

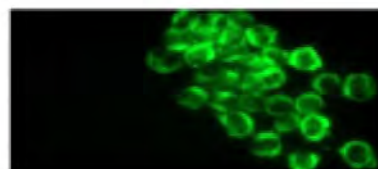
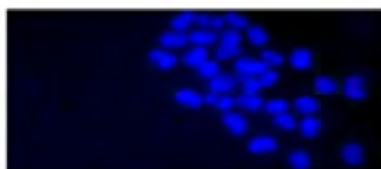
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ΠΟΥ ΥΠΕΡΚΕΦΡΑΖΟΥΝ  
ΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΒΗΤΑ ΜΕ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ  
ΣΤΟΧΕΥΣΗ”**

**“CHARACTERIZATION OF STABLE CELL LINES EXPRESSING  
MITOCHONDRIA TARGETED ESTROGEN RECEPTOR BETA”**



*ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΚΑΛΟΥΣΗ ΦΩΤΕΙΝΗ*

*ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΔΡ. ΑΝΝΑ – ΜΑΡΙΑ Γ. ΨΑΡΡΑ*

**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

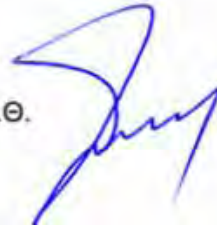
**Ψαρρά Άννα – Μαρία**, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ



**Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.



**Ζίφα Αιμιλία**, Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ.....	9
1.1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ .....	9
1.1.2. ΔΟΜΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ.....	9
1.2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ.....	11
1.3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	11
1.3.1. ΔΟΜΙΚΕΣ ΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΤΩΝ ERs.....	12
1.3.2. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΩΝ ERs.....	13
1.3.3. ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ERs.....	14
1.3.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ERs.....	15
1.3.4.1. ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ERs.....	16
1.3.4.2. ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ERs.....	17
1.3.4.3. ΣΥΓΚΛΙΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERs.....	17
1.3.4.4. ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ER $\alpha$ ΚΑΙ ER $\beta$ .....	18
1.3.4.5. ΕΤΕΡΟΔΙΜΕΡΗ ER $\alpha$ /ER $\beta$ .....	18
1.4. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ER $\beta$ .....	18
1.4.1. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ: ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ – ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ.....	19
1.4.2. ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ ER $\beta$ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ.....	20
1.4.3. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ER $\beta$ .....	22
1.5. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.....	25
1.6. ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	25
1.6.1. ER – ΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ.....	25
1.6.2. ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ .....	26
1.6.3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ.....	26
1.7. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΕ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ ΝΟΣΟΥΣ.....	26
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	27
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	28
3.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	28
3.2. ΥΛΙΚΑ.....	28
3.2.1. ΧΗΜΙΚΑ.....	30

3.2.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ.....	30
3.2.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	30
3.2.4. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	32
3.2.5. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	32
3.2.6. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	33
3.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	34
3.3.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	34
3.3.1.1. ΞΕΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	34
3.3.1.2. ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	35
3.3.1.3. ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	36
3.3.1.4. ΜΕΤΡΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	36
3.3.1.5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	38
3.3.1.6. ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ CIS-FBS.....	39
3.3.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ.....	39
3.3.2.1. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ – ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ.....	39
3.3.2.2. ΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (SONICATION) ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ (ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD).....	40
3.3.2.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ – ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	41
3.3.2.4. ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ.....	43
3.3.2.5. BLOCKING ΜΕ ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΕΠΩΑΣΗ ΜΕ ΠΡΩΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ.....	44
3.3.2.6. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ – WESTERN BLOT.....	45
3.3.2.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ TRIZOL.....	46
3.3.2.8. ΠΕΨΗ ΜΕ DNAΣΗ.....	47
3.3.2.9. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT-PCR).....	47
3.3.2.10. REAL-TIME PCR.....	48
3.3.2.11. ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ATP ΜΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ ΛΟΥΣΙΦΕΡΙΝΗΣ- ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ.....	49
3.3.2.12. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	50
3.3.2.13. ΣΧΕΔΙΑΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ PCR ΚΑΙ REAL-TIME PCR.....	51
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	52
4.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ N2A STABLE..	52
4.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΤΑΘΕΡΑ ΔΙΑΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ N2A.....	53
4.2.1. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ERβ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ N2A STABLE ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ.....	53

