωμα είναι σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση χρένου που επιτρέπει την ανίχνευση του σήματος. Πιο ειδικά, έπειτα από την overnight επώαση, πραγματοποιούνται 5 πλύσεις της μεμβράνης των 5 λεπτών η κάθε μια με PBST 1× και στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα. Ακολουθούν και πάλι πλύσεις με PBST 1× και προστίθεται το κατάλληλο υπόστρωμα με τους ενισχυτές σήματος (ECL A και B) ώστε τελικά να επιτραπεί η εμφάνισή του. Η αναλογία των ECL A και B είναι 1:1 και η επώαση με το υπόστρωμα του ενζύμου διαρκεί 3 λεπτά κι απαιτεί σκοτάδι. Κατόπιν, έπεται η διαδικασία της εμφάνισης σήματος, η οποία λαμβάνει χώρα σε σκοτεινό θάλαμο. Η διαδικασία περιλαμβάνει, την τοποθέτηση κατάλληλου μήκους film εντός τη κασετίνας και την επαφή του με τη μεμβράνη για το χρόνο που απαιτείται. Έπειτα, το film εμβαπτίζεται διαδοχικά σε διάλυμα developer υπό ανάδευση για περίπου 1 min, ξεπλένεται ελαφρώς σε νερό και αμέσως τοποθετείται σε διάλυμα σταθεροποίησης σήματος fixer (ομοίως υπό ανακίνηση για χρονική διάρκεια περίπου ενός λεπτού). Ξεπλένεται και πάλι σε νερό και κατόπιν εξετάζεται το αποτέλεσμα της εμφάνισης. Αναλόγως του αποτελέσματος επαναλαμβάνουμε, εκθέτοντας το film για διαφορετικό χρονικό διάστημα στη μεμβράνη.

4. Αποτελέσματα

4.1 Έλεγχος καθαρότητας κυτταρικών σειρών N2a mtGFP, αποικία 19, N2a mtGFPERβ, αποικία 38 και N2a GFPERβ, αποικία 25

Σημαντικό για τις πειραματικές διεργασίες της παρούσας μελέτης ήταν να γνωρίζουμε εάν οι κυτταρικές σειρές με τις οποίες δουλέψαμε ήταν καθαρές από μυκόπλασμα. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε η μέθοδος PCR με χρήση ειδικών εκκινητών, σε απομονωμένο DNA από τις κυτταρικές σειρές που προαναφέρθηκαν. Έτσι, έπειτα από εφαρμογή των πειραματικών μεθόδων που περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα, λάβαμε την εξής εικόνα:



Εικόνα 11. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για ενίσχυση ακτίνης και μυκοπλάσματος σε κυτταρικές σειρές N2a mtGFP, αποικία 19, N2a mtGFrERβ, αποικία 38 και N2a GFPERβ, αποικία 25

Το προϊόν της PCR του μυκοπλάσματος έχει μέγεθος περίπου 434-468 bp. Παρατηρούμε ότι τα προϊόντα της PCR των δειγμάτων N2a mtGFP, N2a mtGFPERβ και N2a GFPERβ δεν παρουσιάζουν ζώνη DNA στο μέγεθος των βάσεων που παρουσιάζει το θετικό control. Άρα, οι κυτταρικές σειρές μας μπορούν να θεωρηθούν απαλλαγμένες από την παρουσία μυκοπλάσματος. Επιπλέον, βλέπουμε πως όλες οι κυτταρικές σειρές εμφανίζουν προϊόν στην αντίδραση ενίσχυσης της ακτίνης, συνεπώς η διαδικασία απομόνωσης DNA ολοκληρώθηκε σωστά και το αποτέλεσμα της PCR για το μυκόπλασμα μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστο.

4.2 Έλεγχος της επίδρασης του μιτοχονδριακού υποδοχέα οιστρογόνων β στη μιτοχονδριακή μεταγραφή

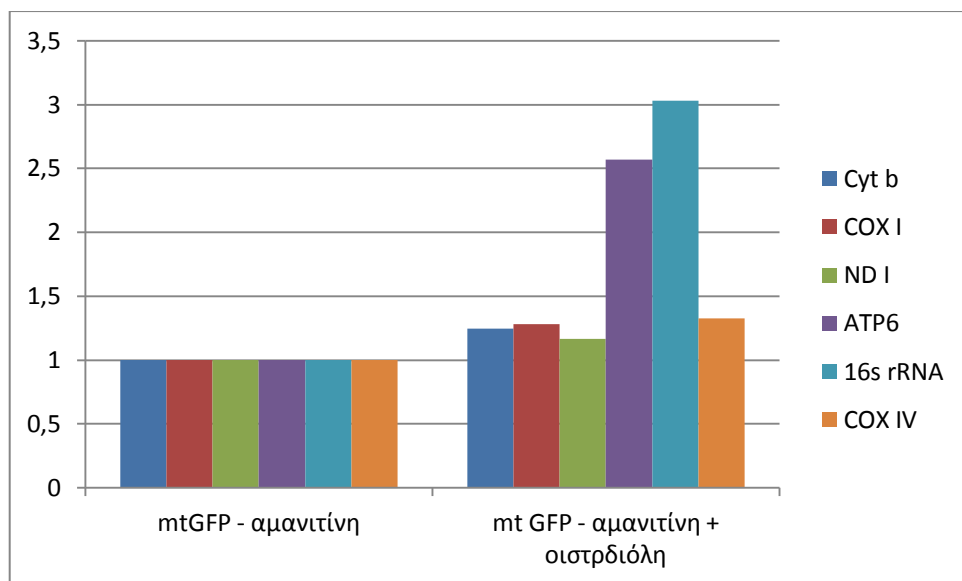
Έπειτα, θέλαμε να ελέγξουμε κατά πόσο ο ενδογενής μιτοχονδριακός ERβ ελέγχει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή, επηρεάζοντας τα επίπεδα έκφρασης των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, μετά την ενεργοποίησή του από την οιστραδιόλη. Για το λόγο αυτό, ακολουθήθηκε μια εκτενής πειραματική διεργασία που ως αφετηρία είχε την κατεργασία των κυττάρων N2a mtGFP, αποικία 19, με συγκεκριμένες ουσίες. Επιλέξαμε τα κύτταρα N2a mtGFP για αυτήν τη μελέτη, δεδομένου ότι οι μελλοντικοί στόχοι μας αποσκοπούν στην πραγματοποίηση μιας εκτενέστερης μελέτης, αξιοποιώντας τα κύτταρα N2a mtGFPERβ, για τη διερεύνηση του ερωτήματος του ρόλου του mtERβ στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και της δράσης της αναπνευστικής αλυσίδας – οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Η παραπάνω κυτταρικής σειράς καλιεργήθηκε σε 4 διαφορετικές συνθήκες:

- 5) Control
- 6) Παρουσία οιστραδιόλης
- 7) Παρουσία α-αμανιτίνης
- 8) Παρουσία α-αμανιτίνης και οιστραδιόλης

Η παρουσία της α-αμανιτίνης αποσκοπούσε στην αναστολή της πυρηνικής RNA πολυμεράσης άρα και πυρηνικής μεταγραφής. Όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, έγινε απομόνωση ολικού RNA, πέψη των υπολειμμάτων DNA και αντίστροφη μεταγραφή. Με το cDNA που προέκυψε εφαρμόστηκαν διαδοχικές αντιδράσεις Real Time PCR για τον έλεγχο των επιπέδων mRNA των μιτοχονδριακών γονιδίων που κωδικοποιούν για: κυτόχρωμα B, COX I, ND I, ATP6, 16s rRNA με μόριο κανονικοποίησης σε κάθε ξεχωριστή αντίδραση την β-ακτίνη. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε και μια αντίδραση Real Time PCR με εκκινητές για το πυρηνικό γονίδιο που κωδικοποιεί για το COX IV. Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στην ενότητα του πειραματικού μέρους.

Τα αποτελέσματα των ξεχωριστών αντιδράσεων που φαίνονται στο παρακάτω γράφημα, αναλύθηκαν στο πρόγραμμα excel με τη χρήση της μεθόδου ανάλυσης Livak. Σε κάθε ξεχωριστή αντίδραση για κάθε μόριο που ελέγχθηκε, εφαρμόστηκαν 2 επαναλήψεις για κάθε cDNA προερχόμενο από διαφορετική συνθήκη. Ακόμη, στο παρακάτω διάγραμμα δεν σημειώνονται γραμμές σφάλματος, καθώς πραγματοποιήθηκε μόνο ένα πείραμα και από τις επαναλήψεις των διαφορετικών cDNA λαμβανόταν ο μέσος όρος. Σημειώνουμε ότι οι διακυμάνσεις των τιμών ως προς τη μέση τιμή κυμαίνονται από 0-3,7%.



Γράφημα 1. Αποτελέσματα Real Time PCR των επιπέδων mRNA 5 μιτοχονδριακών γονιδίων και ενός πυρηνικού που φαίνονται στο υπόμνημα από κύτταρα N2a mtGFP, αποικία 19

Πιο αναλυτικά, θεωρούμε ως συνθήκη control την κατεργασία των κυττάρων με α-αμανιτίνη και τη συγκρίνουμε με τα αποτελέσματα που πήραμε από τις αντιδράσεις Real Time PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το cDNA των κυττάρων που επωάστηκαν ταυτόχρονα με α-αμανιτίνη και οιστραδιόλη. Όπως ήδη αναφέρθηκε, εφόσον η αμανιτίνη αναστέλλει την πυρηνική μεταγραφή μέσω αναστολής της ενζυμικής δράσης της RNA πολυμεράσης II, οποιαδήποτε παρατηρούμενη επαγωγή στην παραγωγή μιτοχονδριακών mRNA, υπό τη δράση της οιστραδιόλης είναι αποτέλεσμα της απ' ευθείας ενεργοποίησης της μιτοχονδριακής μεταγραφής. Άρα λοιπόν, οι διαφορές που παρατηρούνται στα επίπεδα mRNA των γονιδίων που προαναφέρθηκαν, μεταξύ των συνθηκών επώασης με αμανιτίνη και αμανιτίνη με οιστραδιόλη, οφείλονται στην απ' ευθείας δράση της οιστραδιόλης στην μιτοχονδριακή μεταγραφή. Παρουσία αμανιτίνης και οιστραδιόλης στα κύτταρα, ο ενεργοποιημένος ERβ δεν μπορεί να ασκήσει την πυρηνική του δράση λόγω αναστολής από την αμανιτίνη. Γεγονός που επαληθεύεται από τη μη ενεργοποίηση της μεταγραφής της πυρηνικά κωδικοποιούμενης υπομονάδας COXIV, παρουσία οιστραδιόλης σε κύτταρα που έχουν κατεργαστεί με αμανιτίνη. Έτσι, συμπεραίνουμε ότι οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των 2 αυτών συνθηκών πιθανόν να οφείλονται στην ενεργοποίηση και δράση του ERβ στο μιτοχόνδριο.

Από τα 5 μιτοχονδριακά μόρια, στο γράφημα 1, τα επίπεδα mRNA των ATP 6 και 16s rRNA παρουσία αμανιτίνης και οιστραδιόλης φαίνονται 2,5 και 3 φορές πάνω έκαστο σε σχέση με τα επίπεδα αυτών παρουσία αμανιτίνης και απουσία οιστραδιόλης, που στην προκειμένη περίπτωση θεωρούνται ως control. Το γονίδιο ATP 6 κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που αποτελεί μέρος της ATP συνθάσης και είναι ορθόλογο με το αντίστοιχο μιτοχονδριακό γονίδιο του ανθρώπου. Αύξηση στα επίπεδα των μεταγράφων του όταν προστίθεται

οιστραδιόλη στο θρεπτικό μέσο ίσως να προμηνύει ανάμειξη του ενεργοποιημένου μιτοχονδριακού υποδοχέα στο μηχανισμό της μεταγραφής του, ώστε τελικά να αυξηθεί η παραγωγή ενέργειας στο μιτοχόνδριο. Το γονίδιο για το 16s rRNA κωδικοποιεί για το μόριο RNA 16s που αποτελεί συστατικό της 39s ριβοσωμικής μιτοχονδριακής υπομονάδας. Μαζί με το 12s rRNA είναι απαραίτητο για τη μετάφραση των μιτοχονδριακών mRNAs σε πρωτεΐνες. Άρα λοιπόν, αύξησή του παρουσία οιστραδιόλης σε κύτταρα που έχουν κατεργαστεί με αμανιτίνη υποδηλώνει όπως προαναφέρθηκε σε άμεση εμπλοκή του μιτοχονδριακού ERβ στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και πρωτεϊνοσύνθεσης. Παρόλα αυτά, τα παραπάνω αποτελούν πρωταρχικές παρατηρήσεις κι απαιτείται επανάληψη και εκτεταμένη μελέτη μέσω πραγματοποίησης των παραπάνω διαδικασιών σε κυτταρικές σειρές N2a mtGFPERβ που υπερεκφράζουν τον μιτοχονδριακό ERβ σε σχέση με κύτταρα μάρτυρες. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θα μας οδηγήσουν στην επιβεβαίωση και διαλεύκανση των μηχανισμών της απ' ευθείας ρύθμισης της μιτοχονδριακής μεταγραφής από τον υποδοχέα.

Για τα 2 μόρια που επεξηγούνται παραπάνω, οι τιμές που ελήφθησαν κατά την ολοκλήρωση της Real Time PCR για κάθε επανάληψη παρουσιάζονται παρακάτω:

	cDNA προερχόμενο από mtGFP με αμανιτίνη		
Μόριο	1^ο duplicate	2^ο duplicate	Μέσος όρος
ATP6	15,60	15,78	15,69
16s rRNA	12,81	12,37	12,59
β-ακτίνη	24,68	24,20	24,44

	cDNA προερχόμενο από mtGFP με αμανιτίνη + οιστραδιόλη		
Μόριο	1^ο duplicate	2^ο duplicate	Μέσος όρος
ATP6	15,72	16,06	15,87
16s rRNA	12,86	12,20	12,53
β-ακτίνη	25,84	26,16	25,98

4.3 Χαρακτηρισμός των μορίων που αλληλεπιδρούν με τη μιτοχονδριακή μορφή του ERβ

Σημαντικό ήταν επίσης να ελέγξουμε με ποια μόρια αλληλεπιδρά ο ERβ στο μιτοχόνδριο και σε τι μονοπάτια συμμετέχουν τα μόρια αυτά, κάτι που ελέγχθηκε με την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης και πρωτεομικής ανάλυσης. Ωστόσο, επειδή μας ενδιέφεραν συγκεκριμένα οι αλληλεπιδράσεις εντός των μιτοχονδρίων, οι κυτταρικές σειρές N2a mtGFP και N2a mtGFPERβ καλλιεργούνταν σε τρυβλία καλλιέργειας των 150×20 mm ώστε με την τεχνική της

κλασμάτωσης να συλλεχθούν ικανοποιητικές ποσότητες μιτοχονδριακών κλασμάτων.

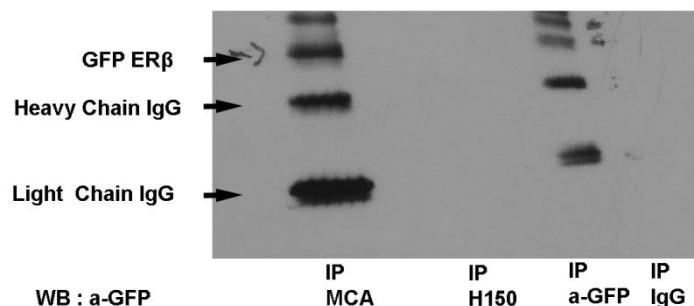
Προτού προβούμε στη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης, έπρεπε να αποφασίσουμε ποιο από τα διαθέσιμα αντισώματα του εργαστηρίου ήταν το πιο κατάλληλο για την αποτελεσματική κατακρήμνιση του υποδοχέα ERβ. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε μια δοκιμαστική ανοσοκατακρήμνιση με τη χρήση κυττάρων N2a GFPERβ, αποικία 25. Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της ανοσοκατακρήμνισης του GFPERβ με χρήση καθενός από τα τρία αντισώματα που παραθέτονται στη συνέχεια έγινε με την τεχνική Western Blot. Έτσι λοιπόν, με ολικό εκχύλισμα από τα κύτταρα αυτά, ελέγξαμε 3 αντισώματα:

- Αντίσωμα έναντι GFP από επίμου
- Αντίσωμα έναντι ERβ από επίμου, MCA
- Αντίσωμα έναντι ERβ από κόνικλο, ERβ H150

και ως αντίσωμα για συνθήκη control χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι IgG προερχόμενο από επίμου.

Έπειτα από ανοσοκατακρήμνιση και μετά την ανάκτηση των πρωτεϊνών που δεσμεύτηκαν μαζί με τον ERβ στο αντίσωμα έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική ακρυλαμίδης, υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Η σειρά των δειγμάτων στην πηκτική έχει ως εξής: marker – IP IgG – IP GFP – IP H150 – IP MCA

Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, blocking με γάλα, κι έπειτα επώαση της μεμβράνης όλο το βράδυ με αντίσωμα έναντι του GFP σε αραιώση 1:5000. Το πρωί της επόμενης μέρας, μετά από τις απαραίτητες εκπλύσεις και την επώαση μιας ώρας με δευτερογενές αντίσωμα έναντι mouse σημασμένο με υπεροξειδάση χρένου, προστέθηκε το κατάλληλο υπόστρωμα με τους ενισχυτές σήματος (ECL A και B) ώστε τελικά να επιτραπεί η εμφάνιση του σήματος. Μετά και από τη διαδικασία εμφάνισης του σήματος σε σκοτεινό θάλαμο, λάβαμε την εξής εικόνα:

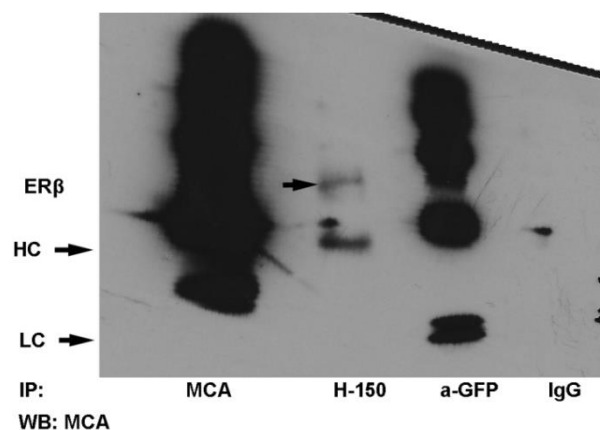


Εικόνα 12. Ανοσοαποτύπωση Western Blot με αντίσωμα έναντι GFP σε χρόνο έκθεσης 2 λεπτών

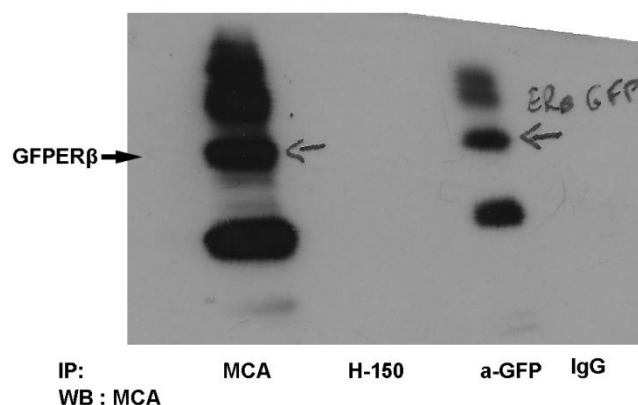
Στην εικόνα, που προέκυψε έπειτα από χρόνο έκθεσης 2 λεπτών, μπορούμε να διακρίνουμε τις ελαφριές (26 kDa) και βαριές (55 kDa) αλυσίδες των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκακρήμνιση στις διαδρομές

IP MCA και IP GFP, κάτι που δεν φαίνεται στις διαδρομές IP H150 και IP IgG. Αυτό οφείλεται στο ότι τα αντισώματα αυτά προέρχονται από ορούς κονίκλου και αίγας αντίστοιχα, οπότε το δευτερογενές αντίσωμα έναντι mouse που εμείς εφαρμόσαμε δεν μπορεί να τα αναγνωρίσει το ίδιο καλά με τα αντισώματα έναντι GFP και MCA που προέρχονται από επίμου. Ακόμη, πάλι στις διαδρομές IP MCA και IP GFP διακρίνουμε και μία ζώνη κοντά στα 90 kDa, όπου και αναμένεται η χιμαιρική πρωτεΐνη GFPERβ.

Για μια πιο καλή εκτίμηση του αποτελέσματος και για την επιβεβαίωση της πληροφορίας, η ίδια μεμβράνη επωάστηκε και με αντίσωμα έναντι ERβ (MCA) σε αραιώση 1:500 και μετά τη διαδικασία εμφάνισης του σήματος λάβαμε τις παρακάτω εικόνες σε διαφορετικούς χρόνους έκθεσης:



Εικόνα 13. Ανοσοαποτύπωση Western Blot με αντίσωμα έναντι ERβ (MCA) σε χρόνο έκθεσης 3 λεπτών

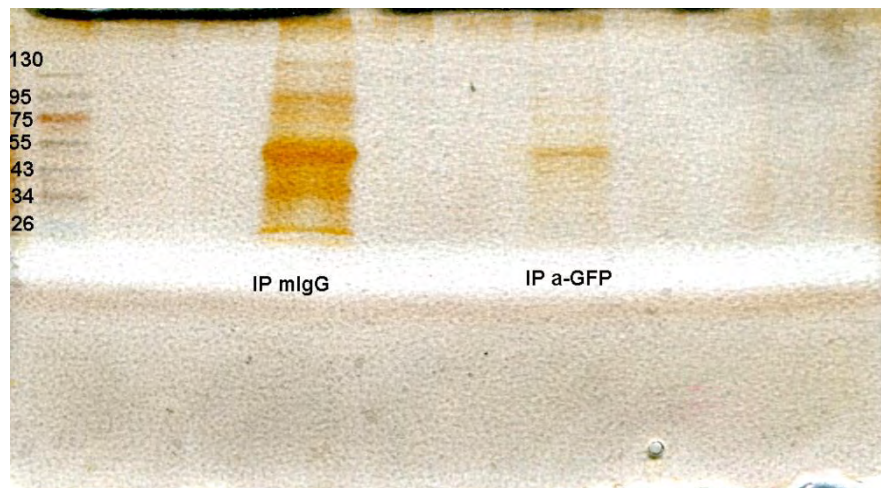


Εικόνα 14. Ανοσοαποτύπωση Western Blot με αντίσωμα έναντι ERβ (MCA) σε χρόνο έκθεσης 15 δευτερολέπτων

Και στις εικόνες αυτές εμφανίζονται οι βαριές κι ελαφριές αλυσίδες των αντισωμάτων έναντι GFP και MCA, καθώς και η χιμαιρική πρωτεΐνη (εικόνα 13),

με τη διαφορά ότι σε πολύ μεγάλη έκθεση (εικόνα 14) εμφανίζονται και οι βαριές αλυσίδες στη διαδρομή IP H150, όπως επίσης και μια ζώνη στα 66 kDa που αντιστοιχεί στον ενδογενή ERβ. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι 2 από τα 3 διαθέσιμα αντισώματα του εργαστηρίου, GFP και MCA, αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με τη χιμαιρική πρωτεΐνη που υπερεκφράζει η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήσαμε, εφόσον καταφέραμε να διακρίνουμε ζώνη στο αναμενόμενο μοριακό βάρος ακόμα και σε μικρό χρόνο έκθεσης. Αντίθετα, το αντίσωμα H150 φαίνεται να αλληλεπιδρά ασθενέστερα, αφού καταφέραμε να ανιχνεύσουμε σήμα μόνο μετά από 3 λεπτά έκθεσης, χωρίς να δούμε ζώνη που να αντιστοιχεί στη χιμαιρική πρωτεΐνη, αλλά μόνο στον ενδογενή υποδοχέα. Η πρωτεϊνική ζώνη μοριακού βάρους μεγαλύτερου από 170kDa πιθανόν να αντιστοιχεί είτε σε μη ειδική χρώση είτε σε ομοδιμερή ή ετεροδιμερή του υποδοχέα που δεν διαχωρίστηκαν υπό τις συνθήκες του πειράματος.

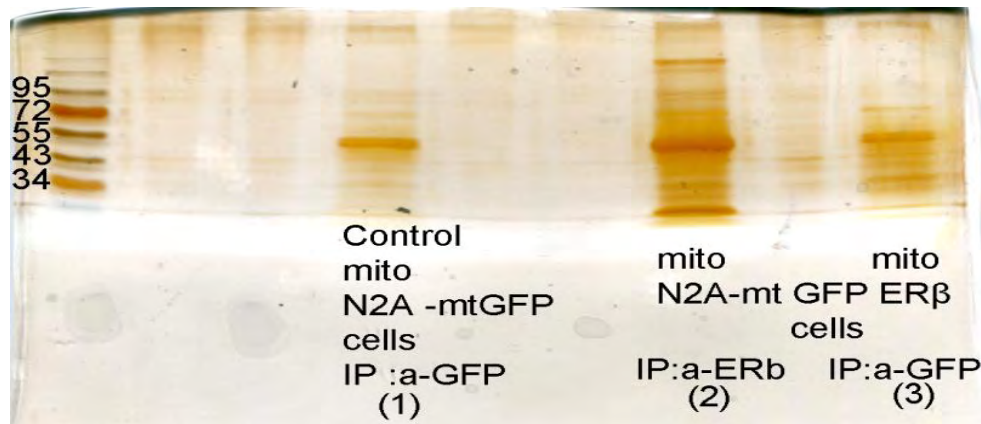
Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, αποφασίστηκε ότι το αντίσωμα έναντι GFP ήταν κατάλληλο για την κατακρήμνιση της χιμαιρικής πρωτεΐνης GFPERβ μαζί με τα μόρια που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με αυτήν. Έτσι λοιπόν, ως αντίσωμα control χρησιμοποιήθηκε mouse IgG και για την κατακρήμνιση της χιμαιρικής πρωτεΐνης το αντίσωμα έναντι GFP. Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν μόνο μιτοχονδριακά κλάσματα προερχόμενα από την κυτταρική σειρά N2a mtGFPERβ, αποικία 38. Έπειτα από χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο, το αποτέλεσμα ήταν το παρακάτω:



Εικόνα 15. Χρώση με νιτρικό άργυρο των πρωτεϊνών των συμπλόκων ανοσοκατακρήμνισης μετά την ηλεκτροφόρησή τους.

Παρόλα αυτά, θεωρήθηκε αναγκαία μια επανάληψη της ανοσοκατακρήμνισης με τη χρήση μιτοχονδριακών κλασμάτων τόσο από την κυτταρική σειρά N2a mtGFPERβ, αποικία 38, όσο και από την κυτταρική σειρά N2a mtGFP, αποικία 19 που χρησίμευσαν ως control. Επιπλέον, στο δεύτερο αυτό πείραμα, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση και με ένα επιπλέον αντίσωμα πέρα από αυτό έναντι του GFP. Χρησιμοποιήθηκε και το αντίσωμα έναντι ERβ (MCA). Για την επαναληπτική ανοσοκατακρήμνιση συλλέχθηκε

μεγαλύτερος όγκος μιτοχονδρίων (από σύνολο 8 τρυβλίων καλλιέργειας) και για τις 2 κυτταρικές σειρές απ' ότι στο πρώτο πείραμα. Παρακάτω φαίνεται η εικόνα της πηκτής έπειτα από χρώση με νιτρικό άργυρο:



Εικόνα 16. Χρώση με νιτρικό άργυρο των πρωτεϊνών των συμπλόκων ανοσοκατακρήμνισης του επαναληπτικού πειράματος μετά την ηλεκτροφόρησή τους.

Στο δεύτερο πείραμα, κατά τη διαδικασία χρώσης της πηκτής με νιτρικό άργυρο, στο στάδιο της εμφάνισης, οι ζώνες στη διαδρομή IP GFP N2a mtGFP εμφανίστηκαν στα 2,5 λεπτά, ενώ στα 4 λεπτά το σύνολο των μπαντών είχε εμφανιστεί σε κάθε διαδρομή της πηκτής. Να τονιστεί ακόμη ότι σε αυτή την επανάληψη εμφανίστηκαν περισσότερες ζώνες στην πηκτική κι όχι μόνο οι ζώνες που αντιστοιχούν στις βαριές κι ελαφριές αλυσίδες των αντισωμάτων, όπως συνέβη με την πρώτη πηκτική.

Επίσης, σημαντικό ήταν να γνωρίζουμε την ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης που περιεχόταν στο μιτοχονδριακό εκχύλισμα του κάθε πειράματος, κάτι που ελέγχθηκε με τη μέθοδο Bradford.

1^ο πείραμα

Αποτέλεσμα φωτομέτρησης στα 595 nm: 0,067

Με τη χρήση της εξίσωσης $y = 0,0345x + 0,010$ μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε εξεταζόμενο δείγμα (σε mg/ml). Επομένως, είναι $y = 0,0345x + 0,010$ αντικατάσταση y με 0,067 $\rightarrow 0,067 = 0,0345x + 0,010$
 $\leftrightarrow 0,067 - 0,010 = 0,0345x \leftrightarrow 0,057 = 0,0345x \rightarrow x = 1,65 \text{ mg/ml}$

Εμείς είχαμε 720 μl , άρα $1,65 \text{ mg/ml} \times 0,72 \text{ ml} = 1,188 \text{ mg}$ πρωτεΐνης που διαμοιράστηκαν σε δύο eppendorfs, άρα κάθε IP είχε 0,594 mg πρωτεΐνης. Εμείς επιθυμούμε 0,800 mg πρωτεΐνης ανά IP.

2^ο πείραμα

Αποτέλεσμα φωτομέτρησης στα 595 nm:

mtGFP $\rightarrow 0,052$

mtGFPERβ → 0,071

Άρα, για τα mtGFP είναι: $y = 0,0345x + 0,010$ αντικατάσταση y με 0,052
→ $0,052 = 0,0345x + 0,010$ ↔ $0,052 - 0,010 = 0,0345x$ ↔ $0,042 = 0,0345x$ → x
= 1,22 mg/ml

Εμείς είχαμε 440 μl, άρα $1,22 \text{ mg/ml} \times 0,44 \text{ ml} = 0,54 \text{ mg}$ πρωτεΐνης.
Εμείς επιθυμούμε 0,800 mg πρωτεΐνης ανά IP.

Ενώ για τα mtGFPERβ είναι: $y = 0,0345x + 0,010$ αντικατάσταση y με
0,071 → $0,071 = 0,0345x + 0,010$ ↔ $0,071 - 0,010 = 0,0345x$ ↔ $0,061 = 0,0345x$
→ $x = 1,76 \text{ mg/ml}$

Εμείς είχαμε 500 μl, άρα $1,76 \text{ mg/ml} \times 0,5 \text{ ml} = 0,88 \text{ mg}$ πρωτεΐνης που
διαμοιράστηκαν σε δύο erpendorfs, άρα κάθε IP είχε 0,44 mg πρωτεΐνης . Εμείς
επιθυμούμε 0,800 mg πρωτεΐνης ανά IP.

Παρακάτω, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πρώτου και δεύτερου
πειράματος. Πιο ειδικά, για το πρώτο πείραμα, παρουσιάζονται μόνο τα μόρια
που συναντώνται στο δείγμα IP GFP, έπειτα από αφαίρεση των κοινών μορίων
με το control (IP IgG). Για το δεύτερο πείραμα, παρουσιάζονται μόρια που
συναντώνται μόνο στα δείγματα IP GFP και IP MCA για τα κύτταρα N2a
mtGFPERβ, έπειτα από αφαίρεση των μορίων που ήταν κοινά με αυτά του
δείγματος IP GFP N2a mtGFP που είναι το control. Έτσι, μειώνουμε την
πιθανότητα τα εναπομείναντα μόρια να αποτελούν μη ειδικές συνδέσεις. Να
σημειωθεί ακόμη, ότι στο πρώτο πείραμα, ο αριθμός των κατακρημνισμένων
μορίων ήταν εξαιρετικά μεγάλος.

Τα αποτελέσματα αποστέλλονται ως κωδικοί για κάθε μια
κατακρημνισμένη πρωτεΐνη, έπειτα από τη MS. Με αναζήτηση των κωδικών στη
βάση δεδομένων για πρωτεΐνες, τη Uniprot, μπορούμε να βρούμε την ονομασία
της πρωτεΐνης που αντιστοιχεί σε κάθε κωδικό.

- Πίνακας 1: Μόρια που ανιχνεύθηκαν στο σύμπλοκο ανοσοκατακρήμισης του
δείγματος IP GFP της 1ης ανοσοκατακρήμισης έπειτα από αφαίρεση των
μορίων που ήταν κοινά με το control

Protein Igkv4-81 Mus musculus (Mouse)
Protein Igkv4-80 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igkv4-63 Mus musculus (Mouse)
Protein Igkv4-58 Mus musculus (Mouse)
Protein Igkv4-57-1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igkv5-39 Mus musculus (Mouse)
Protein Igkv12-38 Mus musculus (Mouse)
Protein Igkv6-29 Mus musculus (Mouse)
Protein Igkv8-28 Mus musculus (Mouse)
Protein Igkv8-27 Mus musculus (Mouse)
Protein Igkv6-13 Mus musculus (Mouse)
Protein Igkv3-1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv5-6 (Fragment) Mus musculus (Mouse)

Protein Ighv5-9 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv2-5 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv5-12 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv5-9-1 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv5-16 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv5-17 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv7-3 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv7-2 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv4-1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv14-2 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv14-3 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv7-1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv14-4 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv3-3 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv7-4 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv3-1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv9-4 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv3-8 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv6-3 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv6-6 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-4 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-5 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv10-3 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-12 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-22 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-34 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-37 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-39 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-42 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-43 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-47 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-49 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-53 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-54 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-55 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-56 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-58 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-63 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-64 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv8-11 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-66 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-67 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-69 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-74 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-80 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-81 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-85 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Iglv1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk13-85 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-78 Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk4-53 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-62-2 (Protein Ighv1-71) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-62-1 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv8-4 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv2-3 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv2-9-1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igha (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv2-6 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk19-93 Mus musculus (Mouse)
Protein Gm28062 (Fragment) Mus musculus (Mouse)

Protein Ighv13-2 Mus musculus (Mouse)
Zinc finger CCHC domain-containing protein 2 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
SURF1-like protein (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Vimentin Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv5-12-4 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
V-type proton ATPase subunit H Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv6-7 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Ragulator complex protein LAMTOR1 Mus musculus (Mouse)
MCG114298 (Protein Ighv1-15) (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv3-4 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-18 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv8-8 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Neural cell adhesion molecule 1 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv8-5 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk4-57 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk1-135 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk1-133 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk1-110 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk16-104 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk4-68 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk4-55 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk4-50 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk5-45 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk5-43 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv9-2 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv9-3 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv10-1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-82 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-77 Mus musculus (Mouse)
Protein Ighv1-76 Mus musculus (Mouse)
MCG116913 (Protein Ighv8-12) (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Glucosylceramidase (EC 3.2.1.45) Mus musculus (Mouse)
Protein Igvk8-34 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Rho-related GTP-binding protein RhoC (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Vesicle-trafficking protein SEC22b Mus musculus (Mouse)
Acyl-CoA dehydrogenase family member 9, mitochondrial Mus musculus (Mouse) (Fragment)
Protein Igvk8-19 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like protein 1 Mus musculus (Mouse)
Nuclear receptor coactivator 3 Mus musculus (Mouse)
Meiosis-specific coiled-coil domain-containing protein MEIOC (Meiosis-specific with coiled-coil domain protein) Mus musculus (Mouse)
Integrin alpha-V Mus musculus (Mouse)
Syntenin-1 Mus musculus (Mouse)
Rho GTPase activating protein 6, isoform CRA_c (Rho GTPase-activating protein 6) Mus musculus (Mouse)
Galactose-1-phosphate uridylyltransferase (EC 2.7.7.12) Mus musculus (Mouse)
Formin-like protein 2 (Protein Man) Mus musculus (Mouse)
Nuclear receptor coactivator 6 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Thioredoxin-related transmembrane protein 4 Mus musculus (Mouse)
Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1 Mus musculus (Mouse)
Calcineurin B homologous protein 1 Mus musculus (Mouse)
Annexin (Fragment) Mus musculus (Mouse)
MICOS complex subunit Mus musculus (Mouse)
Peroxiredoxin-1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
DIP2 disco-interacting protein 2 homolog B (Drosophila) (Disco-interacting protein 2 homolog B) Mus musculus (Mouse)
Ptprz1 protein (Receptor-type tyrosine-protein phosphatase zeta) Mus musculus (Mouse)
Maltase-glucoamylase (EC 3.2.1.20) (Protein Mgam) Mus musculus (Mouse)
Decaprenyl-diphosphate synthase subunit 1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein A530099J19Rik (RIKEN cDNA A530099J19) (Uncharacterized protein) Mus musculus (Mouse)
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10 (Fragment) Mus musculus (Mouse)

NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-13 Mus musculus (Mouse)
Heme oxygenase 2 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 Mus musculus (Mouse)
MCG4624, isoform CRA_c (Protein Jakmip2) Mus musculus (Mouse)
Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme, mitochondrial Mus musculus (Mouse)
40S ribosomal protein S5 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Importin subunit alpha-8 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Elongation of very long chain fatty acids protein (EC 2.3.1.199) (Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA synthase) (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Stathmin (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 B Mus musculus (Mouse)
Scavenger receptor class B member 1 (Scavenger receptor class B, member 1, isoform CRA_a) Mus musculus (Mouse)
Immunoglobulin superfamily member 8 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
NADH dehydrogenase (Ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5, isoform CRA_e (NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial) Mus musculus (Mouse)
SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2 Mus musculus (Mouse)
L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) Mus musculus (Mouse)
Synaptotagmin-1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Sphingosine-1-phosphate lyase 1 Mus musculus (Mouse)
Ubiquinone biosynthesis protein COQ4 homolog, mitochondrial Mus musculus (Mouse)
Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial Mus musculus (Mouse)
Surfeit locus protein 4 Mus musculus (Mouse)
Testis- and ovary-specific PAZ domain-containing protein 1 Mus musculus (Mouse)
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3 Mus musculus (Mouse)
Protein TBRG4 Mus musculus (Mouse)
Protein LYRIC Mus musculus (Mouse)
Cullin-5 Mus musculus (Mouse)
Protein Ahnak2 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Rasa1 Mus musculus (Mouse)
Atlastin-3 Mus musculus (Mouse)
Transformation/transcription domain-associated protein Mus musculus (Mouse)
Desmoplakin Mus musculus (Mouse)
Protein Gm20425 Mus musculus (Mouse)
Protein Gm10073 Mus musculus (Mouse)
GPI-anchor transamidase Mus musculus (Mouse)
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9 Mus musculus (Mouse)
MICOS complex subunit MIC60 (Mitofilin) Mus musculus (Mouse)
Protein Golgb1 Mus musculus (Mouse)
Ankyrin repeat and BTB/POZ domain-containing protein BTBD11 Mus musculus (Mouse)
ADP-ribosylation factor-like protein 8A (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase ALG2 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Ubiquinone biosynthesis protein COQ9, mitochondrial (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Signal recognition particle receptor subunit alpha (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Tricarboxylate transport protein, mitochondrial (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Cathepsin D (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Lipase maturation factor (Fragment) Mus musculus (Mouse)
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial Mus musculus (Mouse)
ATP synthase subunit f, mitochondrial Mus musculus (Mouse)
Rho GTPase-activating protein 21 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Pre-B-cell leukemia transcription factor 2 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Metaxin-1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Proteasome activator complex subunit 1 Mus musculus (Mouse)
Synaptotagmin-like protein 4 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-11B Mus musculus (Mouse)
Tapasin (Fragment) Mus musculus (Mouse)
MCG55033 (Protein Gm10250) Mus musculus (Mouse)
MCG22048, isoform CRA_a (Proteasome activator complex subunit 2) Mus musculus (Mouse)

Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1 (PMCA1) (EC 3.6.3.8) (Plasma membrane calcium ATPase isoform 1) (Plasma membrane calcium pump isoform 1) Mus musculus (Mouse)
Pyruvate carboxylase (EC 6.4.1.1) Mus musculus (Mouse)
Hydroperoxide isomerase ALOXE3 Mus musculus (Mouse)
AP-2 complex subunit beta Mus musculus (Mouse)
Alkyldihydroxyacetonephosphate synthase, peroxisomal Mus musculus (Mouse)
Protein Dnah11 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
CAAX prenyl protease 1 homolog (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Melanoma inhibitory activity protein 3 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Protein Igkv4-62 Mus musculus (Mouse)
Basigin (Basigin, isoform CRA_d) Mus musculus (Mouse)
Protein Fam71e2 Mus musculus (Mouse)
ER membrane protein complex subunit 8 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.8.1.4) (Dihydrolipoamide dehydrogenase) Mus musculus (Mouse)
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP8 (PPIase FKBP8) (EC 5.2.1.8) (38 kDa FK506-binding protein) (38 kDa FKBP) (FKBP-38) (mFKBP38) (FK506-binding protein 8) (FKBP-8) (FKBPR38) (Rotamase) Mus musculus (Mouse)
Niemann-Pick C1 protein Mus musculus (Mouse)
Membrane-associated progesterone receptor component 1 Mus musculus (Mouse)
Synaptogyrin-1 Mus musculus (Mouse)
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) (SR Ca(2+)-ATPase 2) (EC 3.6.3.8) (Calcium pump 2) (Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic reticulum type, slow twitch skeletal muscle isoform) (Endoplasmic reticulum class 1/2 Ca(2+) ATPase) Mus musculus (Mouse)
Integrin beta-5 Mus musculus (Mouse)
Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase (EC 1.1.1.330) (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 12) (17-beta-HSD 12) (3-ketoacyl-CoA reductase) (KAR) (Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12) (EC 1.1.1.62) (KIK-I) Mus musculus (Mouse)
Peroxisomal membrane protein PMP34 (34 kDa peroxisomal membrane protein) (Solute carrier family 25 member 17) Mus musculus (Mouse)
Metaxin-2 (Mitochondrial outer membrane import complex protein 2) Mus musculus (Mouse)
7-dehydrocholesterol reductase (7-DHC reductase) (EC 1.3.1.21) (Sterol Delta(7)-reductase) Mus musculus (Mouse)
3-keto-steroid reductase (EC 1.1.1.270) (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 7) (17-beta-HSD 7) (Estradiol 17-beta-dehydrogenase 7) (EC 1.1.1.62) Mus musculus (Mouse)
Tripeptidyl-peptidase 1 (TPP-1) (EC 3.4.14.9) (Lysosomal pepstatin-insensitive protease) (LPIC) (Tripeptidyl aminopeptidase) (Tripeptidyl-peptidase I) (TPP-I) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome b (Complex III subunit 3) (Complex III subunit III) (Cytochrome b-c1 complex subunit 3) (Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex cytochrome b subunit) Mus musculus (Mouse)
Complement C4-B [Cleaved into: Complement C4 beta chain; Complement C4 alpha chain; C4a anaphylatoxin; Complement C4 gamma chain] Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-II region MOPC 511 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-II region 2S1.3 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-II region 7S34.1 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-II region 26-10 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-V region K2 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-V region MOPC 149 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-V region L6 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-V region MOPC 41 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-V region L7 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-V region HP R16.7 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-V region HP 124E1 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-V region HP 91A3 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-V region J606 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-III region PC 2880/PC 1229 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-III region PC 2413 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-III region PC 3741/TEPC 111 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-III region ABPC 22/PC 9245 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-III region PC 7043 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-III region PC 6684 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-VI region XRPC 44 Mus musculus (Mouse)
Ig heavy chain V region (Anti-arsenate antibody) Mus musculus (Mouse)
Ig heavy chain V region MPC 11 Mus musculus (Mouse)
Ig heavy chain V region 36-65 Mus musculus (Mouse)
Ig heavy chain V region 3 Mus musculus (Mouse)