4.2.2. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΕΡβ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ N2A STABLE.....	55
4.2.3. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ ΕΡβ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ N2A STABLE.....	56
4.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΕΡβ ΣΤΑ ΟΛΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΤΡ.....	62
4.3.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΡΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΑΠΟΠΡΩΤΕΪΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	62
4.3.2. ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΔΟΛΥΤΤΑΡΙΚΑ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟΥ ΑΤΡ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ ΗΕΛΑ.....	63
4.3.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΑΤΡ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ N2A STABLE ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΥΣΙΑ Ε2.....	64
5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές και ειλικρινείς ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας κα. Άννα Μαρία Ψαρρά, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην ερευνητική της ομάδα, για την πολύτιμη βοήθεια της, τις γνώσεις που μου πρόσφερε, για την υπομονή της καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας και για την έμπρακτη υποστήριξη της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, τον κ. Λεωνίδα Δημήτριο Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την κα. Ζίφα Αιμιλία Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτωρ Βύρων Γοργογιέτα για την υπομονή του και βοήθεια που μου προσέφερε καθόλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στην ερευνητική μελέτη καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την ομαλή συνεργασία.

Ειδικότερα, δε θα μπορούσα να παραλείψω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στη συνάδελφο Μαρία Τζιόρτζιου, μέλος της ερευνητικής ομάδας της κας Άννας Μαρίας Ψαρρά, για την άψογη και ανιδιοτελή συνεργασία μας καθόλη τη διάρκεια της κοινής μας πειραματικής μελέτης.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου που με την συνεχή ηθική στήριξη τους με βοήθησε να ολοκληρώσω ένα μεγάλο και σημαντικό κομμάτι της ζωής μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στη Λάρισα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, που αποτελούν την κύρια τάξη των πυρηνικών υποδοχέων. Πρόκειται για μεταγραφικούς παράγοντες που εντοπίζονται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα αλλά και σε άλλες υποκυτταρικές περιοχές, και οι οποίοι ενεργοποιούνται από την σύνδεσή τους με έναν προσδέτη. Οι ERs ασκούν τις δράσεις τους μέσω δύο κύριων ισομορφών, τον υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (ERα) και τον υποδοχέα οιστρογόνων βήτα (ERβ). Εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς και φαίνεται να παρουσιάζουν ανταγωνιστική δράση.

Όλο και περισσότερες πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν ότι ο ERβ εισέρχεται στα μιτοχόνδρια, υποδεικνύοντας ότι διαδραματίζει ένα πιθανό ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργία τους, όσο αφορά την παραγωγή ενέργειας, την έκφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματός, τη βιογένεσή τους καθώς και την εμπλοκή του σε άλλες μιτοχονδριακές λειτουργίες.

Γ' αυτό, τέθηκε ως σκοπός να διερευνηθεί η μιτοχονδριακή δράση του ERβ, με σκοπό τη διαλεύκανση του ρόλου και των μηχανισμών με τους οποίους αυτή επιτελείται. Η μελέτη της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε σε σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές Neuro-2a, που υπερεκφράζουν τον ERβ με ή χωρίς μιτοχονδριακή στόχευση, σε χιμαιρικό αναγνώστικό πλαίσιο με το γονίδιο αναφοράς GFP, ενώ κατασκευάστηκαν και κύτταρα control, μόνο με το γονίδιο του GFP. (Βύρων Γοργογιέτας, διδακτορική διατριβή)