Ig heavy chain V region MOPC 104E Mus musculus (Mouse)
Ig heavy chain V region M511 Mus musculus (Mouse)
Ig heavy chain V-III region E109 Mus musculus (Mouse)
Ig heavy chain V region AMPC1 Mus musculus (Mouse)
Ig heavy chain V region 441 Mus musculus (Mouse)
Ig heavy chain V region J539 Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain C region Mus musculus (Mouse)
Ig lambda-1 chain C region Mus musculus (Mouse)v
Ig lambda-2 chain C region Mus musculus (Mouse)
Ig gamma-2B chain C region Mus musculus (Mouse)
Ig alpha chain C region Mus musculus (Mouse)
H-2 class I histocompatibility antigen, D-D alpha chain (H-2D(D)) Mus musculus (Mouse)
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 (EC 1.6.5.3) (NADH dehydrogenase subunit 1) Mus musculus (Mouse)
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 (EC 1.6.5.3) (NADH dehydrogenase subunit 5) Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-II region 17S29.1 Mus musculus (Mouse)
Ig gamma-3 chain C region Mus musculus (Mouse)
Ig kappa chain V-VI region NQ2-17.4.1 Mus musculus (Mouse)
Aspartate aminotransferase, mitochondrial (mAspAT) (EC 2.6.1.1) (EC 2.6.1.7) (Fatty acid-binding protein) (FABP-1) (Glutamate oxaloacetate transaminase 2) (Kynurenine aminotransferase 4) (Kynurenine aminotransferase IV) (Kynurenine--oxoglutarate transaminase 4) (Kynurenine--oxoglutarate transaminase IV) (Plasma membrane-associated fatty acid-binding protein) (FABPpm) (Transaminase A) Mus musculus (Mouse)
Tubulin alpha-1B chain (Alpha-tubulin 2) (Alpha-tubulin isotype M-alpha-2) (Tubulin alpha-2 chain) Mus musculus (Mouse)
Ig heavy chain V region AC38 205.12 Mus musculus (Mouse)
Keratin, type I cytoskeletal 13 (47 kDa cytokeratin) (Cytokeratin-13) (CK-13) (Keratin-13) (K13) Mus musculus (Mouse)
MLV-related proviral Env polyprotein [Cleaved into: Surface protein (SU); Transmembrane protein (TM)] Mus musculus (Mouse)
Cathepsin B (EC 3.4.22.1) (Cathepsin B1) [Cleaved into: Cathepsin B light chain; Cathepsin B heavy chain] Mus musculus (Mouse)
T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha) (CCT-alpha) (Tailless complex polypeptide 1A) (TCP-1-A) (Tailless complex polypeptide 1B) (TCP-1-B) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide Va) Mus musculus (Mouse)
Complement C1q subcomponent subunit B Mus musculus (Mouse)
Microtubule-associated protein 1B (MAP-1B) (MAP1(X)) (MAP1.2) [Cleaved into: MAP1B heavy chain; MAP1 light chain LC1] Mus musculus (Mouse)
Alpha-enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (Enolase 1) (Non-neural enolase) (NNE) Mus musculus (Mouse)
Ig heavy chain V region 914 Mus musculus (Mouse)
Ig heavy chain V region 6.96 Mus musculus (Mouse)
Ig heavy chain V region 3-6 (Ig heavy chain V region M315) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide IV) (Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1) (COX IV-1) Mus musculus (Mouse)
Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor (CD Man-6-P receptor) (CD-MPR) (46 kDa mannose 6-phosphate receptor) (MPR 46) Mus musculus (Mouse)
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) Mus musculus (Mouse)
Alpha-mannosidase 2 (EC 3.2.1.114) (Golgi alpha-mannosidase II) (AMan II) (Man II) (Mannosidase alpha class 2A member 1) (Mannosyl-oligosaccharide 1,3-1,6-alpha-mannosidase) Mus musculus (Mouse)
Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13 (G alpha-13) (G-protein subunit alpha-13) Mus musculus (Mouse)
Protein disulfide-isomerase A3 (EC 5.3.4.1) (58 kDa glucose-regulated protein) (58 kDa microsomal protein) (p58) (Disulfide isomerase ER-60) (Endoplasmic reticulum resident protein 57) (ER protein 57) (ERp57) (Endoplasmic reticulum resident protein 60) (ER protein 60) (ERp60) Mus musculus (Mouse)
Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-14 (G alpha-14) (G-protein subunit alpha-14) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-3D Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-21 (Rab-12) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-18 Mus musculus (Mouse)
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial (EC 1.2.4.1) (PDHE1-A type I) Mus musculus (Mouse)
CD81 antigen (26 kDa cell surface protein TAPA-1) (Target of the antiproliferative antibody 1) (CD antigen CD81) Mus musculus (Mouse)
Neuronal membrane glycoprotein M6-b (M6b) Mus musculus (Mouse)
Low-density lipoprotein receptor (LDL receptor) Mus musculus (Mouse)
CD9 antigen (CD antigen CD9) Mus musculus (Mouse)
T-complex protein 1 subunit theta (TCP-1-theta) (CCT-theta) Mus musculus (Mouse)
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A (Oligosaccharyl transferase subunit STT3A) (STT3-A) (EC 2.4.99.18) (B5) (Integral membrane protein 1) Mus musculus (Mouse)

Fatty aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3) (Aldehyde dehydrogenase 3) (Aldehyde dehydrogenase family 3 member A2) Mus musculus (Mouse)
Calcium signal-modulating cyclophilin ligand (CAML) Mus musculus (Mouse)
V-type proton ATPase subunit E 1 (V-ATPase subunit E 1) (V-ATPase 31 kDa subunit) (p31) (Vacuolar proton pump subunit E 1) Mus musculus (Mouse)
Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial (EC 2.3.1.168) (Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex component E2) (BCKAD-E2) (BCKADE2) (Dihydrolipoamide acetyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex) (Dihydrolipoamide branched chain transacylase) (Dihydrolipoyllysine-residue (2-methylpropanoyl)transferase) Mus musculus (Mouse)
Squalene synthase (SQS) (SS) (EC 2.5.1.21) (FPP:FPP farnesyltransferase) (Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-2A Mus musculus (Mouse)
Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial (IDH) (EC 1.1.1.42) (ICD-M) (IDP) (NADP(+)-specific ICDH) (Oxalosuccinate decarboxylase) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-8A (Oncogene c-mel) Mus musculus (Mouse)
Bcl-2-like protein 13 (Bcl2-L-13) (Bcl-rambo) (Protein Mil1) Mus musculus (Mouse)
Cell division control protein 42 homolog (G25K GTP-binding protein) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-5B Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-8B Mus musculus (Mouse)
ADP-ribosylation factor 3 Mus musculus (Mouse)
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit DAD1 (Oligosaccharyl transferase subunit DAD1) (EC 2.4.99.18) (Defender against cell death 1) (DAD-1) Mus musculus (Mouse)
Protein yippee-like 5 Mus musculus (Mouse)
Histone H4 Mus musculus (Mouse)
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 (Transducin beta chain 1) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-3A Mus musculus (Mouse)
Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8) Mus musculus (Mouse)
Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) (Cellubrevin) (CEB) (Synaptobrevin-3) Mus musculus (Mouse)
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2 (G gamma-1) Mus musculus (Mouse)
Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin) Mus musculus (Mouse)
Tubulin beta-4B chain (Tubulin beta-2C chain) Mus musculus (Mouse)
Importin subunit beta-1 (Karyopherin subunit beta-1) (Nuclear factor p97) (Pore targeting complex 97 kDa subunit) (PTAC97) (SCG) Mus musculus (Mouse)
Vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP-7) (Synaptobrevin-like protein 1) Mus musculus (Mouse)
Cationic amino acid transporter 3 (CAT-3) (CAT3) (Cationic amino acid transporter γ) (Solute carrier family 7 member 3) Mus musculus (Mouse)
Tyrosine-protein kinase Fer (EC 2.7.10.2) (Proto-oncogene c-Fer) (p94-Fer) Mus musculus (Mouse)
T-complex protein 1 subunit eta (TCP-1-eta) (CCT-eta) [Cleaved into: T-complex protein 1 subunit eta, N-terminally processed] Mus musculus (Mouse)
T-complex protein 1 subunit beta (TCP-1-beta) (CCT-beta) Mus musculus (Mouse)
T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon) (CCT-epsilon) Mus musculus (Mouse)
T-complex protein 1 subunit zeta (TCP-1-zeta) (CCT-zeta-1) Mus musculus (Mouse)
T-complex protein 1 subunit gamma (TCP-1-gamma) (CCT-gamma) (Matricin) (mTRiC-P5) Mus musculus (Mouse)
Dihydropyrimidinase-related protein 1 (DRP-1) (Collapsin response mediator protein 1) (CRMP-1) (Unc-33-like phosphoprotein 3) (ULIP-3) Mus musculus (Mouse)
Complement C1q subcomponent subunit A Mus musculus (Mouse)
Transcription factor 7 (TCF-7) (T-cell-specific transcription factor 1) (T-cell factor 1) (TCF-1) Mus musculus (Mouse)
Complement C1q subcomponent subunit C Mus musculus (Mouse)
DNA-binding protein Ikaros (Ikaros family zinc finger protein 1) (Lymphoid transcription factor LyF-1) Mus musculus (Mouse)
ATP synthase subunit e, mitochondrial (ATPase subunit e) Mus musculus (Mouse)
Mesoderm-specific transcript protein (EC 3.-.-.-) (Paternally-expressed gene 1 protein) Mus musculus (Mouse)
Apoptosis regulator BAX Mus musculus (Mouse)
Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha (EC 2.7.1.67) (Phosphatidylinositol 4-kinase type II-alpha) Mus musculus (Mouse)
Paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha (Cell surface receptor FDF03) (Inhibitory receptor PILR-alpha) Mus musculus (Mouse)
FAS-associated factor 2 (UBX domain-containing protein 8) Mus musculus (Mouse)
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 Mus musculus (Mouse)
Keratin, type I cytoskeletal 26 (Cytokeratin-26) (CK-26) (Keratin-26) (K26) (Type I inner root sheath-specific keratin-K25irs2) Mus musculus (Mouse)
Secretory carrier-associated membrane protein 1 Mus musculus (Mouse)
Protein 1700010I14Rik (RIKEN cDNA 1700010I14, isoform CRA_b) Mus musculus (Mouse)

26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 (26S proteasome regulatory subunit RPN2) (26S proteasome regulatory subunit S1) Mus musculus (Mouse)
Sorting nexin-8 Mus musculus (Mouse)
Probable arginine--tRNA ligase, mitochondrial (EC 6.1.1.19) (Arginyl-tRNA synthetase) (ArgRS) Mus musculus (Mouse)
Extended synaptotagmin-1 (E-Syt1) (Membrane-bound C2 domain-containing protein) Mus musculus (Mouse)
Regulator of microtubule dynamics protein 3 (RMD-3) (mRMD-3) (Protein FAM82A2) (Protein FAM82C) Mus musculus (Mouse)
Methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial (MCCase subunit beta) (EC 6.4.1.4) (3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 2) (3-methylcrotonyl-CoA carboxylase non-biotin-containing subunit) (3-methylcrotonyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit beta) Mus musculus (Mouse)
DNA helicase (EC 3.6.4.12) Mus musculus (Mouse)
Coiled-coil domain-containing protein 51 Mus musculus (Mouse)
Ankyrin repeat domain-containing protein 34B (Dendritic protein of 58 kDa) Mus musculus (Mouse)
Endoplasmic reticulum metalloproteinase 1 (EC 3.4.-.-) (Felix-ina) Mus musculus (Mouse)
40S ribosomal protein S10 Mus musculus (Mouse)
Lysine-specific demethylase 7A (EC 1.14.11.-) (JmjC domain-containing histone demethylation protein 1D) (Lysine-specific demethylase 7) Mus musculus (Mouse)
Delta(14)-sterol reductase Mus musculus (Mouse)
Integrin alpha-1 (CD49 antigen-like family member A) (Laminin and collagen receptor) (VLA-1) (CD antigen CD49a) Mus musculus (Mouse)
Mimitin, mitochondrial (Myc-induced mitochondrial protein) (MMTN) (NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 2) (NDUFA12-like protein) Mus musculus (Mouse)
Transmembrane protein 2 Mus musculus (Mouse)
Transcription termination factor 2 (EC 3.6.4.-) (RNA polymerase II termination factor) (Transcription release factor 2) Mus musculus (Mouse)
Clustered mitochondria protein homolog Mus musculus (Mouse)
Acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) (EC 6.4.1.2) (ACC-alpha) (Acetyl-CoA carboxylase 265) [Includes: Biotin carboxylase (EC 6.3.4.14)] Mus musculus (Mouse)
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2 (4-PH alpha-2) (EC 1.14.11.2) (Procollagen-proline,2-oxoglutarate-4-dioxygenase subunit alpha-2) Mus musculus (Mouse)
Stress-induced-phosphoprotein 1 (STI1) (mSTI1) (Hsc70/Hsp90-organizing protein) (Hop) Mus musculus (Mouse)
Lysosomal-associated transmembrane protein 4A (Golgi 4-transmembrane-spanning transporter) (Mouse transporter protein) (MTP) Mus musculus (Mouse)
ATP-binding cassette sub-family B member 7, mitochondrial (ATP-binding cassette transporter 7) (ABC transporter 7 protein) Mus musculus (Mouse)
B-cell receptor-associated protein 29 (BCR-associated protein 29) (Bap29) Mus musculus (Mouse)
B-cell receptor-associated protein 31 (BCR-associated protein 31) (Bap31) (p28) Mus musculus (Mouse)
Integrin alpha-6 (CD49 antigen-like family member F) (VLA-6) (CD antigen CD49f) [Cleaved into: Integrin alpha-6 heavy chain; Integrin alpha-6 light chain] Mus musculus (Mouse)
Keratin, type I cytoskeletal 14 (Cytokeratin-14) (CK-14) (Keratin-14) (K14) Mus musculus (Mouse)
Pregnancy zone protein (Alpha-2-macroglobulin) (Alpha-2-M) [Cleaved into: Alpha-2-macroglobulin 165 kDa subunit; Alpha-2-macroglobulin 35 kDa subunit] Mus musculus (Mouse)
Transcription elongation factor SPT6 Mus musculus (Mouse)
Vomer nasal secretory protein 2 (Lipocalin-4) (Vomer nasal secretory protein II) (VNSP II) Mus musculus (Mouse)
Keratin, type I cytoskeletal 12 (Cytokeratin-12) (CK-12) (Keratin-12) (K12) Mus musculus (Mouse)
Sequestosome-1 (STONE14) (Ubiquitin-binding protein p62) Mus musculus (Mouse)
Phosphatidylglycerophosphatase and protein-tyrosine phosphatase 1 (EC 3.1.3.27) (PTEN-like phosphatase) (Phosphoinositide lipid phosphatase) (Protein-tyrosine phosphatase mitochondrial 1) (EC 3.1.3.16) (EC 3.1.3.48) Mus musculus (Mouse)
Clathrin heavy chain 1 Mus musculus (Mouse)
Synaptic vesicle glycoprotein 2C (Synaptic vesicle protein 2C) Mus musculus (Mouse)
Nodal modulator 1 Mus musculus (Mouse)
Uncharacterized protein C16orf59 homolog Mus musculus (Mouse)
3-ketodihydrospingosine reductase (KDS reductase) (EC 1.1.1.102) (3-dehydrospinganine reductase) (Follicular variant translocation protein 1 homolog) (FVT-1) Mus musculus (Mouse)
Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1 Mus musculus (Mouse)
GPI transamidase component PIG-S (Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class S protein) Mus musculus (Mouse)
WASH complex subunit FAM21 Mus musculus (Mouse)
FH1/FH2 domain-containing protein 3 (Formin homolog overexpressed in spleen 2) (mFHOS2) Mus musculus (Mouse)
Oligosaccharyltransferase complex subunit OSTC Mus musculus (Mouse)
MCG140784 (Protein Try10) (Trypsin 10) (Trypsinogen 10) Mus musculus (Mouse)
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12 (Complex I-B17.2) (CI-B17.2) (CIB17.2) (NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B17.2) Mus musculus (Mouse)

Nuclear pore complex protein Nup214 (214 kDa nucleoporin) (Nucleoporin Nup214) Mus musculus (Mouse)
Aldehyde dehydrogenase family 3 member B1 (EC 1.2.1.5) (Aldehyde dehydrogenase 7) Mus musculus (Mouse)
Death-associated protein kinase 1 (DAP kinase 1) (EC 2.7.11.1) Mus musculus (Mouse)
Claspin Mus musculus (Mouse)
Coiled-coil domain-containing protein 181 Mus musculus (Mouse)
Elongation factor Tu, mitochondrial Mus musculus (Mouse)
Neuronal PAS domain-containing protein 4 (Neuronal PAS4) (HLH-PAS transcription factor NXF) (Limbic-enhanced PAS protein) (LE-PAS) Mus musculus (Mouse)
Sorting and assembly machinery component 50 homolog Mus musculus (Mouse)
Keratin, type II cytoskeletal 75 (Cytokeratin-75) (CK-75) (Keratin-6 hair follicle) (mK6hf) (Keratin-75) (K75) (Type II keratin-K6hf) (Type-II keratin Kb18) Mus musculus (Mouse)
Transmembrane 9 superfamily member 4 Mus musculus (Mouse)
Reticulon Mus musculus (Mouse)
Vesicle-associated membrane protein, associated protein B and C (Vesicle-associated membrane protein-associated protein B) Mus musculus (Mouse)
Dephospho-CoA kinase domain-containing protein Mus musculus (Mouse)
Proline-rich protein 11 Mus musculus (Mouse)
Uncharacterized protein C2orf47 homolog, mitochondrial Mus musculus (Mouse)
Neutral alpha-glucosidase AB (EC 3.2.1.84) (Alpha-glucosidase 2) (Glucosidase II subunit alpha) Mus musculus (Mouse)
Catechol O-methyltransferase domain-containing protein 1 (EC 2.1.1.-) Mus musculus (Mouse)
Protein F830045P16Rik (RIKEN cDNA F830045P16) Mus musculus (Mouse)
Early endosome antigen 1 Mus musculus (Mouse)
Neutral cholesterol ester hydrolase 1 (NCEH) (EC 3.1.1.-) (Arylacetamide deacetylase-like 1) (Chlorpyrifos oxon-binding protein) (CPO-BP) Mus musculus (Mouse)
Cytoskeleton-associated protein 4 (63-kDa cytoskeleton-linking membrane protein) (Climp-63) (p63) Mus musculus (Mouse)
TRPM8 channel-associated factor 1 (TRP channel-associated factor 1) Mus musculus (Mouse)
Transmembrane emp24 domain-containing protein 2 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Inactive hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 1 Mus musculus (Mouse)
Prostaglandin E synthase 2 (EC 5.3.99.3) (GATE-binding factor 1) (GBF-1) (Microsomal prostaglandin E synthase 2) (mPGES-2) [Cleaved into: Prostaglandin E synthase 2 truncated form] Mus musculus (Mouse)
Protein disulfide-isomerase TMX3 (EC 5.3.4.1) (Thioredoxin domain-containing protein 10) (Thioredoxin-related transmembrane protein 3) Mus musculus (Mouse)
Serine protease inhibitor A3B (Serpin A3B) Mus musculus (Mouse)
Rap guanine nucleotide exchange factor 5 (Guanine nucleotide exchange factor for Rap1) (M-Ras-regulated Rap GEF) (MR-GEF) Mus musculus (Mouse)
Prenylcysteine oxidase-like (EC 1.8.3.-) Mus musculus (Mouse)
ER membrane protein complex subunit 1 Mus musculus (Mouse)
Protein ELFN1 (Extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 1) (Protein phosphatase 1 regulatory subunit 28) Mus musculus (Mouse)
MCG53738 (Protein Teddm1b) Mus musculus (Mouse)
Centrosomal protein of 57 kDa (Cep57) (Testis-specific protein 57) (Translokine) Mus musculus (Mouse)
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (Amino acid transporter A2) (Solute carrier family 38 member 2) (System A amino acid transporter 2) (System A transporter 1) (System N amino acid transporter 2) Mus musculus (Mouse)
Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase (Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase) [Includes: Glutamate--tRNA ligase (EC 6.1.1.17) (Glutamyl-tRNA synthetase) (GluRS); Proline--tRNA ligase (EC 6.1.1.15) (Prolyl-tRNA synthetase) (ProRS)] Mus musculus (Mouse)
Lon protease homolog, mitochondrial (EC 3.4.21.-) (Lon protease-like protein) (LONP) (Mitochondrial ATP-dependent protease Lon) (Serine protease 15) Mus musculus (Mouse)
Zinc finger MIZ domain-containing protein 2 (PIAS-like protein Zimp7) Mus musculus (Mouse)
Protein dispatched homolog 2 Mus musculus (Mouse)
Mitochondrial Rho GTPase 2 (MIRO-2) (EC 3.6.5.-) (Ras homolog gene family member T2) Mus musculus (Mouse)
Lanosterol 14-alpha demethylase (LDM) (EC 1.14.13.70) (CYPLI) (Cytochrome P450 51A1) (Cytochrome P450-14DM) (Cytochrome P45014DM) (Cytochrome P450LI) (Sterol 14-alpha demethylase) Mus musculus (Mouse)
Procollagen galactosyltransferase 1 (EC 2.4.1.50) (Collagen beta(1-O)galactosyltransferase 1) (Glycosyltransferase 25 family member 1) (Hydroxylysine galactosyltransferase 1) Mus musculus (Mouse)
Protein FAM13B Mus musculus (Mouse)
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8, mitochondrial (EC 1.6.5.3) (EC 1.6.99.3) (Complex I-23kD) (CI-23kD) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 23 kDa subunit) Mus musculus (Mouse)
Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase (EC 1.-.-) Mus musculus (Mouse)
Tripartite motif-containing protein 29 Mus musculus (Mouse)
Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial (PTH 2) (EC 3.1.1.29) Mus musculus (Mouse)