Έτσι λοιπόν, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός των κυτταρικών σειρών N2a stable, όσο αφορά τα επίπεδα έκφρασης του ERβ και mtERβ. Η συγκεκριμένη μελέτη προσεγγίστηκε με έλεγχο της έκφρασης της GFP πρωτεΐνης με μικροσκοπία φθορισμού, σε επίπεδο mRNA με real-time qPCR καθώς και σε πρωτεϊνικό επίπεδο με western blot. Αρχικά, με τη μικροσκοπία φθορισμού προσδιορίστηκαν οι αποικίες των N2a stable που εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα ERβ και mtERβ, και οι οποίες είναι οι 16 και 19 των mtGFP, οι 25 και 27 των GFPERβ και οι 37 και 38 των mtGFPERβ. Στη συνέχεια ελέχθησαν με real-time qPCR, η οποία ανέδειξε τις αποικίες 37 και 38 των κυττάρων mtGFPERβ να παρουσιάζουν τα υψηλότερα επίπεδα ώριμων μεταγράφων. Από την ανάλυση Western blot, έπειτα, οι αποικίες mtGFPERβ 37 και 38 εμφάνισαν τα υψηλότερα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERβ, καθώς και η αποικία 25 των κυττάρων GFPERβ, είτε με τη μορφή χιμαιρικής είτε με τη μορφή κολοβωμένης πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, τέθηκε ως σκοπός η διερεύνηση της επίδρασης του mtERβ στα επίπεδα του ολικού ATP, με σκοπό τη συσχέτιση της δράσης του υποδοχέα με τους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας. Προηγήθηκε βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου και από τη μέτρηση, η οποία έγινε μέσω προσδιορισμού της ενεργότητας του ενζύμου λουσιφεράσης, παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση του ERβ και mtERβ ενισχύει την ολική παραγωγή ATP, κάτι που όμως χρήζει περαιτέρω έρευνας ώστε να εξαχθεί ένα

πιο ασφαλές συμπέρασμα. Επίσης, μένει να διερευνηθεί εάν το παραγόμενο ATP που παρατηρήθηκε είναι κυτταροπλασματικής ή μιτοχονδριακής προέλευσης και να χαρακτηριστούν περαιτέρω μεγαλύτερος αριθμός αποικιών όσο αφορά τα επίπεδα έκφρασης των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών.

## **ABSTRACT**

Estrogen receptors (ERs) are steroid receptors that belong to nuclear receptors superfamily. They are mainly located in the nucleus, where upon ligand activation they act as transcription factors. They are also found in the cytoplasm and other cellular organelles, such as mitochondria. ERs exert their actions via two important isoforms, estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor beta (ER $\beta$ ). These two receptors appear to be tissue and cell type specific, competing with each other.

Most recent studies suggest ER $\beta$  mitochondrial location, indicating their involvement in regulation of mitochondria functions, such as energy production, mitochondria genome transcription, biogenesis and many others.

Based on that, it was aimed to further explore the estrogen receptor beta mitochondria mechanisms of action. To achieve this, neuro-2a stable cells lines, expressing estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) and mitochondria targeted estrogen receptor beta (mtER $\beta$ ) with GFP reporter gene chimeric reading frame, were produced (Byron Gorgogietas, PhD thesis). Also, control N2a stable cell lines were created containing only GFP reporter gene (Byron Gorgogietas, PhD thesis).