MICOS complex subunit MIC13 Mus musculus (Mouse)
PRA1 family protein 3 (ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 5) (ARL-6-interacting protein 5) (Aip-5) (Addicsin) (GTRAP3-18) (Glutamate transporter EAAC1-interacting protein) (Prenylated Rab acceptor protein 2) (Protein JWA) Mus musculus (Mouse)
Dehydrogenase/reductase SDR family member on chromosome X homolog (EC 1.1.-.-) (DHRSXY) (SCAD family protein) Mus musculus (Mouse)
Glycosaminoglycan xylosylkinase (EC 2.7.1.-) (Xylose kinase) Mus musculus (Mouse)
Ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper domain-containing protein 1 (Germ cell-specific ankyrin, SAM and basic leucine zipper domain-containing protein) Mus musculus (Mouse)
ADP-dependent glucokinase (ADP-GK) (ADPGK) (EC 2.7.1.147) Mus musculus (Mouse)
Translocation protein SEC63 homolog Mus musculus (Mouse)
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial (EC 1.1.1.41) Mus musculus (Mouse)
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1 (MitoNEET) Mus musculus (Mouse)
5'-nucleotidase domain containing 2 (Protein Nt5dc2) Mus musculus (Mouse)
Methyltransferase-like protein 13 (EC 2.1.1.-) Mus musculus (Mouse)
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 Mus musculus (Mouse)
Relaxin receptor 2 (G-protein coupled receptor 106) (G-protein coupled receptor affecting testicular descent) (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 8) (Relaxin family peptide receptor 2) Mus musculus (Mouse)
AFG3-like protein 1 (EC 3.4.24.-) Mus musculus (Mouse)
Tubulin beta-6 chain Mus musculus (Mouse)
Fatty acyl-CoA reductase 1 (EC 1.2.1.n2) (Male sterility domain-containing protein 2) Mus musculus (Mouse)
Pyroline-5-carboxylate reductase 2 (P5C reductase 2) (P5CR 2) (EC 1.5.1.2) Mus musculus (Mouse)
Leucine-rich repeat-containing protein 59 Mus musculus (Mouse)
Protein disulfide-isomerase A6 (EC 5.3.4.1) (Thioredoxin domain-containing protein 7) Mus musculus (Mouse)
Pyroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial (P5C reductase 1) (P5CR 1) (EC 1.5.1.2) Mus musculus (Mouse)
ATPase family AAA domain-containing protein 3 (AAA-ATPase TOB3) Mus musculus (Mouse)
Stomatin-like protein 2, mitochondrial (SLP-2) (mslp2) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rap-1b (GTP-binding protein smg p21B) Mus musculus (Mouse)
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial (TP-beta) [Includes: 3-ketoacyl-CoA thiolase (EC 2.3.1.16) (Acetyl-CoA acyltransferase) (Beta-ketothiolase)] Mus musculus (Mouse)
Ufm1-specific protease 2 (UfSP2) (EC 3.4.22.-) Mus musculus (Mouse)
Transmembrane emp24 domain-containing protein 9 (Glycoprotein 25L2) (p24 family protein alpha-2) (p24alpha2) Mus musculus (Mouse)
GrpE protein homolog 1, mitochondrial (Mt-GrpE#1) Mus musculus (Mouse)
Solute carrier family 12 member 9 (Cation-chloride cotransporter-interacting protein 1) (Potassium-chloride transporter 9) Mus musculus (Mouse)
Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog (Translocase of outer membrane 22 kDa subunit homolog) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome b-c1 complex subunit 8 (Complex III subunit 8) (Complex III subunit VIII) (Ubiquinol-cytochrome c reductase complex 9.5 kDa protein) (Ubiquinol-cytochrome c reductase complex ubiquinone-binding protein QP-C) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome b-c1 complex subunit 7 Mus musculus (Mouse)
ADP-ribosylation factor-like protein 8B (ADP-ribosylation factor-like protein 10C) (Novel small G protein indispensable for equal chromosome segregation 1) Mus musculus (Mouse)
Vesicle transport protein GOT1B (Golgi transport 1 homolog B) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial (EC 1.10.2.2) (Complex III subunit 5) (Cytochrome b-c1 complex subunit 5) (Rieske iron-sulfur protein) (RISP) (Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit) [Cleaved into: Cytochrome b-c1 complex subunit 11 (Complex III subunit IX) (Ubiquinol-cytochrome c reductase 8 kDa protein)] Mus musculus (Mouse)
ER membrane protein complex subunit 2 (Tetratricopeptide repeat protein 35) (TPR repeat protein 35) Mus musculus (Mouse)
Motile sperm domain-containing protein 2 Mus musculus (Mouse)
Translocon-associated protein subunit alpha (TRAP-alpha) (Signal sequence receptor subunit alpha) (SSR-alpha) Mus musculus (Mouse)
Serine hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1) Mus musculus (Mouse)
Mitochondrial chaperone BCS1 (BCS1-like protein) Mus musculus (Mouse)
Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial (EC 1.2.1.3) (Aldehyde dehydrogenase family 1 member B1) Mus musculus (Mouse)
Citrate synthase, mitochondrial (EC 2.3.3.1) (Citrate (Si)-synthase) Mus musculus (Mouse)
Coiled-coil domain-containing protein 47 (Adipocyte-specific protein 4) Mus musculus (Mouse)
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHE1-B) (EC 1.2.4.1) Mus musculus (Mouse)
Protein ERGIC-53 (ER-Golgi intermediate compartment 53 kDa protein) (Lectin mannose-binding 1) (p58) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial (Complex III subunit 4) (Complex III subunit IV) (Cytochrome b-c1 complex subunit 4) (Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex cytochrome c1 subunit) (Cytochrome c-1) Mus musculus (Mouse)
Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 (21 kDa transmembrane-trafficking protein) (Transmembrane protein

Tmp21 (p24 family protein delta-1) (p24delta1) Mus musculus (Mouse)
Epoxide hydrolase 1 (EC 3.3.2.9) (Epoxide hydratase) (Microsomal epoxide hydrolase) Mus musculus (Mouse)
ATP synthase subunit delta, mitochondrial (F-ATPase delta subunit) Mus musculus (Mouse)
ATPase family AAA domain-containing protein 1 (EC 3.6.1.3) (Thorase) Mus musculus (Mouse)
NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial (EC 1.6.5.3) (EC 1.6.99.3) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit) Mus musculus (Mouse)
Protein FAM162A (E2-induced gene 5 protein homolog) (Growth and transformation-dependent protein) (HGTD-P) Mus musculus (Mouse)
Leukocyte receptor cluster member 1 homolog Mus musculus (Mouse)
Vesicular integral-membrane protein VIP36 (Lectin mannose-binding 2) (Vesicular integral-membrane protein 36) (VIP36) Mus musculus (Mouse)
Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha (G(i) alpha-3) Mus musculus (Mouse)
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial (Complex I-39kD) (CI-39kD) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 39 kDa subunit) Mus musculus (Mouse)
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 7, mitochondrial (EC 1.6.5.3) (EC 1.6.99.3) (Complex I-20kD) (CI-20kD) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 20 kDa subunit) Mus musculus (Mouse)
Translocon-associated protein subunit gamma (TRAP-gamma) (Signal sequence receptor subunit gamma) (SSR-gamma) Mus musculus (Mouse)
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8 (Complex I-19kD) (CI-19kD) (Complex I-PGIV) (CI-PGIV) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 19 kDa subunit) Mus musculus (Mouse)
MICOS complex subunit Mic26 (Apolipoprotein O) (MICOS complex subunit Mic23) (Protein FAM121B) Mus musculus (Mouse)
Phosphatidylinositide phosphatase SAC1 (EC 3.1.3.-) (Suppressor of actin mutations 1-like protein) Mus musculus (Mouse)
Syntaxin-12 Mus musculus (Mouse)
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13 (Cell death regulatory protein GRIM-19) (Complex I-B16.6) (CI-B16.6) (Gene associated with retinoic and interferon-induced mortality 19 protein) (GRIM-19) (Gene associated with retinoic and IFN-induced mortality 19 protein) (NADH-ubiquinone oxidoreductase B16.6 subunit) Mus musculus (Mouse)
Reticulon-3 Mus musculus (Mouse)
Acylglycerol kinase, mitochondrial (EC 2.7.1.107) (EC 2.7.1.94) (Multiple substrate lipid kinase) (MuLK) (Multi-substrate lipid kinase) Mus musculus (Mouse)
PRA1 family protein 2 Mus musculus (Mouse)
Phospholipid scramblase 1 (PL scramblase 1) (Ca ²⁺ -dependent phospholipid scramblase 1) (Transplantability-associated protein 1) (NOR1) (TRA1) Mus musculus (Mouse)
Sphingomyelin phosphodiesterase 3 (EC 3.1.4.12) (Neutral sphingomyelinase 2) (nSMase-2) (nSMase2) (Neutral sphingomyelinase II) Mus musculus (Mouse)
Hypoxia up-regulated protein 1 (GRP-170) (140 kDa Ca ²⁺ -binding protein) (CBP-140) Mus musculus (Mouse)
Beta-secretase 2 (EC 3.4.23.45) (Aspartyl protease 1) (ASP1) (Asp 1) (Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2) (Beta-site APP cleaving enzyme 2) (Memapsin-1) (Membrane-associated aspartic protease 1) (Theta-secretase) Mus musculus (Mouse)
Sacsin (DnaJ homolog subfamily C member 29) (DNAJC29) Mus musculus (Mouse)
Elongation of very long chain fatty acids protein 1 (EC 2.3.1.199) (3-keto acyl-CoA synthase Elovl1) (ELOVL fatty acid elongase 1) (ELOVL FA elongase 1) (Very long chain 3-ketoacyl-CoA synthase 1) (Very long chain 3-oxoacyl-CoA synthase 1) Mus musculus (Mouse)
Tetraspanin-3 (Tspan-3) (OSP-associated protein 1) (OAP-1) (Tetraspanin TM4-A) (Transmembrane 4 superfamily member 8) Mus musculus (Mouse)
Actin-like protein 7A (Actin-like-7-alpha) (Testis-specific actin-2) (T-actin-2) Mus musculus (Mouse)
DnaJ homolog subfamily A member 2 (mDj3) Mus musculus (Mouse)
Mitochondrial dicarboxylate carrier (Solute carrier family 25 member 10) Mus musculus (Mouse)
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B (Death receptor 5) (MK) (CD antigen CD262) Mus musculus (Mouse)
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 (EC 1.14.11.4) (Lysyl hydroxylase 3) (LH3) Mus musculus (Mouse)
Keratin, type II cytoskeletal 71 (Cytokeratin-6G) (CK-6G) (Cytokeratin-71) (CK-71) (Keratin-6G) (K6G) (Keratin-71) (K71) (Type II inner root sheath-specific keratin-K6irs1) (mK6irs) (mK6irs1/Krt2-6g) (Type-II keratin Kb34) Mus musculus (Mouse)
Netrin-3 (Netrin-2-like protein) Mus musculus (Mouse)
Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating (EC 1.1.1.170) Mus musculus (Mouse)
Proteolipid protein 2 Mus musculus (Mouse)
Retinol dehydrogenase 11 (UBE-1b) Mus musculus (Mouse)
ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type (ATP-PFK) (PFK-P) (EC 2.7.1.11) (6-phosphofructokinase type C) (Phosphofructo-1-kinase isozyme C) (PFK-C) (Phosphohexokinase) Mus musculus (Mouse)
Trophoblast glycoprotein (5T4 oncofetal trophoblast glycoprotein) (5T4 oncotrophoblast glycoprotein) (Wnt-activated inhibitory factor 1) (WAIF1) Mus musculus (Mouse)
V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1 (V-ATPase 116 kDa isoform a1) (Clathrin-coated vesicle/synaptic vesicle proton pump 116 kDa subunit) (Vacuolar adenosine triphosphatase subunit Ac116) (Vacuolar proton pump subunit 1) (Vacuolar

proton translocating ATPase 116 kDa subunit a isoform 1) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Protein ABHD16A (EC 3.-.-) (Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 16A) (Abhydrolase domain-containing protein 16A) (HLA-B-associated transcript 5) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1, mitochondrial (Leucine zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
MICOS complex subunit <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) (Fragment) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Protein Gm11214 (Fragment) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Protein Igkv4-81 <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Protein Igkv4-80 (Fragment) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Protein Igkv4-63 <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Protein Igkv4-58 <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Protein Igkv4-57-1 (Fragment) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Protein Igkv5-39 <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Protein Igkv12-38 <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Protein Igkv6-29 <i>Mus musculus</i> (Mouse)

- Πίνακας 2: Μόρια που ανιχνεύθηκαν στο σύμπλοκο ανοσοκατακρήμνισης του δείγματος IP GFP της 2ης ανοσοκατακρήμνισης έπειτα από αφαίρεση των μορίων που ήταν κοινά με το control

54S ribosomal protein L4, mitochondrial <i>Aspergillus clavatus</i> (strain ATCC 1007 / CBS 513.65 / DSM 816 / NCTC 3887 / NRRL 1)
6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase (DMRL synthase) (LS) (Lumazine synthase) (EC 2.5.1.78) <i>Yersinia enterocolitica</i> serotype O:8 / biotype 1B (strain NCTC 13174 / 8081)
Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta (EC 6.2.1.5) (Succinyl-CoA synthetase subunit beta) (SCS-beta) <i>Yersinia enterocolitica</i> serotype O:8 / biotype 1B (strain NCTC 13174 / 8081)
ATP synthase subunit alpha (EC 3.6.3.14) (ATP synthase F1 sector subunit alpha) (F-ATPase subunit alpha) <i>Yersinia enterocolitica</i> serotype O:8 / biotype 1B (strain NCTC 13174 / 8081)
ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14) (ATP synthase F1 sector subunit beta) (F-ATPase subunit beta) <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype 5b (strain L20)
Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) (Serine methylase) (EC 2.1.2.1) <i>Enterobacter</i> sp. (strain 638)
Elongation factor P (EF-P) <i>Vibrio cholerae</i> serotype O1 (strain ATCC 39541 / Classical Ogawa 395 / O395)
50S ribosomal protein L14 <i>Rickettsia massiliae</i> (strain Mtu5)
Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta (EC 6.2.1.5) (Succinyl-CoA synthetase subunit beta) (SCS-beta) <i>Serratia proteamaculans</i> (strain 568)
2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase (BPG-dependent PGAM) (PGAM) (Phosphoglyceromutase) (dPGM) (EC 5.4.2.11) <i>Serratia proteamaculans</i> (strain 568)
NAD(P)H dehydrogenase (quinone) (EC 1.6.5.2) (Flavoprotein WrbA) (NAD(P)H:quinone oxidoreductase) (NQO) <i>Serratia proteamaculans</i> (strain 568)
Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3) <i>Serratia proteamaculans</i> (strain 568)
ATP-dependent 6-phosphofructokinase (ATP-PFK) (Phosphofructokinase) (EC 2.7.1.11) (Phosphohexokinase) <i>Serratia proteamaculans</i> (strain 568)
Leucine--tRNA ligase (EC 6.1.1.4) (Leucyl-tRNA synthetase) (LeuRS) <i>Herpetosiphon aurantiacus</i> (strain ATCC 23779 / DSM 785)
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1 (MitoNEET) <i>Rattus norvegicus</i> (Rat)
Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvB (EC 3.6.4.12) <i>Cyanotheca</i> sp. (strain ATCC 51142)
Aspartate carbamoyltransferase (EC 2.1.3.2) (Aspartate transcarbamylase) (ATCase) <i>Natranaerobius thermophilus</i> (strain ATCC BAA-1301 / DSM 18059 / JW/NM-WN-LF)
Putative bifunctional polymyxin resistance protein ArnA [Includes: UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose formyltransferase (EC 2.1.2.13) (ArnAFT) (UDP-L-Ara4N formyltransferase); UDP-glucuronic acid oxidase, UDP-4-keto-hexauronic acid decarboxylating (EC 1.1.1.305) (ArnADH) (UDP-GlcUA decarboxylase) (UDP-glucuronic acid dehydrogenase)] <i>Shigella boydii</i> serotype 18 (strain CDC 3083-94 / BS512)
Trigger factor (TF) (EC 5.2.1.8) (PPIase) <i>Aliivibrio salmonicida</i> (strain LFI1238) (<i>Vibrio salmonicida</i> (strain LFI1238))
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) <i>Escherichia fergusonii</i> (strain ATCC 35469 / DSM 13698 / CDC 0568-73)
Translation initiation factor IF-3 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (strain PC1)

Outer membrane protein F (Porin OmpF) <i>Serratia marcescens</i>
Prohibitin-2 (B-cell receptor-associated protein BAP37) (Repressor of estrogen receptor activity) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44 <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Neutral amino acid transporter A (Alanine/serine/cysteine/threonine transporter 1) (ASCT-1) (SATT) (Solute carrier family 1 member 4) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Membrane-associated progesterone receptor component 1 <i>Mus musculus</i> (Mouse)
PRA1 family protein 2 <i>Homo sapiens</i> (Human)
Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase (EC 1.1.1.330) (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 12) (17-beta-HSD 12) (3-ketoacyl-CoA reductase) (KAR) (Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12) (EC 1.1.1.62) (KIK-I) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Secretory carrier-associated membrane protein 1 (Secretory carrier membrane protein 1) <i>Sus scrofa</i> (Pig)
Acetolactate synthase small subunit (EC 2.2.1.6) (Acetohydroxy-acid synthase small subunit) (AHAS) (ALS) <i>Buchnera aphidicola</i> subsp. <i>Schizaphis graminum</i> (strain Sg)
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-2 (EC 3.1.4.11) (Phosphoinositide phospholipase C-beta-2) (Phospholipase C-beta-2) (PLC-beta-2) <i>Rattus norvegicus</i> (Rat)
Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin) (Cytoplasmic beta-actin) [Cleaved into: Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed] <i>Xenopus laevis</i> (African clawed frog)
Low-density lipoprotein receptor (LDL receptor) (Fragment) <i>Bos taurus</i> (Bovine)
Ig lambda-1 chain V region <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Ig lambda-1 chain V regions MOPC 104E/RPC20/J558/S104 <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Ig lambda-1 chain V region H2020 <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Ig kappa chain C region <i>Homo sapiens</i> (Human)
Ig lambda-1 chain C region <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Hemoglobin subunit alpha-1 (Alpha-1-globin) (Hemoglobin alpha-1 chain) <i>Bos mutus grunniens</i> (Wild yak) (<i>Bos grunniens</i>)
Hemoglobin subunit beta (Beta-globin) (Hemoglobin beta chain) <i>Sus scrofa</i> (Pig)
Hemoglobin fetal subunit beta (Beta-globin, fetal) (Hemoglobin beta chain, fetal) (Hemoglobin gamma chain) <i>Bos taurus</i> (Bovine)
Alpha-fetoprotein (Alpha-1-fetoprotein) (Alpha-fetoglobulin) <i>Homo sapiens</i> (Human)
Lactotransferrin (Lactoferrin) (EC 3.4.21.-) (Growth-inhibiting protein 12) (Talaktoferrin) [Cleaved into: Lactoferricin-H (Lfcin-H); Kaliocin-1; Lactoferroxin-A; Lactoferroxin-B; Lactoferroxin-C] <i>Homo sapiens</i> (Human)
Envelope glycoprotein (Env polyprotein) [Cleaved into: Surface protein (SU) (Glycoprotein 70) (gp70); Transmembrane protein (TM) (Envelope protein p15E); R-peptide (p2E)] (Fragment) Kirsten murine leukemia virus (KiMSV)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (38 kDa BFA-dependent ADP-ribosylation substrate) (BARS-38) (Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH) (EC 2.6.99.-) <i>Rattus norvegicus</i> (Rat)
Glutathione S-transferase P (EC 2.5.1.18) (Chain 7) (GST 7-7) (GST class-pi) <i>Rattus norvegicus</i> (Rat)
ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14) (ATP synthase F1 sector subunit beta) (F-ATPase subunit beta) <i>Rhodospirillum rubrum</i>
Amyloid beta A4 protein (ABPP) (APPI) (APP) (Alzheimer disease amyloid protein) (Amyloid precursor protein) (Beta-amyloid precursor protein) (Cerebral vascular amyloid peptide) (CVAP) (PreA4) (Protease nexin-II) (PN-II) [Cleaved into: N-APP; Soluble APP-alpha (S-APP-alpha); Soluble APP-beta (S-APP-beta); C99; Beta-amyloid protein 42 (Beta-APP42); Beta-amyloid protein 40 (Beta-APP40); C83; P3(42); P3(40); C80; Gamma-secretase C-terminal fragment 59 (Amyloid intracellular domain 59) (AICD-59) (AID(59)) (Gamma-CTF(59)); Gamma-secretase C-terminal fragment 57 (Amyloid intracellular domain 57) (AICD-57) (AID(57)) (Gamma-CTF(57)); Gamma-secretase C-terminal fragment 50 (Amyloid intracellular domain 50) (AICD-50) (AID(50)) (Gamma-CTF(50)); C31] <i>Homo sapiens</i> (Human)
Protein S100-A8 (Calgranulin-A) (Calprotectin L1L subunit) (Cystic fibrosis antigen) (CFAG) (Leukocyte L1 complex light chain) (Migration inhibitory factor-related protein 8) (MRP-8) (p8) (S100 calcium-binding protein A8) (Urinary stone protein band A) [Cleaved into: Protein S100-A8, N-terminally processed] <i>Homo sapiens</i> (Human)
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 (Na ⁺)/K ⁺ ATPase alpha-1 subunit) (EC 3.6.3.9) (Sodium pump subunit alpha-1) <i>Rattus norvegicus</i> (Rat)
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 (EC 2.4.99.18) (Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 67 kDa subunit) (Ribophorin I) (RPN-I) (Ribophorin-1) <i>Rattus norvegicus</i> (Rat)
Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 90) (Heat shock 84 kDa) (HSP 84) (HSP84) <i>Homo sapiens</i> (Human)
Integrin beta-1 (Fibronectin receptor subunit beta) (VLA-4 subunit beta) (CD antigen CD29) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Formate acetyltransferase 1 (EC 2.3.1.54) (Pyruvate formate-lyase 1) <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
Cysteine synthase A (CSase A) (EC 2.5.1.47) (O-acetylserine (thiol)-lyase A) (OAS-TL A) (O-acetylserine sulfhydrylase A) <i>Salmonella typhimurium</i> (strain LT2 / SGSC1412 / ATCC 700720)
Ribose-phosphate pyrophosphokinase (RPPK) (EC 2.7.6.1) (5-phospho-D-ribose alpha-1-diphosphate) (Phosphoribosyl diphosphate synthase) (Phosphoribosyl pyrophosphate synthase) (P-Rib-PP synthase) (PRPP synthase) (PRPPase) <i>Salmonella typhi</i>
Peptidoglycan-associated lipoprotein <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
Cold shock-like protein CspC (CSP-C) <i>Escherichia coli</i> O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC)
Fructose-bisphosphate aldolase class 2 (FBP aldolase) (FBPA) (EC 4.1.2.13) (Fructose-1,6-bisphosphate aldolase) (Fructose-bisphosphate aldolase class II) <i>Escherichia coli</i> (strain K12)
DNA-binding protein HU-beta (HU-1) (NS1) <i>Escherichia coli</i> O6:H1 (strain CFT073 / ATCC 700928 / UPEC)
Phosphate-binding protein PstS (PBP) <i>Shigella flexneri</i>

Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 (G protein subunit beta-2) (Transducin beta chain 2) Bos taurus (Bovine)
NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial (EC 1.6.1.2) (Nicotinamide nucleotide transhydrogenase) (Pyridine nucleotide transhydrogenase) Bos taurus (Bovine)
Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8) (Lipopolysaccharide-associated protein 1) (LAP-1) (LPS-associated protein 1) Homo sapiens (Human)
Ras-related protein Ral-A Homo sapiens (Human)
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP-1) (Lysosome-associated membrane protein 1) (CD107 antigen-like family member A) (CD antigen CD107a) Homo sapiens (Human)
Beta-casein Ovis aries (Sheep)
2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial (EC 1.2.4.4) (Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 component alpha chain) (BCKDE1A) (BCKDH E1-alpha) (Fragment) Rattus norvegicus (Rat)
Alpha-2-HS-glycoprotein (Asialofetuin) (Fetuin-A) Bos taurus (Bovine)
Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Nucleolar protein NO38) (Numatrin) Rattus norvegicus (Rat)
Neural cell adhesion molecule 1 (N-CAM-1) (NCAM-1) (CD antigen CD56) Mus musculus (Mouse)
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial (Alpha-ETF) Homo sapiens (Human)
Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha Mus musculus (Mouse)
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide IV) (Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1) (COX IV-1) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-6A (Rab-6) Homo sapiens (Human)
Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor (CD Man-6-P receptor) (CD-MPR) (46 kDa mannose 6-phosphate receptor) (MPR 46) Mus musculus (Mouse)
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial Homo sapiens (Human)
Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13 (G alpha-13) (G-protein subunit alpha-13) Mus musculus (Mouse)
Protein Wnt-3 (Fragment) Eptatretus stoutii (Pacific hagfish)
D-methionine-binding lipoprotein MetQ Escherichia coli (strain K12)
Granulins (PC cell-derived growth factor) (PCDGF) (Proepithelin) (PEPI) [Cleaved into: Acrogranin (Progranulin); Granulin-1; Granulin-2; Granulin-3; Granulin-4; Granulin-5; Granulin-6; Granulin-7] Mus musculus (Mouse)
Ribonuclease inhibitor (Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1) Rattus norvegicus (Rat)
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22 (EC 3.1.3.48) (Hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase 70Z-PEP) (PEST-domain phosphatase) (PEP) Mus musculus (Mouse)
Caspase-14 (CASP-14) (EC 3.4.22.-) [Cleaved into: Caspase-14 subunit p17, mature form; Caspase-14 subunit p10, mature form; Caspase-14 subunit p20, intermediate form; Caspase-14 subunit p8, intermediate form] Homo sapiens (Human)
Alpha-1-antitrypsin (Alpha-1-antitrypsin) (Alpha-1-proteinase inhibitor) (Serpin A1) Bos taurus (Bovine)
Ras-related protein Rab-5C Mus musculus (Mouse)
E3 ubiquitin-protein ligase HEL2 (EC 6.3.2.-) (Histone E3 ligase 2) Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) (Baker's yeast)
Glutamate/aspartate import solute-binding protein Escherichia coli (strain K12)
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (EC 1.1.1.44) (Fragment) Citrobacter freundii
Uncharacterized protein ORF2 in thsB 5' region Sulfolobus shibatae
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit (DDOST 48 kDa subunit) (Oligosaccharyl transferase 48 kDa subunit) (EC 2.4.99.18) (OST 50 kDa subunit) Gallus gallus (Chicken)
ADP/ATP translocase 1 (ADP,ATP carrier protein 1) (ADP,ATP carrier protein, heart/skeletal muscle isoform T1) (Adenine nucleotide translocator 1) (ANT 1) (Solute carrier family 25 member 4) (mANC1) Mus musculus (Mouse)
ADP/ATP translocase 2 (ADP,ATP carrier protein 2) (Adenine nucleotide translocator 2) (ANT 2) (Solute carrier family 25 member 5) [Cleaved into: ADP/ATP translocase 2, N-terminally processed] Mus musculus (Mouse)
Neutral amino acid transporter B(0) (ATB(0)) (ASC-like Na(+)-dependent neutral amino acid transporter ASCT2) (Insulin-activated amino acid transporter) (Sodium-dependent neutral amino acid transporter type 2) (Solute carrier family 1 member 5) Mus musculus (Mouse)
Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial (EC 2.3.1.168) (Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex component E2) (BCKAD-E2) (BCKADE2) (Dihydrolipoamide acetyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex) (Dihydrolipoamide branched chain transacylase) (Dihydrolipoyllysine-residue (2-methylpropanoyl)transferase) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-8A (Oncogene c-mel) Mus musculus (Mouse)
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit beta, mitochondrial (EC 1.1.1.41) (Isocitric dehydrogenase subunit beta) (NAD(+)-specific ICDH subunit beta) (Fragments) Sus scrofa (Pig)
ATP synthase subunit beta, mitochondrial (EC 3.6.3.14) Mus musculus (Mouse)
DNA gyrase subunit A (EC 5.99.1.3) Buchnera aphidicola subsp. Acyrthosiphon pisum (strain APS) (Acyrtosiphon pisum symbiotic bacterium)
Myelin proteolipid protein (PLP) (Lipophilin) Homo sapiens (Human)
Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) (Super protein) (SUP) (Synaptosomal-associated 25 kDa protein) Homo sapiens (Human)
Ras-related protein Rab-11A (Rab-11) (YL8) Homo sapiens (Human)

Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 (Transducin beta chain 1) Homo sapiens (Human)
60 kDa heat shock protein, mitochondrial (60 kDa chaperonin) (Chaperonin 60) (CPN60) (HSP-65) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Hsp60) (Mitochondrial matrix protein P1) Mus musculus (Mouse)
Tubulin alpha-1B chain (Alpha-tubulin ubiquitous) (Tubulin K-alpha-1) (Tubulin alpha-ubiquitous chain) Homo sapiens (Human)
Histone H2B <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow trout) (<i>Salmo gairdneri</i>)
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC-2) (B36-VDAC) (Outer mitochondrial membrane protein porin 2) <i>Rattus norvegicus</i> (Rat)
Ubiquitin (Fragment) <i>Lumbricus terrestris</i> (Common earthworm)
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHE1-B) (EC 1.2.4.1) (Fragments) <i>Mesocricetus auratus</i> (Golden hamster)
Lysyl endopeptidase (EC 3.4.21.50) (Protease IV) (PvdS-regulated endoprotease) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain UCBPP-PA14)
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2 <i>Bos taurus</i> (Bovine)
ATP synthase subunit e, mitochondrial (ATPase subunit e) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Apoptosis regulator BAX <i>Mus musculus</i> (Mouse)
DNA-directed RNA polymerase subunit beta (RNAP subunit beta) (EC 2.7.7.6) (RNA polymerase subunit beta) (Transcriptase subunit beta) <i>Syntrophomonas wolfei</i> subsp. <i>wolfei</i> (strain DSM 2245B / Goettingen)
Anthranilate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.18) <i>Hyphomonas neptunium</i> (strain ATCC 15444)
Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin) [Cleaved into: Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed] <i>Bos mutus grunniens</i> (Wild yak) (<i>Bos grunniens</i>)
Ribosome quality control complex subunit 2 (Translation-associated element 2) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508 / S288c) (Baker's yeast)
Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C (Cam-PDE 1C) (EC 3.1.4.17) (hCam-3) Homo sapiens (Human)
Protein disulfide-isomerase A6 (EC 5.3.4.1) (Endoplasmic reticulum protein 5) (ER protein 5) (Erp5) (Protein disulfide isomerase P5) (Thioredoxin domain-containing protein 7) Homo sapiens (Human)
Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) (Cellubrevin) (CEB) (Synaptobrevin-3) Homo sapiens (Human)
Transmembrane protein 106B <i>Danio rerio</i> (Zebrafish) (<i>Brachydanio rerio</i>)
Synaptobrevin-like protein <i>Schistosoma mansoni</i> (Blood fluke)
ADP-ribosylation factor-like protein 8B <i>Bos taurus</i> (Bovine)
Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP] (PCK) (PEP carboxykinase) (PEPCK) (EC 4.1.1.49) <i>Nitrobacter winogradskyi</i> (strain ATCC 25391 / DSM 10237 / CIP 104748 / NCIMB 11846 / Nb-255)
Regulator complex protein LAMTOR1 (Late endosomal/lysosomal adaptor and MAPK and MTOR activator 1) <i>Bos taurus</i> (Bovine)
Stress-70 protein, mitochondrial (75 kDa glucose-regulated protein) (GRP-75) (Heat shock 70 kDa protein 9) <i>Bos taurus</i> (Bovine)
Xin actin-binding repeat-containing protein 2 (Beta-xin) (Cardiomyopathy-associated protein 3) (Myogenic MEF2-activated Xin-related protein) (Myomaxin) (mXinbeta) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Probable serine/threonine-protein kinase atr1 (EC 2.7.11.1) (Ataxia telangiectasia and rad3 related protein 1) <i>Dictyostelium discoideum</i> (Slime mold)
Putative actin-28 <i>Dictyostelium discoideum</i> (Slime mold)
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase MLK4 (EC 2.7.11.25) (Mixed lineage kinase 4) Homo sapiens (Human)
Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) (PEPCase) (EC 4.1.1.31) <i>Nocardia farcinica</i> (strain IFM 10152)
B-cell receptor-associated protein 31 (BCR-associated protein 31) (Bap31) (p28) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Integrin alpha-6 (CD49 antigen-like family member F) (VLA-6) (CD antigen CD49f) [Cleaved into: Integrin alpha-6 heavy chain; Integrin alpha-6 light chain] <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Transferrin receptor protein 1 (TR) (TfR) (TfR1) (TfR) (CD antigen CD71) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial (GPD-M) (GPDH-M) (EC 1.1.5.3) (Protein TISP38) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 2 (EC 3.-.-.-) Homo sapiens (Human)
ATP synthase subunit b (ATP synthase F(0) sector subunit b) (ATPase subunit I) (F-type ATPase subunit b) (F-ATPase subunit b) <i>Pectobacterium atrosepticum</i> (strain SCRI 1043 / ATCC BAA-672) (<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>)
Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1) (CK-1) (Epithelial keratin-1) (Keratin-1) (K1) (Type-II keratin Kb1) <i>Canis lupus familiaris</i> (Dog) (<i>Canis familiaris</i>)
2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial (EC 1.2.4.4) (Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 component beta chain) (BCKDE1B) (BCKDH E1-beta) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Mitochondrial carrier homolog 2 <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Transaldolase (EC 2.2.1.2) <i>Photobacterium luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> (strain DSM 15139 / CIP 105565 / TT01)
Alpha-2-macroglobulin (Alpha-2-M) <i>Bos taurus</i> (Bovine)
Ankyrin and armadillo repeat-containing protein Homo sapiens (Human)
Membrane-associated progesterone receptor component 2 <i>Mus musculus</i> (Mouse)
D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.1.1.30) (3-hydroxybutyrate dehydrogenase) (BDH) <i>Mus musculus</i> (Mouse)
Chaperone protein ClpB <i>Coxiella burnetii</i> (strain RSA 493 / Nine Mile phase I)
Transaldolase (EC 2.2.1.2) <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (strain DC3000)

Lanosterol synthase (EC 5.4.99.7) (2,3-epoxysqualene--lanosterol cyclase) (Oxidosqualene--lanosterol cyclase) (OSC) Mus musculus (Mouse)
Prostaglandin E synthase 2 (EC 5.3.99.3) (GATE-binding factor 1) (GBF-1) (Microsomal prostaglandin E synthase 2) (mPGES-2) [Cleaved into: Prostaglandin E synthase 2 truncated form] Mus musculus (Mouse)
Glycerophosphocholine phosphodiesterase GPCPD1 (EC 3.1.4.2) (Glycerophosphodiester phosphodiesterase 5) (Preimplantation protein 4) Mus musculus (Mouse)
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (Amino acid transporter A2) (Solute carrier family 38 member 2) (System A amino acid transporter 2) (System A transporter 1) (System N amino acid transporter 2) Mus musculus (Mouse)
Chloride channel protein CLC-f (AtCLC-f) (CBS domain-containing protein CBSCLC1) Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Thioredoxin-related transmembrane protein 1 (Thioredoxin domain-containing protein 1) Mus musculus (Mouse)
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial (EC 1.6.5.3) (EC 1.6.99.3) (Complex I-75kD) (CI-75kD) Mus musculus (Mouse)
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1) (Flavoprotein subunit of complex II) (Fp) Rattus norvegicus (Rat)
Sideroflexin-1 Mus musculus (Mouse)
Dehydrogenase/reductase SDR family member 1 (EC 1.1.-.-) Mus musculus (Mouse)
ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial (ATP synthase subunit b) (ATPase subunit b) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome b5 type B (Cytochrome b5 outer mitochondrial membrane isoform) Mus musculus (Mouse)
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1 (GAPR-1) (Golgi-associated PR-1 protein) (Glioma pathogenesis-related protein 2) (GliPR 2) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial (Complex III subunit 1) (Core protein I) (Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 1) Mus musculus (Mouse)
Mitochondrial import receptor subunit TOM70 (Mitochondrial precursor proteins import receptor) (Translocase of outer membrane 70 kDa subunit) (Translocase of outer mitochondrial membrane protein 70) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial (Complex III subunit 4) (Complex III subunit IV) (Cytochrome b-c1 complex subunit 4) (Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex cytochrome c1 subunit) (Cytochrome c-1) Mus musculus (Mouse)
Epoxide hydrolase 1 (EC 3.3.2.9) (Epoxide hydratase) (Microsomal epoxide hydrolase) Mus musculus (Mouse)
ATP synthase subunit O, mitochondrial (Oligomycin sensitivity conferral protein) (OSCP) Mus musculus (Mouse)
NADH-cytochrome b5 reductase 1 (b5R.1) (EC 1.6.2.2) (NAD(P)H:quinone oxidoreductase type 3 polypeptide A2) Mus musculus (Mouse)
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10 (Complex I-PDSW) (CI-PDSW) (NADH-ubiquinone oxidoreductase PDSW subunit) Mus musculus (Mouse)
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial (EC 1.6.5.3) (EC 1.6.99.3) (Complex I-30kD) (CI-30kD) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 30 kDa subunit) Mus musculus (Mouse)
ATP-binding cassette sub-family B member 10, mitochondrial (ABC-mitochondrial erythroid protein) (ABC-me protein) (ATP-binding cassette transporter 10) (ABC transporter 10 protein) Mus musculus (Mouse)
Sphingomyelin phosphodiesterase 3 (EC 3.1.4.12) (Neutral sphingomyelinase 2) (nSMase-2) (nSMase2) (Neutral sphingomyelinase II) Mus musculus (Mouse)
Retinol dehydrogenase 11 (EC 1.1.1.300) (Androgen-regulated short-chain dehydrogenase/reductase 1) (Cell line MC/9.IL4-derived protein 1) (M42C60) (Prostate short-chain dehydrogenase/reductase 1) (Retinal reductase 1) (RalR1) (Short-chain aldehyde dehydrogenase) (SCALD) Mus musculus (Mouse)
Ubiquilin-2 (Chap1) (DSK2 homolog) (Protein linking IAP with cytoskeleton 2) (PLIC-2) (Ubiquitin-like product Chap1/Dsk2) Mus musculus (Mouse)
Wall-associated receptor kinase-like 4 (EC 2.7.11.-) Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Large neutral amino acids transporter small subunit 1 (4F2 light chain) (4F2 LC) (4F2LC) (L-type amino acid transporter 1) (Solute carrier family 7 member 5) Mus musculus (Mouse)

- Πίνακας 3: Μόρια που ανιχνεύθηκαν στο σύμπλοκο ανοσοκατακρήμνισης του δείγματος IP MCA της 2ης ανοσοκατακρήμνισης έπειτα από αφαίρεση των μορίων που ήταν κοινά με το control.

Protein Iglv1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Ragulator complex protein LAMTOR1 Mus musculus (Mouse)
Neural cell adhesion molecule 1 Mus musculus (Mouse)
Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 2 (Brefeldin A-inhibited GEP 2) (ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2) Mus musculus (Mouse)
Glycerophosphocholine phosphodiesterase GPCPD1 Mus musculus (Mouse)
Annexin (Fragment) Mus musculus (Mouse)
ATP synthase subunit d, mitochondrial (Fragment) Mus musculus (Mouse)

Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1 Mus musculus (Mouse)
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-6A Mus musculus (Mouse)
Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 Mus musculus (Mouse)
Transmembrane protein 106B (Fragment) Mus musculus (Mouse)
High affinity cationic amino acid transporter 1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2 (RIKEN cDNA 1500009M05, isoform CRA_b) Mus musculus (Mouse)
Fatty acyl-CoA reductase 1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Annexin Mus musculus (Mouse)
60S acidic ribosomal protein P0 Mus musculus (Mouse)
Protein Krt78 Mus musculus (Mouse)
RWD domain-containing protein 3 Mus musculus (Mouse)
Protein Krt90 Mus musculus (Mouse)
Protein Gm10073 Mus musculus (Mouse)
Polyubiquitin-C (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22 Mus musculus (Mouse)
Myelin transcription factor 1-like protein Mus musculus (Mouse)
Thioredoxin-related transmembrane protein 1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Epoxide hydrolase 1 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Histone H2A Mus musculus (Mouse)
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
MCG22989, isoform CRA_a (Ras-related protein Rab-11B) Mus musculus (Mouse)
Protein Obox3 (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Ankyrin 3, epithelial, isoform CRA_b (Ankyrin-3) Mus musculus (Mouse)
Hydroperoxide isomerase ALOXE3 Mus musculus (Mouse)
T-complex protein 1 subunit theta (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Basigin (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial (Fragment) Mus musculus (Mouse)
Prohibitin-2 (B-cell receptor-associated protein BAP37) (Repressor of estrogen receptor activity) Mus musculus (Mouse)
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44 Mus musculus (Mouse)
Neutral amino acid transporter A (Alanine/serine/cysteine/threonine transporter 1) (ASCT-1) (SATT) (Solute carrier family 1 member 4) Mus musculus (Mouse)
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit (DDOST 48 kDa subunit) (Oligosaccharyl transferase 48 kDa subunit) (EC 2.4.99.18) Mus musculus (Mouse)
Membrane-associated progesterone receptor component 1 Mus musculus (Mouse)
Protein NipSnap homolog 1 (NipSnap1) Mus musculus (Mouse)
Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase (EC 1.1.1.330) (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 12) (17-beta-HSD 12) (3-ketoacyl-CoA reductase) (KAR) (Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12) (EC 1.1.1.62) (KIK-I) Mus musculus (Mouse)
Lymphocyte antigen 86 (Ly-86) (Protein MD-1) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome c oxidase subunit 2 (Cytochrome c oxidase polypeptide II) Mus musculus (Mouse)
Ig lambda-1 chain V regions MOPC 104E/RPC20/J558/S104 Mus musculus (Mouse)
Ig lambda-1 chain V region H2020 Mus musculus (Mouse)
Ig lambda-1 chain C region Mus musculus (Mouse)
Beta-2-microglobulin Mus musculus (Mouse)
Hemoglobin subunit alpha (Alpha-globin) (Hemoglobin alpha chain) Mus musculus (Mouse)
Keratin, type I cytoskeletal 10 (56 kDa cytokeratin) (Cytokeratin-10) (CK-10) (Keratin, type I cytoskeletal 59 kDa) (Keratin-10) (K10) Mus musculus (Mouse)
Keratin, type II cytoskeletal 1 (67 kDa cytokeratin) (Cytokeratin-1) (CK-1) (Keratin-1) (K1) (Type-II keratin Kb1) Mus musculus (Mouse)
Tubulin alpha-1B chain (Alpha-tubulin 2) (Alpha-tubulin isotype M-alpha-2) (Tubulin alpha-2 chain) Mus musculus (Mouse)
Serum albumin Mus musculus (Mouse)
Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2 (Adenylate cyclase-inhibiting G alpha protein) Mus musculus (Mouse)
Integrin beta-1 (Fibronectin receptor subunit beta) (VLA-4 subunit beta) (CD antigen CD29) Mus musculus (Mouse)
Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1) (Elongation factor Tu) (EF-Tu) (Eukaryotic elongation factor 1 A-1) (eEF1A-1) Mus musculus (Mouse)
MLV-related proviral Env polyprotein [Cleaved into: Surface protein (SU); Transmembrane protein (TM)] Mus musculus (Mouse)
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP-1) (Lysosome-associated membrane protein 1) (120 kDa lysosomal membrane glycoprotein) (CD107 antigen-like family member A) (LGP-120) (Lysosomal membrane glycoprotein A) (LGP-A) (P2B) (CD antigen CD107a) Mus musculus (Mouse)
Heat shock protein HSP 90-beta (Heat shock 84 kDa) (HSP 84) (HSP84) (Tumor-specific transplantation 84 kDa antigen) (TSTA) Mus

musculus (Mouse)
Amyloid beta A4 protein (ABPP) (APP) (Alzheimer disease amyloid A4 protein homolog) (Amyloid precursor protein) (Amyloidogenic glycoprotein) (AG) (Beta-amyloid precursor protein) [Cleaved into: N-APP; Soluble APP-alpha (S-APP-alpha); Soluble APP-beta (S-APP-beta); C99 (APP-C99); Beta-amyloid protein 42 (Beta-APP42); Beta-amyloid protein 40 (Beta-APP40); C83; P3(42); P3(40); C80; Gamma-secretase C-terminal fragment 59 (APP-C59) (Amyloid intracellular domain 59) (AID(59)) (Gamma-CTF(59)); Gamma-secretase C-terminal fragment 57 (APP-C57) (Amyloid intracellular domain 57) (AID(57)) (Gamma-CTF(57)); Gamma-secretase C-terminal fragment 50 (Amyloid intracellular domain 50) (AID(50)) (Gamma-CTF(50)); C31] Mus musculus (Mouse)
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide Va) Mus musculus (Mouse)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH) (EC 2.6.99.-) Mus musculus (Mouse)
Cofilin-1 (Cofilin, non-muscle isoform) Mus musculus (Mouse)
Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha Mus musculus (Mouse)
Glutathione S-transferase P 1 (Gst P1) (EC 2.5.1.18) (GST YF-YF) (GST class-pi) (GST-piB) (Preadipocyte growth factor) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide Vb) Mus musculus (Mouse)
78 kDa glucose-regulated protein (GRP-78) (Heat shock 70 kDa protein 5) (Immunoglobulin heavy chain-binding protein) (BiP) Mus musculus (Mouse)
Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor (CD Man-6-P receptor) (CD-MPR) (46 kDa mannose 6-phosphate receptor) (MPR 46) Mus musculus (Mouse)
Granulins (PC cell-derived growth factor) (PCDGF) (Proepithelin) (PEPI) [Cleaved into: Acrogranin (Progranulin); Granulin-1; Granulin-2; Granulin-3; Granulin-4; Granulin-5; Granulin-6; Granulin-7] Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-5C Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-21 (Rab-12) Mus musculus (Mouse)
Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret (EC 2.7.10.1) (Proto-oncogene c-Ret) [Cleaved into: Soluble RET kinase fragment; Extracellular cell-membrane anchored RET cadherin 120 kDa fragment] Mus musculus (Mouse)
Neuronal membrane glycoprotein M6-a (M6a) Mus musculus (Mouse)
Low-density lipoprotein receptor (LDL receptor) Mus musculus (Mouse)
CD9 antigen (CD antigen CD9) Mus musculus (Mouse)
Mu-type opioid receptor (M-OR-1) (MOR-1) Mus musculus (Mouse)
ADP/ATP translocase 1 (ADP,ATP carrier protein 1) (ADP,ATP carrier protein, heart/skeletal muscle isoform T1) (Adenine nucleotide translocator 1) (ANT 1) (Solute carrier family 25 member 4) (mANC1) Mus musculus (Mouse)
2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial (EC 1.2.4.4) (Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 component alpha chain) (BCKDE1A) (BCKDH E1-alpha) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-7a Mus musculus (Mouse)
ADP/ATP translocase 2 (ADP,ATP carrier protein 2) (Adenine nucleotide translocator 2) (ANT 2) (Solute carrier family 25 member 5) [Cleaved into: ADP/ATP translocase 2, N-terminally processed] Mus musculus (Mouse)
Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial (EC 2.3.1.168) (Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex component E2) (BCKAD-E2) (BCKADE2) (Dihydrolipoamide acetyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex) (Dihydrolipoamide branched chain transacylase) (Dihydrolipoyllysine-residue (2-methylpropanoyl)transferase) Mus musculus (Mouse)
Monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) (Solute carrier family 16 member 1) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rab-8A (Oncogene c-mel) Mus musculus (Mouse)
ATP synthase subunit beta, mitochondrial (EC 3.6.3.14) Mus musculus (Mouse)
Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin) [Cleaved into: Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed] Mus musculus (Mouse)
Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) (Super protein) (SUP) (Synaptosomal-associated 25 kDa protein) Mus musculus (Mouse)
Protein yippee-like 5 Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Rap-1A (Ras-related protein Krev-1) Mus musculus (Mouse)
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 (Transducin beta chain 1) Mus musculus (Mouse)
Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8) Mus musculus (Mouse)
Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) (Cellubrevin) (CEB) (Synaptobrevin-3) Mus musculus (Mouse)
60 kDa heat shock protein, mitochondrial (60 kDa chaperonin) (Chaperonin 60) (CPN60) (HSP-65) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Hsp60) (Mitochondrial matrix protein P1) Mus musculus (Mouse)
Vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP-2) (Synaptobrevin-2) Mus musculus (Mouse)
Ras-related protein Ral-A Mus musculus (Mouse)
Tubulin beta-5 chain Mus musculus (Mouse)
Junction plakoglobin (Desmoplakin III) (Desmoplakin-3) Mus musculus (Mouse)
ATP synthase subunit e, mitochondrial (ATPase subunit e) Mus musculus (Mouse)
Apoptosis regulator BAX Mus musculus (Mouse)
Zcchc4 protein Mus musculus (Mouse)
Uncharacterized protein C1orf146 homolog Mus musculus (Mouse)