So, considering all we have mentioned above, the goal of this project was firstly the characterization of N2a stable cells lines as regards the expression levels of ER $\beta$  and mtER $\beta$ . To achieve this goal fluorescence microscopy analysis for the detection of the GFP expressed proteins, real-time qPCR for the estimation of mRNA levels and Western blot for the semi quantization of the expressed proteins levels were performed. Fluorescence microscopy analysis revealed which of the collected colonies positively expressed the GFPER $\beta$  proteins and which of them expressed high levels of ER $\beta$  and mtER $\beta$ , which then checked by real-time qPCR. Real-time PCR showed colonies 37, 38 of mtGFPER $\beta$  cells as the highest expressing ER $\beta$  mRNA levels. Then, western blotting verified that colonies 34, 38 of mtGFPER $\beta$  expressing also the highest protein levels and so did colony 25 of GFPER $\beta$  cells, in the form of GFP fused protein or GFPER $\beta$  truncated form. Afterwards, our goal was to study the effect of mitochondrial ER on mitochondrial ATP levels production, implying its implication in regulation of cellular energy production biochemical pathway. We first optimized the ATP measurement protocol, and by applying luciferin/luciferase assay for ATP measurement, it was shown that ER $\beta$  and mtER $\beta$  overexpression enhances cellular ATP production. Our results needs to be verified and to be further explored. One of our next goal is to investigate whether this increase in ATP production is of cytosolic or mitochondrial origin and to further



examine and characterize the N2a-GFPER $\beta$  and the N2a-mtGFPER $\beta$  stable cell lines as regards the GFP fused ER $\beta$  protein expression levels.

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1. ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ**

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (nuclear receptors, NRs) είναι μια από τις μεγαλύτερες τάξεις μεταγραφικών παραγόντων στους ζωικούς οργανισμούς, καθώς ρυθμίζουν διάφορες λειτουργίες όπως η ομοίωση, η αναπαραγωγή, η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός. Οι πυρηνικοί υποδοχείς λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται από τον προσδέτη τους, και έτσι αποτελούν ένα σύνδεσμο μεταξύ των σηματοδοτικών μορίων που ελέγχουν αυτές τις διαδικασίες και των μεταγραφικών αποκρίσεων (Marc Robinson-Rechavi *et al.* 2003). Οι προσδέτες τους μπορεί να είναι στεροειδείς ορμόνες, όπως τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη, καθώς και άλλα λιποδιαλυτά μόρια, όπως το ρετινοϊκό οξύ, οι οξυστερόλες και οι θυρεοειδικές ορμόνες (Richard Sever *et al.* 2016). Λόγω της λιπόφιλης φύσης τους, τα συγκεκριμένα μόρια μπορούν να διασχίσουν τις κυτταρικές μεμβράνες και να εισέλθουν στο εσωτερικό των κυττάρων, όπου συνδέονται απευθείας με τους πυρηνικούς υποδοχείς. Οι πυρηνικοί υποδοχείς εντοπίζονται ως μονομερή στην ανενεργή τους κατάσταση μέσα στο κύτταρο, και η σύνδεση του προσδέτη σε αυτούς οδηγεί στον διμερισμό τους και στη συνέχεια στην πρόσδεση στο DNA και την μετέπειτα τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Λόγω της ικανότητας τους να ρυθμίζουν πολλούς μηχανισμούς ελέγχου της φυσιολογίας του οργανισμού, μια πιθανή δυσλειτουργία της σηματοδότησής τους μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται, παραδείγματος χάρη, με μεταβολισμό, ανάπτυξη ή αναπαραγωγή. Επίσης, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ενεργοποιούνται από έναν προσδέτη, μπορεί να αποτελέσουν πιθανούς φαρμακευτικούς στόχους (Pierre Germain *et al.* 2006).

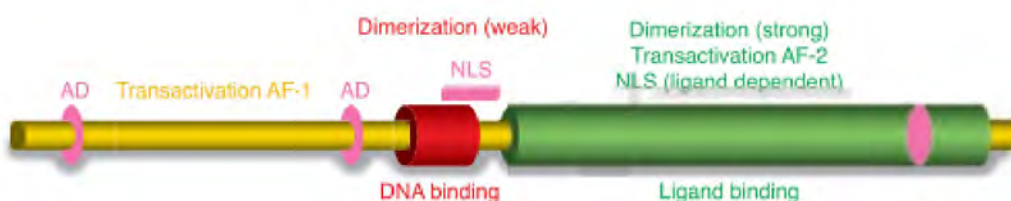
#### **1.1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ**