Secretory carrier-associated membrane protein 1 Mus musculus (Mouse)
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin-2e) (CK-2e) (Epithelial keratin-2e) (Keratin-2 epidermis) (Keratin-2e) (K2e) (Type-II keratin Kb2) Mus musculus (Mouse)
Tetraspanin Mus musculus (Mouse)
Keratin, type II cytoskeletal 2 oral (Keratin-76) (K76) (Type-II keratin Kb9) Mus musculus (Mouse)
Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial (EC 6.3.4.3) (Formyltetrahydrofolate synthetase) Mus musculus (Mouse)
Myosin phosphatase Rho-interacting protein Mus musculus (Mouse)
Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 (VDAC-3) (mVDAC3) (Outer mitochondrial membrane protein porin 3) Mus musculus (Mouse)
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1) (mVDAC1) (Outer mitochondrial membrane protein porin 1) (Plasmalemmal porin) (Voltage-dependent anion-selective channel protein 5) (VDAC-5) (mVDAC5) Mus musculus (Mouse)
B-cell receptor-associated protein 31 (BCR-associated protein 31) (Bap31) (p28) Mus musculus (Mouse)
Keratin, type I cytoskeletal 15 (Cytokeratin-15) (CK-15) (Keratin-15) (K15) Mus musculus (Mouse)
Desmoglein-1-alpha (Desmoglein-1) (Dsg1-alpha) (DG1) (DGI) (Desmosomal glycoprotein I) Mus musculus (Mouse)
Integrin alpha-6 (CD49 antigen-like family member F) (VLA-6) (CD antigen CD49f) [Cleaved into: Integrin alpha-6 heavy chain; Integrin alpha-6 light chain] Mus musculus (Mouse)
Keratin, type I cytoskeletal 14 (Cytokeratin-14) (CK-14) (Keratin-14) (K14) Mus musculus (Mouse)
NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial (EC 1.6.1.2) (Nicotinamide nucleotide transhydrogenase) (Pyridine nucleotide transhydrogenase) Mus musculus (Mouse)
Transferrin receptor protein 1 (TR) (TfR) (TfR1) (Trfr) (CD antigen CD71) Mus musculus (Mouse)
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog (EC 1.-.-.-) Mus musculus (Mouse)
10 kDa heat shock protein, mitochondrial (Hsp10) (10 kDa chaperonin) (Chaperonin 10) (CPN10) Mus musculus (Mouse)
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial (GPD-M) (GPDH-M) (EC 1.1.5.3) (Protein TISP38) Mus musculus (Mouse)
Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3 (E-NPP 3) (Phosphodiesterase I beta) (PD-Ibeta) (Phosphodiesterase I/nucleotide pyrophosphatase 3) (CD antigen CD203c) [Includes: Alkaline phosphodiesterase I (EC 3.1.4.1); Nucleotide pyrophosphatase (NPPase) (EC 3.6.1.9)] Mus musculus (Mouse)
Keratin, type I cytoskeletal 42 (Cytokeratin-42) (CK-42) (Keratin-17n) (Keratin-42) (K42) (Type I keratin Ka22) Mus musculus (Mouse)
Keratin, type II cytoskeletal 1b (Cytokeratin-1B) (CK-1B) (Embryonic type II keratin-1) (Keratin-77) (K77) (Type-II keratin Kb39) Mus musculus (Mouse)
2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta, mitochondrial (EC 1.2.4.4) (Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 component beta chain) (BCKDE1B) (BCKDH E1-beta) Mus musculus (Mouse)
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase (EC 3.6.4.13) (BRR2 homolog) (U5 snRNP-specific 200 kDa protein) (U5-200KD) Mus musculus (Mouse)
Mitochondrial carrier homolog 2 Mus musculus (Mouse)
Maestro heat-like repeat-containing protein family member 2B (HEAT repeat-containing protein 7B2) Mus musculus (Mouse)
Inositol polyphosphate multikinase (EC 2.7.1.151) (Inositol 1,3,4,6-tetrakisphosphate 5-kinase) Mus musculus (Mouse)
Membrane-associated progesterone receptor component 2 Mus musculus (Mouse)
Tetraspanin-18 (Tspan-18) Mus musculus (Mouse)
D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.1.1.30) (3-hydroxybutyrate dehydrogenase) (BDH) Mus musculus (Mouse)
Death-associated protein kinase 1 (DAP kinase 1) (EC 2.7.11.1) Mus musculus (Mouse)
Protein EFR3 homolog A (Protein EFR3-like) Mus musculus (Mouse)
Metallo-beta-lactamase domain-containing protein 2 (EC 3.-.-.-) Mus musculus (Mouse)
Lanosterol synthase (EC 5.4.99.7) (2,3-epoxysqualene--lanosterol cyclase) (Oxidosqualene--lanosterol cyclase) (OSC) Mus musculus (Mouse)
Synaptic vesicular amine transporter (Monoamine transporter) (Solute carrier family 18 member 2) (Vesicular amine transporter 2) (VAT2) Mus musculus (Mouse)
Prostaglandin E synthase 2 (EC 5.3.99.3) (GATE-binding factor 1) (GBF-1) (Microsomal prostaglandin E synthase 2) (mPGES-2) [Cleaved into: Prostaglandin E synthase 2 truncated form] Mus musculus (Mouse)
Histone acetyltransferase KAT6A (EC 2.3.1.48) (MOZ, YBF2/SAS3, SAS2 and TIP60 protein 3) (MYST-3) (Monocytic leukemia zinc finger homolog) (Monocytic leukemia zinc finger protein) Mus musculus (Mouse)
ATP synthase subunit gamma Mus musculus (Mouse)
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (Amino acid transporter A2) (Solute carrier family 38 member 2) (System A amino acid transporter 2) (System A transporter 1) (System N amino acid transporter 2) Mus musculus (Mouse)
Protein dispatched homolog 2 Mus musculus (Mouse)
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1) (Flavoprotein subunit of complex II) (Fp) Mus musculus (Mouse)
Interleukin-17 receptor C (IL-17 receptor C) (IL-17RC) (Interleukin-17 receptor-like protein) (IL-17RL) (ZcytoR14) Mus musculus (Mouse)

Epiplakin Mus musculus (Mouse)
Zinc transporter 5 (ZnT-5) (Solute carrier family 30 member 5) Mus musculus (Mouse)
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 (Na ⁺)/K ⁺ ATPase alpha-1 subunit) (EC 3.6.3.9) (Sodium pump subunit alpha-1) Mus musculus (Mouse)
Keratin, type II cytoskeletal 79 (Cytokeratin-79) (CK-79) (Keratin-79) (K79) (Type-II keratin Kb38) Mus musculus (Mouse)
Phosphate carrier protein, mitochondrial (Phosphate transport protein) (PTP) (Solute carrier family 25 member 3) Mus musculus (Mouse)
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial (EC 1.1.1.41) Mus musculus (Mouse)
NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial (EC 1.6.5.3) (EC 1.6.99.3) (Complex I-75kD) (CI-75kD) Mus musculus (Mouse)
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1 (MitoNEET) Mus musculus (Mouse)
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 (EC 2.4.99.18) (Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 67 kDa subunit) (Ribophorin I) (RPN-I) (Ribophorin-1) Mus musculus (Mouse)
Protein disulfide-isomerase A6 (EC 5.3.4.1) (Thioredoxin domain-containing protein 7) Mus musculus (Mouse)
Keratin, type II cytoskeletal 5 (Cytokeratin-5) (CK-5) (Keratin-5) (K5) (Type-II keratin Kb5) Mus musculus (Mouse)
Mannose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.8) (Phosphohexomutase) (Phosphomannose isomerase) (PMI) Mus musculus (Mouse)
Sideroflexin-1 Mus musculus (Mouse)
Dehydrogenase/reductase SDR family member 1 (EC 1.1.-.-) Mus musculus (Mouse)
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial (Alpha-ETF) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome c oxidase subunit 6C (Cytochrome c oxidase polypeptide VIc) Mus musculus (Mouse)
Tetraspanin-31 (Tspan-31) (Sarcoma-amplified sequence homolog) Mus musculus (Mouse)
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1) (Iron-sulfur subunit of complex II) (I _p) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome b-c1 complex subunit 7 Mus musculus (Mouse)
ATP synthase F(0) complex subunit B1, mitochondrial (ATP synthase subunit b) (ATPase subunit b) Mus musculus (Mouse)
ADP-ribosylation factor-like protein 8B (ADP-ribosylation factor-like protein 10C) (Novel small G protein indispensable for equal chromosome segregation 1) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome b5 type B (Cytochrome b5 outer mitochondrial membrane isoform) Mus musculus (Mouse)
Mitochondrial genome maintenance exonuclease 1 (EC 3.1.-.-) Mus musculus (Mouse)
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] cytochrome b small subunit, mitochondrial (CybS) (CII-4) (QPs3) (Succinate dehydrogenase complex subunit D) (Succinate-ubiquinone oxidoreductase cytochrome b small subunit) (Succinate-ubiquinone reductase membrane anchor subunit) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial (Complex III subunit 1) (Core protein I) (Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 1) Mus musculus (Mouse)
Transmembrane protein 33 Mus musculus (Mouse)
Mitochondrial import receptor subunit TOM70 (Mitochondrial precursor proteins import receptor) (Translocase of outer membrane 70 kDa subunit) (Translocase of outer mitochondrial membrane protein 70) Mus musculus (Mouse)
Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13 Mus musculus (Mouse)
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHE1-B) (EC 1.2.4.1) Mus musculus (Mouse)
Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial (Complex III subunit 4) (Complex III subunit IV) (Cytochrome b-c1 complex subunit 4) (Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex cytochrome c1 subunit) (Cytochrome c-1) Mus musculus (Mouse)
Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 (21 kDa transmembrane-trafficking protein) (Transmembrane protein Tmp21) (p24 family protein delta-1) (p24delta1) Mus musculus (Mouse)
ATP synthase subunit delta, mitochondrial (F-ATPase delta subunit) Mus musculus (Mouse)
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial (EC 1.1.1.41) (Isocitric dehydrogenase subunit alpha) (NAD ⁺ -specific ICDH subunit alpha) Mus musculus (Mouse)
Nucleophosmin Mus musculus (Mouse)
Alpha-soluble NSF attachment protein (SNAP-alpha) (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein alpha) Mus musculus (Mouse)
ATP synthase subunit O, mitochondrial (Oligomycin sensitivity conferral protein) (OSCP) Mus musculus (Mouse)
NADH-cytochrome b5 reductase 1 (b5R.1) (EC 1.6.2.2) (NAD(P)H:quinone oxidoreductase type 3 polypeptide A2) Mus musculus (Mouse)
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial (EC 1.6.5.3) (EC 1.6.99.3) (Complex I-30kD) (CI-30kD) (NADH-ubiquinone oxidoreductase 30 kDa subunit) Mus musculus (Mouse)
Amino acid transporter Mus musculus (Mouse)
ATP-binding cassette sub-family B member 10, mitochondrial (ABC-mitochondrial erythroid protein) (ABC-me protein) (ATP-binding cassette transporter 10) (ABC transporter 10 protein) Mus musculus (Mouse)
PRA1 family protein 2 Mus musculus (Mouse)
Sphingomyelin phosphodiesterase 3 (EC 3.1.4.12) (Neutral sphingomyelinase 2) (nSMase-2) (nSMase2) (Neutral sphingomyelinase II) Mus musculus (Mouse)
Tetraspanin-3 (Tspan-3) (OSP-associated protein 1) (OAP-1) (Tetraspanin TM4-A) (Transmembrane 4 superfamily member 8)

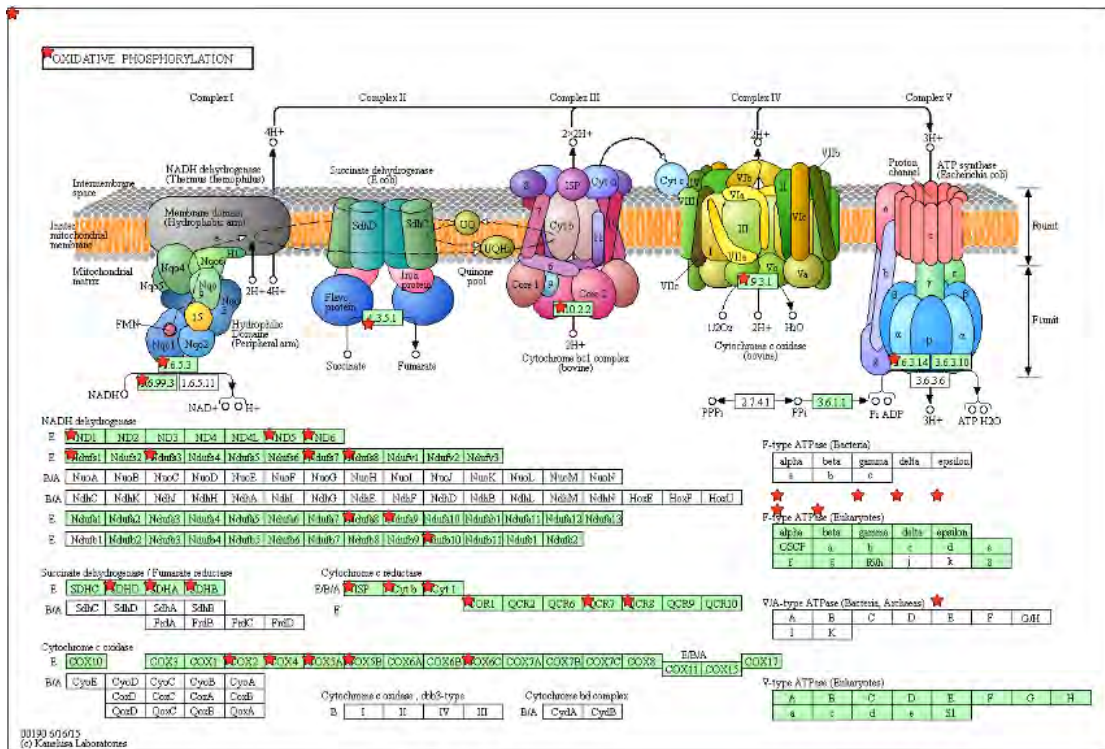
Mus musculus (Mouse)
Ubiquilin-2 (Chap1) (DSK2 homolog) (Protein linking IAP with cytoskeleton 2) (PLIC-2) (Ubiquitin-like product Chap1/Dsk2) Mus musculus (Mouse)
Retinol dehydrogenase 11 (UBE-1b) Mus musculus (Mouse)
Large neutral amino acids transporter small subunit 1 (4F2 light chain) (4F2 LC) (4F2LC) (L-type amino acid transporter 1) (Solute carrier family 7 member 5) Mus musculus (Mouse)
MCG124046 (Protease, serine, 1 (Trypsin 1)) (Protein Prss1) (Trypsinogen 16) Mus musculus (Mouse)
Protein Gm11214 (Fragment) Mus musculus (Mouse)

Γενικά, η τελική πληροφορία για τα μονοπάτια στα οποία άμεσα ή έμμεσα εμπλέκεται ο ERβ, προκύπτει από την ανάλυση του συνόλου των μορίων τόσο από το πρώτο, όσο κι από το δεύτερο πείραμα. Έτσι, λοιπόν έπειτα από επεξεργασία των παραπάνω με τη χρήση του προγράμματος DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis, τα μόρια που ανοσοκατακρημνίστηκαν, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στα εξής μονοπάτια ως προς τη βιολογική τους δράση:

Οξειδωτική φωσφορυλίωση

- ATP synthase, H⁺ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit
- ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1; predicted gene 12231
- ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit
- ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1
- ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A1
- ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V1 subunit E1
- Cytochrome b
- Cytochrome c oxidase subunit 2
- NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8
- NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9
- NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10
- NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1
- NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7
- NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8
- NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2
- NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1
- cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1
- cytochrome c oxidase, subunit Va
- cytochrome c-1
- predicted gene 2962; ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein
- predicted gene 2972; ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1F0 complex, subunit e
- predicted gene 5436; similar to ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit; ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit
- predicted gene 6265; similar to cytochrome c oxidase, subunit VIc; cytochrome c oxidase, subunit VIc
- similar to NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3; NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3; predicted gene 12251
- similar to Unknown (protein for IMAGE:4910858); predicted gene 4076

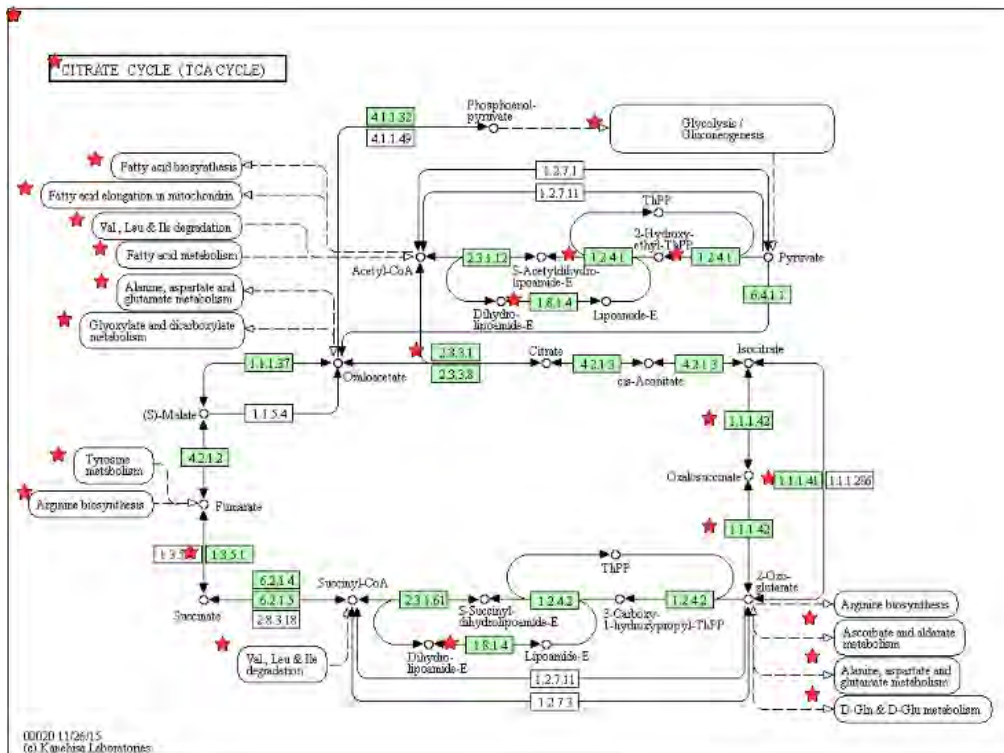
- similar to cytochrome c oxidase, subunit Vb; predicted gene 11273; cytochrome c oxidase, subunit Vb
- succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
- succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip); similar to succinate dehydrogenase Ip subunit
- succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein
- ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1
- ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1
- ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII



Εικόνα 17. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση και τα σημεία δράσης των ανιχνευθέντων αλληλεπιδρώντων μορίων με τη μιτοχονδριακή μορφή του ERβ

Κύκλος Κιτρικού οξέος (TCA)

- citrate synthase
- dihydrolipoamide dehydrogenase
- isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial
- isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha
- isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta
- predicted gene 6123; pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
- pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1
- succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
- succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip); similar to succinate dehydrogenase Ip subunit
- succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein



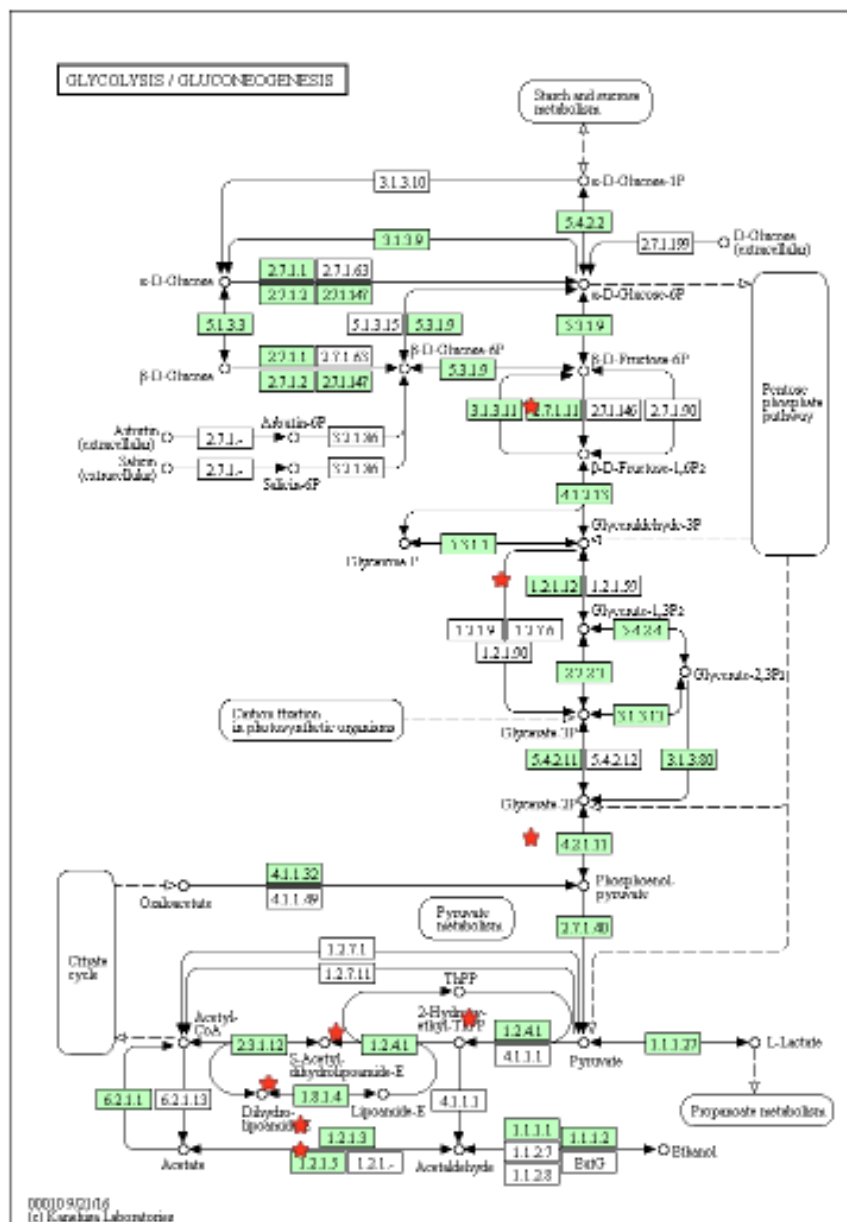
Εικόνα 18. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος και τα σημεία δράσης των ανιχνευθέντων αλληλεπιδρώντων μορίων με τη μιτοχονδριακή μορφή του ERβ

Γλυκόλυση/Γλυκονεογένεση

- aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1
- aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1
- aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2
- dihydrolipoamide dehydrogenase
- phosphofructokinase, platelet
- predicted gene 4691; predicted gene 6944; predicted gene 10290; predicted gene 10566; predicted gene 10291; predicted gene 3200; predicted gene 12070; predicted gene 7286; predicted gene 6946; predicted gene 8825; predicted gene 9081; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; predicted gene 10359; predicted gene 10358; predicted gene 7784; predicted gene 12416; predicted gene 14148; predicted gene 13882; predicted gene 4217; predicted gene 7183; predicted gene 10313; predicted gene 2467; predicted gene 5787; predicted gene 2193; predicted gene 13292; predicted gene, 380687; predicted gene 2076; predicted gene 3222; predicted gene 7507; predicted gene 7293; predicted gene 15191; predicted gene, 674324; predicted gene 10284; predicted gene 8055; similar to hCG1978856; predicted gene 2574; similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; predicted gene 7545; predicted gene 12033; predicted gene 3272; predicted gene 3534; predicted gene 2308; predicted gene 3839; predicted gene 9061; predicted gene 3671; predicted gene 8513; predicted gene 4654; predicted gene 12537; predicted gene 4929; predicted gene 5652; predicted gene 9568; predicted gene 8349; predicted gene 2546; predicted gene 7129; similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH); predicted

gene 8318; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase pseudogene; predicted gene 7611; predicted gene 2445; predicted gene 6283; predicted gene 11557; predicted gene 4335; predicted gene 9127; predicted gene 3695; predicted gene 5507; predicted gene 8174; predicted gene 4609; predicted gene 3809; predicted gene 9034; predicted gene 2606; predicted gene 4575; predicted gene 12286; predicted gene 11658; predicted gene 5732; predicted gene 16374; predicted gene 8100; predicted gene 11953; predicted gene, EG545741; predicted gene 2451; predicted gene 14130

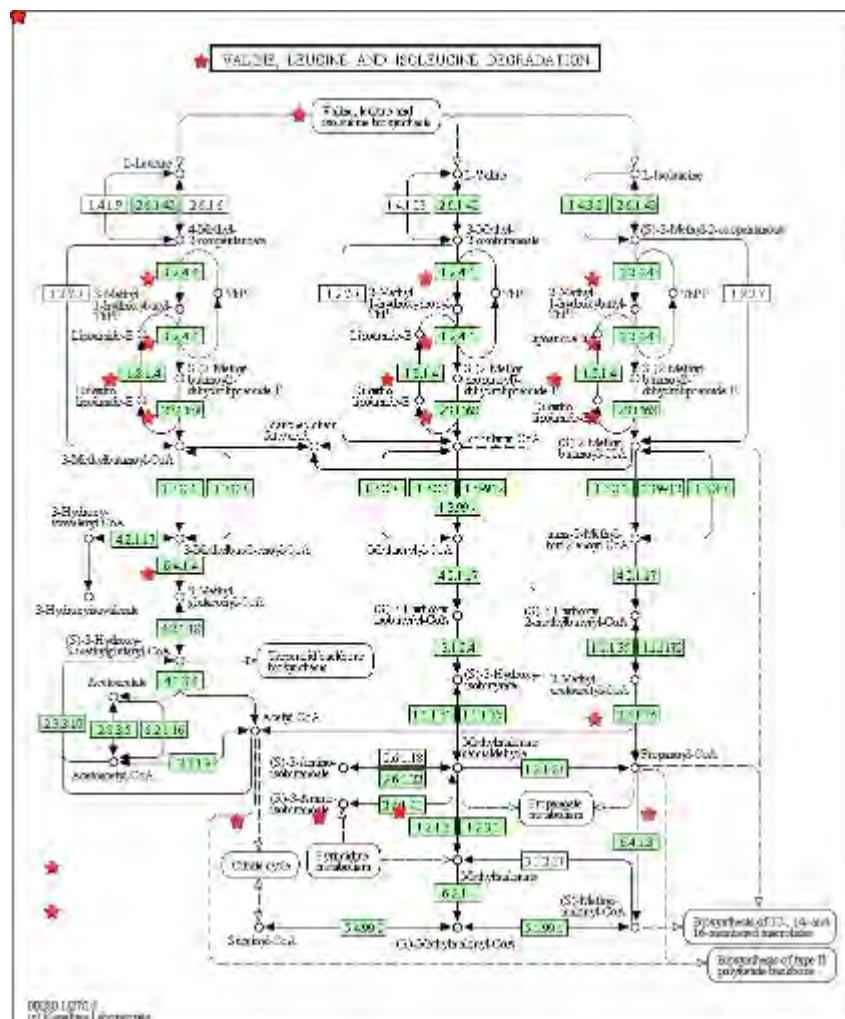
- predicted gene 4735; enolase 1, alpha non-neuron; similar to enolase 1, alpha non-neuron; hypothetical protein LOC100044223; predicted gene 5506; predicted gene 5855; hypothetical protein LOC100045967
- predicted gene 6123; pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
- pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1



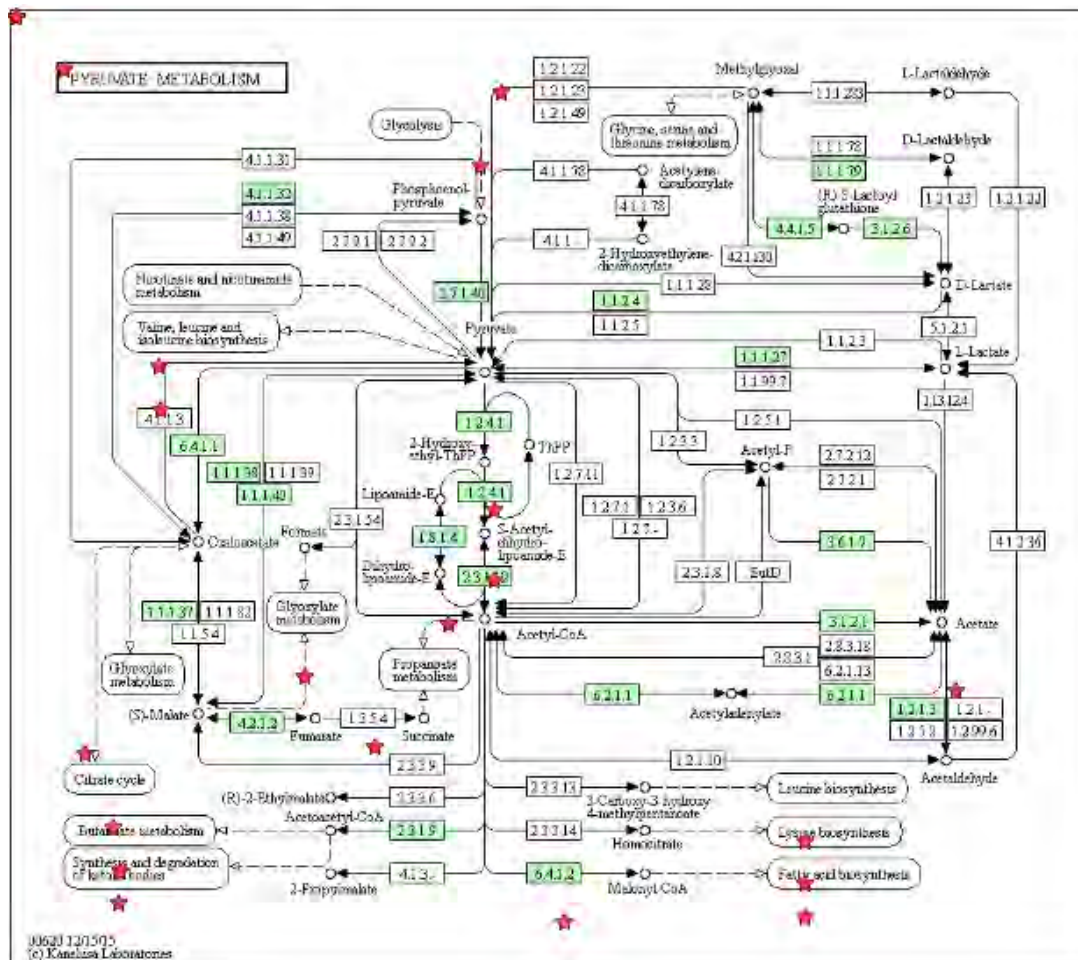
Εικόνα 19. Η πορεία της γλυκόλυσης και της γλυκονεογένεσης με τα σημεία δράσης των των ανιχνευθέντων αλληλεπιδρώντων μορίων με τη μιτοχονδριακή μορφή του ERβ

Αποικοδόμηση βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης

- aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1
- aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2
- branched chain ketoacid dehydrogenase E1, alpha polypeptide
- branched chain ketoacid dehydrogenase E1, beta polypeptide; similar to 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase
- dihydrolipoamide branched chain transacylase E2
- dihydrolipoamide dehydrogenase
- methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 2 (beta)
- predicted gene 13910; similar to Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit; hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit; predicted gene 9108



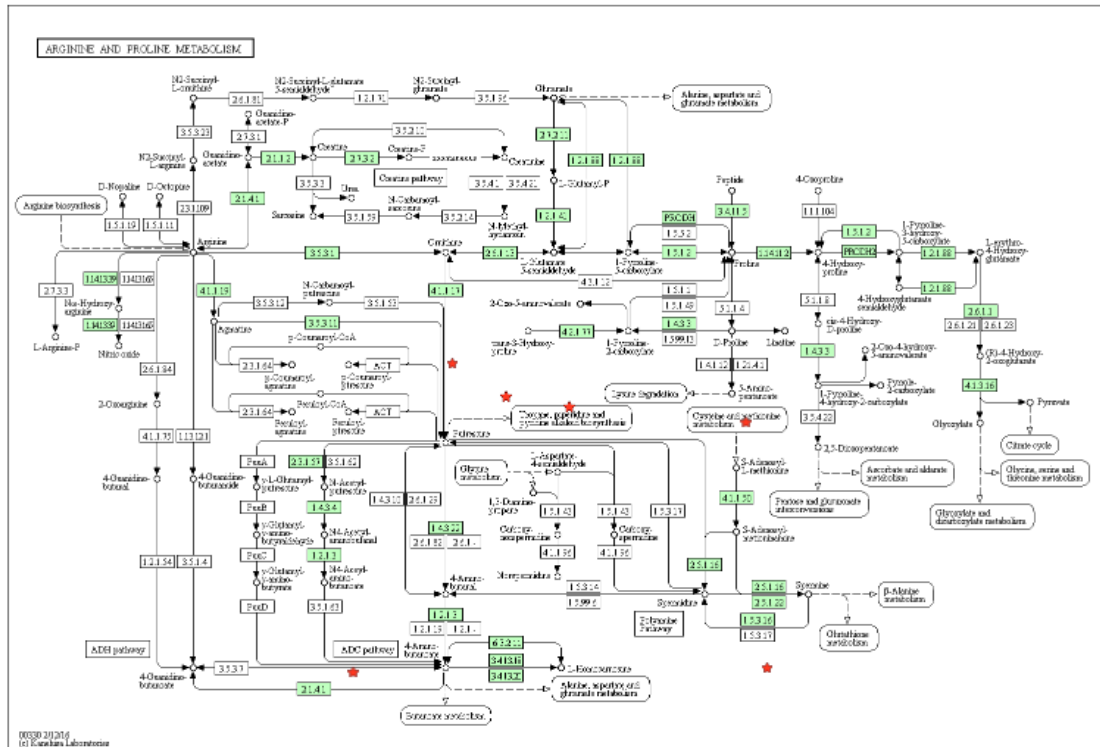
Εικόνα 10. Η αποικοδόμηση των αμινοξέων βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη και τα σημεία δράσης των ανιχνευθέντων αλληλεπιδρώντων μορίων με τη μιτοχondριακή μορφή του ERβ



Εικόνα 11. Ο μεταβολισμός του πυροσταφυλικού οξέος και τα σημεία δράσης των ανιχνευθέντων αλληλεπιδρώντων μορίων με τη μιτοχondριακή μορφή του ERBB

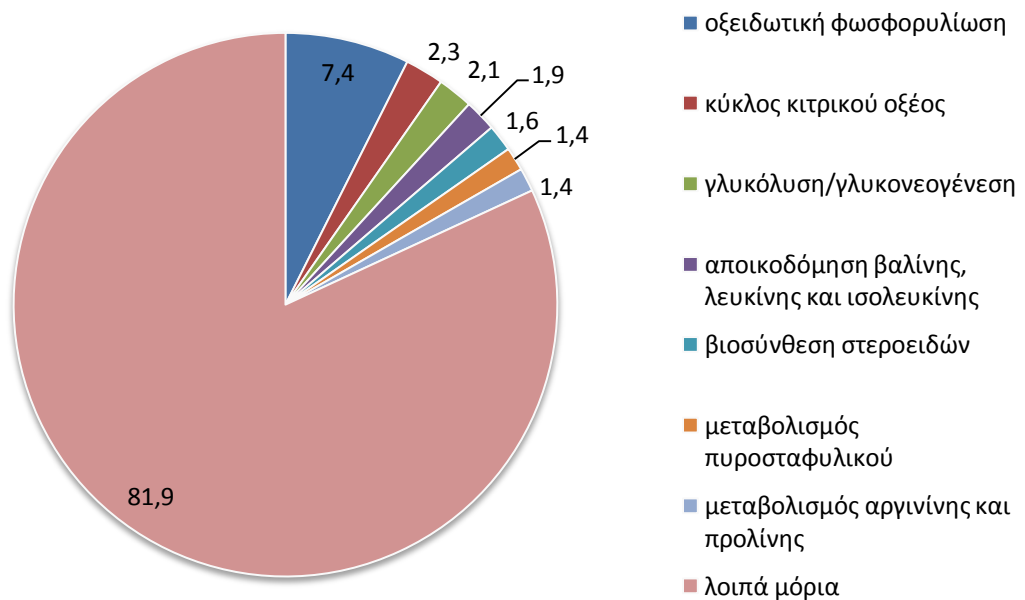
Μεταβολισμός αργινίνης και προλίνης

- aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1
- aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2
- glutamate oxaloacetate transaminase 2, mitochondrial
- procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha II polypeptide
- pyrroline-5-carboxylate reductase 1
- pyrroline-5-carboxylate reductase family, member 2



Εικόνα 12. Ο μεταβολισμός των αμινοξέων αργινίνη και προλίνη και τα σημεία δράσης των ανιχνευθέντων αλληλεπιδρώντων μορίων με τη μιτοχονδριακή μορφή του ERβ

Άρα λοιπόν, σύμφωνα με τα παραπάνω, εάν θέλουμε να μετατρέψουμε τα μόρια σε ποσοστά προκύπτει το παρακάτω γράφημα:



Γράφημα 2. Επί τοις % συσχέτιση των μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν τα μόρια που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τον ERβ

Να σημειωθεί ότι από τα 793 μόρια, το DAVID ταυτοποίησε 437 από αυτά ως προερχόμενα από ποντικό και κατηγοριοποίησε 430. Από την παραπάνω

ανάλυση, φαίνεται πως ο ERβ εμπλέκεται σε πλήθος μεταβολικών μονοπατιών εντός του μιτοχονδρίου. Ωστόσο, τα μόρια που εμφανίζονται κοινά μεταξύ των IP GFP πειράματος 1-IP GFP πειράματος 2 και IP GFP πειράματος 1- IP MCA πειράματος 2, θα μπορούσαμε να πούμε ότι είναι η πιο σίγουρη πληροφορία που έχουμε για τα μονοπάτια που προκύπτουν. Πιο ειδικά, έπειτα από σύγκριση των αποτελεσμάτων του πρώτου πειράματος με τα αποτελέσματα κάθε αντισώματος από το δεύτερο πείραμα, προκύπτει ο εξής πίνακας:

- Πίνακας 4: Άθροισμα κοινών μορίων μεταξύ IP GFP πειράματος 1-IP GFP πειράματος 2 και IP GFP πειράματος 1- IP MCA πειράματος 2

Membrane-associated progesterone receptor component 1
Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase (EC 1.1.1.330) (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 12) (17-beta-HSD 12) (3-ketoacyl-CoA reductase) (KAR) (Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12) (EC 1.1.1.62) (KIK-I)
Ig lambda-1 chain C region
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide IV) (Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1) (COX IV-1)
Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor (CD Man-6-P receptor) (CD-MPR) (46 kDa mannose 6-phosphate receptor) (MPR 46)
Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13 (G alpha-13) (G-protein subunit alpha-13)
Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial (EC 2.3.1.168) (Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex component E2) (BCKAD-E2) (BCKADE2) (Dihydrolipoamide acetyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex) (Dihydrolipoamide branched chain transacylase) (Dihydrolipoamide branched chain transacylase)
Ras-related protein Rab-8A (Oncogene c-mel)
ATP synthase subunit e, mitochondrial (ATPase subunit e)
Apoptosis regulator BAX
B-cell receptor-associated protein 31 (BCR-associated protein 31) (Bap31) (p28)
Integrin alpha-6 (CD49 antigen-like family member F) (VLA-6) (CD antigen CD49f) [Cleaved into: Integrin alpha-6 heavy chain; Integrin alpha-6 light chain]
Prostaglandin E synthase 2 (EC 5.3.99.3) (GATE-binding factor 1) (GBF-1) (Microsomal prostaglandin E synthase 2) (mPGES-2) [Cleaved into: Prostaglandin E synthase 2 truncated form]
Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (Amino acid transporter A2) (Solute carrier family 38 member 2) (System A amino acid transporter 2) (System A transporter 1) (System N amino acid transporter 2)
Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial (Complex III subunit 4) (Complex III subunit IV) (Cytochrome b-c1 complex subunit 4) (Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex cytochrome c1 subunit) (Cytochrome c-1)
Epoxide hydrolase 1 (EC 3.3.2.9) (Epoxide hydratase) (Microsomal epoxide hydrolase)
Sphingomyelin phosphodiesterase 3 (EC 3.1.4.12) (Neutral sphingomyelinase 2) (nSMase-2) (nSMase2) (Neutral sphingomyelinase II)
Protein Iglv1 (Fragment)
Regulator complex protein LAMTOR1
Neural cell adhesion molecule 1 γενικά ρόλο στην ανάπτυξη, προσκολληση, συναψεις κλπ
Annexin (Fragment)
NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10 (Fragment)
Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 (Fragment)
Protein Gm10073
Hydroperoxide isomerase ALOXE3
Tubulin alpha-1B chain (Alpha-tubulin 2) (Alpha-tubulin isotype M-alpha-2) (Tubulin alpha-2 chain)
MLV-related proviral Env polyprotein [Cleaved into: Surface protein (SU); Transmembrane protein (TM)]
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide Va)
Ras-related protein Rab-21 (Rab-12)
Low-density lipoprotein receptor (LDL receptor)
CD9 antigen (CD antigen CD9)
Protein yippe-like 5
Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 (Transducin beta chain 1)
Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)

Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) (Cellubrevin) (CEB) (Synaptobrevin-3)
Secretory carrier-associated membrane protein 1
Death-associated protein kinase 1 (DAP kinase 1) (EC 2.7.11.1)
Protein dispatched homolog 2
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial (EC 1.1.1.41)
CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1 (MitoNEET)
Protein disulfide-isomerase A6 (EC 5.3.4.1) (Thioredoxin domain-containing protein 7)
Cytochrome b-c1 complex subunit 7
ADP-ribosylation factor-like protein 8B (ADP-ribosylation factor-like protein 10C) (Novel small G protein indispensable for equal chromosome segregation 1)
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHE1-B) (EC 1.2.4.1)
Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 (21 kDa transmembrane-trafficking protein) (Transmembrane protein Tmp21) (p24 family protein delta-1) (p24delta1)
ATP synthase subunit delta, mitochondrial (F-ATPase delta subunit)
PRA1 family protein 2
Tetraspanin-3 (Tspan-3) (OSP-associated protein 1) (OAP-1) (Tetraspanin TM4-A) (Transmembrane 4 superfamily member 8)
Retinol dehydrogenase 11 (UBE-1b)
Protein Gm11214 (Fragment)

Έπειτα από κατηγοριοποίηση των μορίων του παραπάνω πίνακα, χωρίς όμως τη χρήση προγραμμάτων, προκύπτουν αρκετά μονοπάτια, που αφορούν την προσκόλληση κυττάρων, την ανάπτυξη συνάψεων, τη μεταφορά κυστιδίων, τη ρύθμιση της δραστηριότητας κινασών, αλληλεπιδράσεις με G πρωτεΐνες ή και ενεργοποιητές αυτών, αλλά και μονοπάτια που σχετίζονται πιο άμεσα με μεταβολικές διεργασίες, όπως:

Οξειδωτική φωσφορυλίωση

- ATP synthase subunit delta, mitochondrial (F-ATPase delta subunit)
- ATP synthase subunit e, mitochondrial (ATPase subunit e)
- Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide IV) (Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1) (COX IV-1)
- Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide Va)
- Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial (Complex III subunit 4) (Complex III subunit IV) (Cytochrome b-c1 complex subunit 4) (Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex cytochrome c1 subunit) (Cytochrome c-1)
- NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10 (Fragment)
- Cytochrome b-c1 complex subunit 7
- CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 1 (MitoNEET)

Γλυκόλυση

- Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial (PDHE1-B) (EC 1.2.4.1)

Κύκλος κιτρικού οξέος

- Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial (EC 1.1.1.41)

Βιοσύνθεση οιστρογόνων

- Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase (EC 1.1.1.330) (17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 12) (17-beta-HSD 12) (3-ketoacyl-CoA reductase) (KAR) (Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12) (EC 1.1.1.62) (KIK-I)

Ρυθμιστικά μόρια δράσεων των λιπαρών οξέων

- Sphingomyelin phosphodiesterase 3 (EC 3.1.4.12) (Neutral sphingomyelinase 2) (nSMase-2) (nSMase2) (Neutral sphingomyelinase II)
- Hydroperoxide isomerase ALOXE3
- Annexin (Fragment)

Απόπτωση

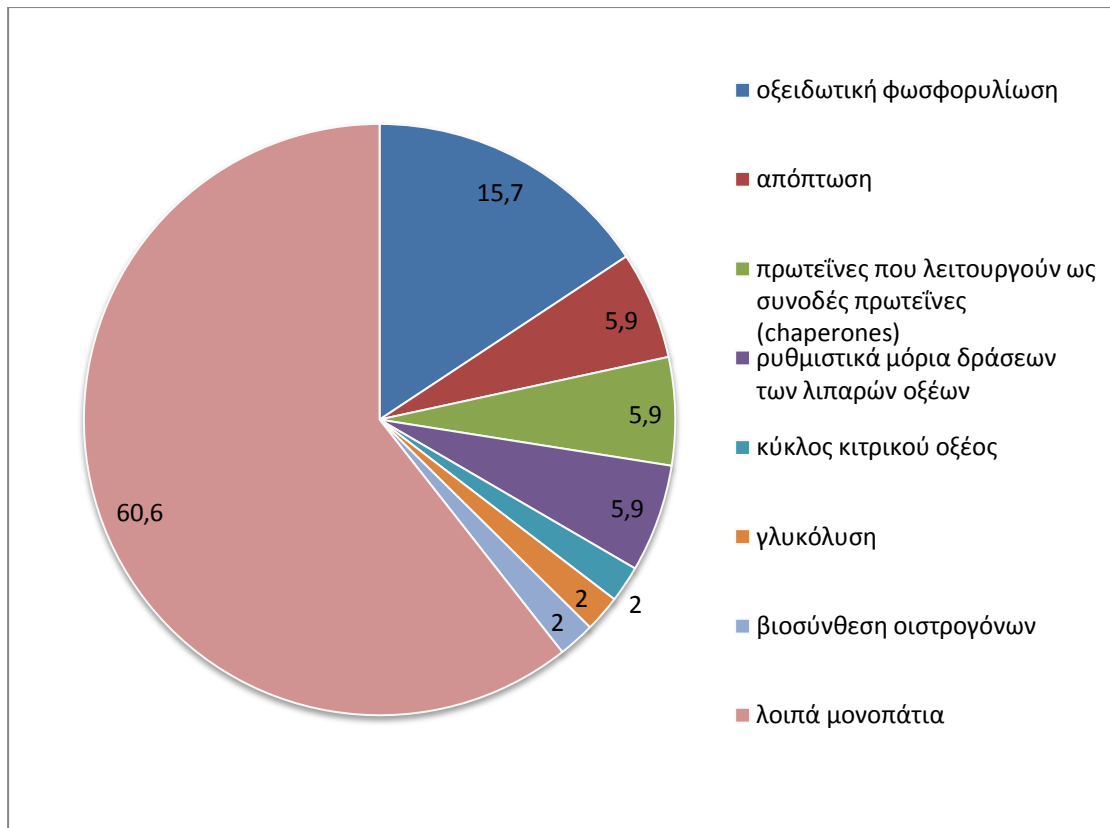
- [Apoptosis regulator BAX](#)
- Death-associated protein kinase 1 (DAP kinase 1) (EC 2.7.11.1)
- PRA1 family protein 2 (έμμεσα στην απόπτωση)

Πρωτεΐνες που λειτουργούν ως συνοδές πρωτεΐνες (chaperones)

- B-cell receptor-associated protein 31 (BCR-associated protein 31) (Bap31) (p28)
- Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)
- Protein disulfide-isomerase A6 (EC 5.3.4.1) (Thioredoxin domain-containing protein 7)

Φαίνεται λοιπόν, από τα παραπάνω ότι ο ERβ εντός του μιτοχονδρίου αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με μόρια που είναι σημαντικά για τη ρύθμιση της φυσιολογίας του κυττάρου. Τέτοιες βιοχημικές διεργασίες είναι η ρύθμιση του μεταβολισμού υδατανθράκων και αμινοξέων, η παραγωγή ενέργειας, η άμεση ή έμμεση ρύθμιση αποπτωτικών μηχανισμών κάτι που είναι ήδη γνωστό κι επιβεβαιωμένο από τη βιβλιογραφία, καθώς και μηχανισμοί εισόδου πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο και βιοσύνθεσης των οιστρογόνων, πιθανότατα για ενίσχυση της άμεσης δράσης του, σαν θετική ανατροφοδότηση. Τα μόρια που σημειώνονται με κόκκινο, εντοπίζονται και στα μονοπάτια που σχετίζονται με την παθολογία νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, όπως Parkinson, Alzheimer, Huntington, ενώ με μπλε συμμετέχουν μόνο στα μονοπάτια που αφορούν την Huntington. Γίνεται λοιπόν σαφές ότι ο ERβ εντός του μιτοχονδρίου μέσω των άμεσων ή έμμεσων αλληλεπιδράσεων του με πλήθος διαφορετικών μορίων, πιθανόν να εμπλέκεται στη ρύθμιση βιοχημικών οδών που σχετίζονται με την εμφάνιση νευροεκφυλιστικών νοσημάτων.

Εάν θέλουμε να μεταφράσουμε τις παραπάνω παρατηρήσεις σε συσχέτιση επί τοις %, προκύπτει το γράφημα 3:



Γράφημα 3. Επί τοις % συσχέτιση των βιοχημικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν τα μόρια που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τον ERβ στο μιτοχονδριακό περιβάλλον έπειτα από διατήρηση μόνο των κοινών μορίων μεταξύ των 2 πειραμάτων

5. Συμπεράσματα

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs) είναι υποδοχείς στεροειδών ορμονών με δράση μεταγραφικών παραγόντων που ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Επηρεάζουν πολλές φυσιολογικές λειτουργίες στα θηλαστικά, με κυριότερες, αλλά χωρίς να περιορίζονται σε αυτές, την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη των οργάνων, τη διαμόρφωση των οστών, την υγεία του καρδιαγγειακού συστήματος, τη γνώση, καθώς και τη συμπεριφορά και στα δύο φύλα. Προσδέτης τους είναι τα οιστρογόνα, με το πιο δραστικό οιστρογόνο που παράγεται στον οργανισμό να είναι η 17β- οιστραδιόλη (Lee et al, 2012). Διακρίνονται σε δύο μορφές, τον ERα και ERβ, που παρουσιάζουν ένα διαφορετικό μοτίβο κατανομής στους ιστούς, αλλά και διαφορετικά αποτελέσματα στην κυτταρική λειτουργία έπειτα από την ενεργοποίησή τους (Lee et al, 2012; Hall et al, 2001; Zhao et al, 2008). Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον όλο και περισσότερων ερευνητών επικεντρώνεται στις δράσεις του ERβ στο μιτοχόνδριο, έπειτα από μελέτες που έδειξαν παρουσία του στα οργανίδια αυτά (Solakidi et al 2006; Chen et al 2009; Yang et al, 2004). Τα μιτοχόνδρια είναι ζωτικά οργανίδια για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο, καθώς και για την επιβίωσή του. Παρέχουν περισσότερο από το 90% της απαιτούμενης ενέργειας για το κύτταρο μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αλλά πέραν αυτού εμπλέκονται και σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή της ουρίας, στη βιοσύνθεση της αίμης, καθώς και στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια αποτελούν κομβικά σημεία ελέγχου της απόκρισης του κυττάρου σε καταστάσεις στρες, παίζουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, στην κυτταρική διαφοροποίηση και τη γήρανση. Φέρουν το δικό τους γονιδίωμα, που όμως κωδικοποιεί για ένα πολύ μικρό μέρος των πρωτεϊνών που συνολικά εντοπίζονται εντός αυτών. Για το λόγο αυτό, η λειτουργικότητά τους βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην εύρυθμη συνεργασία τους με τον πυρήνα, για τη σύνθεση και είσοδο των απαραίτητων μορίων που φέρουν ρόλους-κλειδιά για την ομαλή έκβαση του πλήθους των μεταβολικών και μη μονοπατιών που πραγματοποιούνται μερικώς ή κατ' εξοχήν στα μιτοχόνδρια. Ο ERβ μέσω της πυρηνικής δράσης του επηρεάζει τα επίπεδα μεταγραφής ρυθμιστών των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων με μιτοχονδριακή δράση ή τα επίπεδα μεταγραφής των κωδικοποιούμενων από τον πυρήνα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση (Klinge, 2008; Simpkins et al, 2008). Παρόλα αυτά, μελέτες υποδεικνύουν πως ο ERβ πιθανόν να ασκεί και πιο άμεσες επιδράσεις στα μιτοχόνδρια, μέσω της εισόδου του εντός αυτών, που αφορούν στην κυτταρική επιβίωση σε καταστάσεις στρες, στο ρυθμό και έλεγχο της μεταγραφής των μιτοχονδριακών γονιδίων, στην παραγωγή ενέργειας κλπ (Chen et al. 2009; Psarra & Sekeris, 2008; Liao et al, 2015).

Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε κατά πόσο ο ενδογενής μιτοχονδριακός ERβ ελέγχει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή, επηρεάζοντας τα

επίπεδα έκφρασης των μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων υπομονάδων των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, μετά την ενεργοποίησή του από την οιστραδιόλη. Για το λόγο αυτό, κύτταρα της σειράς N2a mtGFP καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες αναστολής της πυρηνικής μεταγραφής (παρουσία α-αμανιτίνης) υπό την απουσία (control) ή την παρουσία της οιστραδιόλης. Στα κύτταρα αυτά, έγινε έλεγχος των επιπέδων mRNA 5 μιτοχονδριακών γονιδίων κι ενός πυρηνικού με εφαρμογή της μεθόδου Real Time PCR. Γνωρίζοντας ότι η αμανιτίνη αποτελεί ειδικό αναστολέα της πυρηνικής RNA πολυμεράσης II (Gong et al, 2004), άρα και μεταγραφής, οποιαδήποτε παρατηρούμενη επαγωγή στην παραγωγή μιτοχονδριακών mRNA, υπό τη δράση της οιστραδιόλης αποδίδεται στην απ' ευθείας ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής μεταγραφής. Από τα 5 μιτοχονδριακά μόρια που εξετάστηκαν, τα επίπεδα mRNA των ATP6 και 16s rRNA παρουσία αμανιτίνης και οιστραδιόλης παρουσιάζουν αύξηση κατά 2,5 - 3 φορές έκαστο σε σχέση με τα επίπεδα αυτών παρουσία αμανιτίνης και απουσία οιστραδιόλης, που στην προκειμένη περίπτωση θεωρούνται ως control. Παρουσία α-αμανιτίνης και οιστραδιόλης, ο ενεργοποιημένος ERβ δεν μπορεί να ασκήσει την πυρηνική του δράση, όπως προαναφέρθηκε κάτι που επαληθεύεται από τη μη ενεργοποίηση της μεταγραφής του πυρηνικά κωδικοποιούμενου μορίου COXIV, παρουσία οιστραδιόλης σε κύτταρα που έχουν κατεργαστεί με α-αμανιτίνη. Έτσι, σύμφωνα με τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι οι διαφορές που παρατηρούνται στα επίπεδα mRNA των μιτοχονδριακών αυτών μορίων μεταξύ των 2 διαφορετικών συνθηκών καλλιέργειας, πιθανόν να οφείλονται στην ενεργοποίηση και δράση του ERβ στο μιτοχόνδριο.

Πιο ειδικά, το γονίδιο ATP 6 κωδικοποιεί για μια υπομονάδα του πρωτεϊνικού συμπλόκου της ATP συνθάσης, ενώ το γονίδιο για το 16s rRNA κωδικοποιεί για το 16s RNA που αποτελεί συστατικό της 39s ριβοσωμικής μιτοχονδριακής υπομονάδας. Βλέπουμε λοιπόν ότι έχουμε ένα μόριο συστατικό της μηχανής παραγωγής ATP κι ένα μόριο συστατικό της μηχανής πρωτεϊνοσύνθεσης. Αυτή η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων mRNA τους, ίσως να υποδεικνύει εμπλοκή του υποδοχέα στο μηχανισμό μεταγραφής τους, ώστε το μιτοχόνδριο να αρχίσει να παράγει περισσότερη ενέργεια και να αυξήσει το ρυθμό της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Παρόλα αυτά, τα παραπάνω αποτελούν πρωταρχικές παρατηρήσεις κι απαιτείται επανάληψη και εκτεταμένη μελέτη σε κυτταρικές σειρές N2a mtGFPERβ, παρουσία ή απουσία οιστραδιόλης σε σχέση με control κύτταρα N2a mtGFP (στα πλαίσια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής του κυρίου Βύρωνα Γοργογιέτα). Τα κύτταρα της σειράς N2a mtGFPERβ υπερεκφράζουν σταθερά την βήτα μορφή του υποδοχέα με μιτοχονδριακή στόχευση, επομένως μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης του μιτοχονδριακού mRNA των 2 αυτών κυτταρικών σειρών παρουσία ίδιων συνθηκών θα μας οδηγήσουν στην επιβεβαίωση και διαλεύκανση των μηχανισμών της απ' ευθείας ρύθμισης της

μιτοχονδριακής μεταγραφής από τα οιστρογόνα μέσω του αντίστοιχου υποδοχέα τους στο μιτοχονδριακό περιβάλλον.

Έπειτα, με τη χρήση ανοσοκατακρήμνισης και πρωτεομικής ανάλυσης, έγινε χαρακτηρισμός των μορίων που άμεσα ή έμμεσα αλληλεπιδρούν με τον ERβ, ώστε να διαπιστωθεί σε ποια μονοπάτια είναι πιθανό να συμμετέχει εντός του μιτοχονδρίου. Αυτό επιτεύχθηκε με τη χρήση της κυτταρικής σειράς N2a mtGFPERβ που όπως προαναφέρθηκε υπερεκφράζει σταθερά τη βήτα μορφή του υποδοχέα σε σύζευξη με τη GFP πρωτεΐνη με μιτοχονδριακή στόχευση. Πραγματοποιήθηκαν 2 πειράματα. Στο πρώτο πείραμα η ανοσοκατακρήμνιση του πρωτεϊνικού συμπλόκου mtGFPERβ αλληλεπιδρώντων μορίων επιτεύχθηκε με χρήση αντισώματος έναντι της GFP πρωτεΐνης από μιτοχονδριακό κλάσμα προερχόμενο από κύτταρα της σειράς N2a mtGFPERβ. Ως δείγμα αναφοράς (control) χρησιμοποιήθηκε το ανοσοκατακρημνισθέν σύμπλοκο με χρήση αντισωμάτων από μη ανοσοποιημένο ζώο (IgG), από μιτοχονδριακό εκχύλισμα της ίδιας κυτταρικής σειράς. Στο δεύτερο, για την ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν δύο αντισώματα, ένα έναντι της GFP πρωτεΐνης, και ένα έναντι του ERβ. Ως κυτταρικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε παρασκεύασμα μιτοχονδρίων τόσο από N2a mtGFP όσο και από N2a mtGFPERβ κύτταρα. Η πληροφορία που παρουσιάζεται στην συνέχεια προκύπτει από το σύνολο των μορίων που αναγνωρίστηκαν με MS και από τα δύο πειράματα. Είδαμε λοιπόν, ότι ο ERβ μπορεί και αλληλεπιδρά με μόρια που συμμετέχουν σε σημαντικά μεταβολικά μονοπάτια, όπως στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, στον κύκλο του κιτρικού οξέος, στη γλυκόλυση ή τη γλυκονεογένεση, στο μεταβολισμό αμινοξέων και του πυροσταφυλικού. Τα μονοπάτια αυτά είναι αλληλένδετα και εξαρτώνται το ένα από το άλλο σε μεγάλο βαθμό. Πιο ειδικά, οι ανθρακικοί σκελετοί από την αποικοδόμηση των αμινοξέων ή των υδατανθράκων εισέρχονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος, που αποτελεί κομβικό μεταβολικό σημείο του κυττάρου, υπό τη μορφή ακέτυλο-CoA, και κατά τον κύκλο αυτό παράγεται σημαντικό ποσοστό NADH και FADH₂, μόρια που αξιοποιούνται στην παραγωγή ενέργειας μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, διότι το κάθε ένα περιέχει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων με υψηλό δυναμικό μεταφοράς. Ειδικότερα τα μόρια αυτά εισέρχονται στην αναπνευστική αλυσίδα προς παραγωγή ATP με τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων το O₂. Έτσι λοιπόν, ο ERβ μέσω αλληλεπίδρασής του με μόρια αυτών των μονοπατιών φαίνεται να έχει τη δυνατότητα ρύθμισης της παραγωγής ATP στο κύτταρο σε πολλά σημεία, επιδρώντας είτε ενισχυτικά είτε ανασταλτικά, κάτι που επιβεβαιώνεται κι από τη βιβλιογραφία για τους ρόλους του ERβ εντός του μιτοχονδρίου (Liao et al, 2015).

Ωστόσο, τα μόρια που εμφανίζονται κοινά μεταξύ του πρώτου πειράματος σε σύγκριση με τα μόρια που προέρχονται από κάθε αντίσωμα του δεύτερου πειράματος ξεχωριστά, αποτελούν την πιο αξιόπιστη πληροφορία, καθώς εμφανίζουν επαναληψιμότητα. Έπειτα από επεξεργασία αυτών των κοινών μορίων, μπορούμε να τα κατατάξουμε στα εξής μονοπάτια: οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, κύκλου κιτρικού οξέος, γλυκόλυσης, βιοσύνθεσης

οιστρογόνων, μόρια-ρυθμιστές της δράσης των λιπαρών οξέων, αλλά και σε μονοπάτια που δεν χαρακτηρίζονται ως μεταβολικά, όπως η απόπτωση ή η αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες που λειτουργούν ως συνοδές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην μετακίνηση και μεταφορά μορίων στο μιτοχόνδριο. Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τις συνοδές πρωτεΐνες (πρωτεΐνες θερμικού σοκ) ρίχνει φως στους μηχανισμούς εισόδου του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια.

Άρα λοιπόν, η συμμετοχή του στα μονοπάτια που καταλήγουν σε παραγωγή ενέργειας επιβεβαιώνεται και από τα δύο πειράματα, ενώ η αλληλεπίδρασή του με μόρια που συμμετέχουν στη σύνθεση των οιστρογόνων, πιθανότατα να συντελεί στην ενίσχυση της δράσης του, μέσω της απ' ευθείας ρύθμισής τους στο μιτοχονδριακό περιβάλλον είτε σαν θετική ανατροφοδότηση. Για το ρόλο του στην απόπτωση και μάλιστα στην αναστολή της υπάρχουν ενδείξεις στη βιβλιογραφία (Liao et al, 2015; Simpkins et al, 2008). Ακόμη, η πλειοψηφία των μορίων που εντάχθηκαν στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αποτελούν μόρια που σχετίζονται με την παθογένεια νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, όπως Parkinson, Alzheimer και Huntington, κάτι που ίσως να προμηνύει παρεμβολή του ERβ στην εμφάνιση ή προστασία από νευροεκφυλιστικά νοσήματα. Ίσως μελλοντικά, έπειτα από εκτενέστερη αποσαφήνιση της λειτουργίας του στα μιτοχόνδρια, να μπορέσει να αξιοποιηθεί ως στόχος για την πρόληψη τέτοιων νοσημάτων.

6. Βιβλιογραφία

1. Olefsky J, (2001) Nuclear Receptor Minireview Series, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 40, 36863–36864
2. Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V, (2003) The nuclear receptor superfamily, *Journal of Cell Science*, 116, 585-586
3. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V (2006) Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors, *Pharmacological Reviews*, Vol. 58, No. 4, 685-704
4. Sever R, Glass C, (2013) Signaling by Nuclear Receptors, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 3;5:a016709
5. Gupta N, Mayer D, (2013) Interaction of JAK with steroid receptor function, *Landes Bioscience*, JAK-STAT 2:4, e24911
6. Beato M, Klug J, (2000) Steroid Hormone Receptors: An Update, *Human Reproduction*, Vol. 6, No. 3, 225-236
7. Kuiper, Enmark E, Pelto Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J A, (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 93, pp:5925–5930
8. Lee Hye-Rim , Kim Tae-Hee, Choi Kyung-Chul, (2012) Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse, *Laboratory Animal Research*, 28, 71-76
9. Deroo Bonnie J, Korach Kenneth S, (2006) Estrogen receptors and human disease, *The Journal of Clinical Investigation*, 116, 561-570
10. Hall Julie M., Couse John F., Korach Kenneth S., (2001) The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 40, 36869–36872
11. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartaman J, Tugague M, Ström A, Treutter E, Warner M, Gustafsson J, (2007) Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets, *Physiology Reviews*, 87: 905–931
12. Zhao C , Dahlman-Wright K, Gustafsson, (2008) Estrogen receptor β : an overview and update, *Nuclear Receptor Signaling*, 6, e003
13. Björnström L, Sjöberg M, (2005) Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes, *Molecular Endocrinology*, Vol. 19,833–842
14. Deroo Bonnie J, Buensuceso Adrian V , (2010) Minireview: Estrogen Receptor β : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9):1703–1714
15. Yang Shao-Hua, Liu Ran, Perez Evelyn J., Wen Yi, Stevens Stanley M. Jr, Valencia Thomas, Brun-Zinkernagel Anne-Marie, Prokai Laszlo, Will Yvonne, Dykens James, Koulen Peter, Simpkins James W. (2004) Mitochondrial localization of estrogen receptor β , *PNAS*, Vol. 101, No. 12, 4130–4135
16. Psarra A-M, Sekeris C, (2008) Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783, 1-11

17. Chen Jin-Qiang, Cammarata Patrick R., Baines Christopher P., Yager James D., (2009) Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, 1540–1570
18. Simpkins James W., Yang Shao-Hua, Sarkar Saumyendra N., Pearce Virginia, (2008) Estrogen actions on mitochondria—Physiological and pathological implications, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290, 51-59
19. Liao Tien-Ling, Tzeng Chii-Ruey, Yu Chao-Lan, Wang Yi-Pei, Kao Shu-Huei, (2015) Estrogen receptor-in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis, *Annals of the New York Academy of Science*, Vol. 1350, 52-60
20. Klinge Carolyn M., (2008) Estrogenic Control of Mitochondrial Function and Biogenesis, Vol. 105, No. 6, 1342-1351
21. Kelly MJ, Wagner EJ. Estrogen Modulation of G-protein-coupled Receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 1999 Nov;10(9):369-374. PubMed PMID: 10511696.
22. Sekeris CE. The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones. *In Vivo.* 1990 Sep-Oct;4(5):317-20. PubMed PMID: 2133104.
23. Gong X, Nedialkov Y, Burton Z, (2004) α -Amanitin Blocks Translocation by Human RNA Polymerase II, *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 26, 27422–27427
24. Manczaka M, Maoa P, Calkinsa M, Corneaa A, Reddya A, Murphyb M, Szetoc H, Parkd B, Hemachandra Reddya P, (2010) Mitochondria-Targeted Antioxidants Protect Against Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Neurons, *Journal of Alzheimer's Disease*, Vol. 20, 609–631
25. Liu L, Sanosaka M, Lei S, Bestwick M, Frey Jr. , Surovtseva Y, Shadel G, Cooper M, (2011) LRP130 Remodels Mitochondria and Stimulates Fatty Acid Oxidation, *The journal of biological chemistry*