Οι πυρηνικοί υποδοχείς διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών, που λειτουργούν ως ομοδιμερή, η δεύτερη τους υποδοχείς RXR (retinoid X receptor), που λειτουργούν ως ετεροδιμερή και η τρίτη και τέταρτη τάξη περιλαμβάνει “ορφανούς υποδοχείς, οι οποίοι λειτουργούν είτε ως ομοδιμερή (κατηγορία 3), είτε ως μονομερή (κατηγορία 4) και για τους οποίους δεν έχουν ταυτοποιηθεί φυσικοί προσδέτες (Jerrold M. Olefsky *et al.* 2001).

#### **1.1.2. ΔΟΜΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ**

Όλοι οι πυρηνικοί υποδοχείς έχουν μια κοινή δομική οργάνωση, αποτελούμενοι από 6 κοινές συντηρημένες επικράτειες. Το αμινοτελικό άκρο (επικράτεια A/B) είναι υψηλά μεταβλητό και περιλαμβάνει τουλάχιστον μια συνεχώς ενεργή περιοχή trans-ενεργοποίησης (AF-1) και αρκετές αυτόνομες περιοχές trans-ενεργοποίησης (AD).

Το μήκος των επικρατειών A/B κυμαίνεται από 50 έως πάνω από 500 αμινοξέα, ενώ η τρισδιάστατη δομή τους δεν είναι ακόμη γνωστή. Η πιο συντηρημένη περιοχή είναι η επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (DNA binding domain, DBD, επικράτεια C), η οποία είναι υπεύθυνη για τη στόχευση του υποδοχέα σε περιοχές του DNA υψηλής εξειδίκευσης, που είναι γνωστές ως “στοιχεία απόκρισης” (response elements, REs). Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA περιλαμβάνει το P-box, ένα μικρό μοτίβο με νουκλεοτιδική αλληλουχία “AGGTCA”, υπεύθυνο για την εξειδικευμένη πρόσδεση στο DNA, το οποίο εμπλέκεται και στο διμερισμό των πυρηνικών υποδοχέων. Ο διμερισμός περιλαμβάνει τόσο ομο-διμερή όσο και ετερο-διμερή. Έχει προσδιοριστεί η τρισδιάστατη δομή της επικράτειας πρόσδεσης στο DNA πολλών πυρηνικών υποδοχέων και φαίνεται να περιλαμβάνει δύο υψηλά συντηρημένα δάκτυλα ψευδαργύρου (C-X2-C-X13-C-X2-C και CX5-C-X9-C-X2-C), οι 4 κυστεΐνες των οποίων δεσμεύουν από ένα ιόν ψευδαργύρου (Zn<sup>2+</sup>). Η μεγαλύτερη επικράτεια είναι η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (ligand binding domain, LBD, επικράτεια E), η οποία εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα και αναγνωρίζει ορμονικούς ή μη ορμονικούς προσδέτες. Η δευτεροταγής δομή της είναι περισσότερο συντηρημένη από την πρωτοταγή και περιλαμβάνει 12 α έλικες. Η επικράτεια E είναι υπεύθυνη για διάφορες λειτουργίες όπως η σύνδεση του προσδέτη, η trans-ενεργοποίηση της μεταγραφής (AF-2), ο ισχυρός διμερισμός του υποδοχέα και η πυρηνική του στόχευση μέσω άλλης μιας αλληλουχίας NLS (nuclear localization signal) που περιέχει. Ανάμεσα στην επικράτεια πρόσδεσης στο DNA και σύνδεσης του προσδέτη βρίσκεται μια λιγότερο συντηρημένη περιοχή άρθρωσης (hinge region, επικράτεια D), που ποικίλει σε μήκος και δρα ως ευέλικτος σύνδεσμος μεταξύ των επικρατειών C και E και περιέχει μια δεύτερη αλληλουχία πυρηνικής στόχευσης του υποδοχέα (nuclear localization signal, NLS), που πιθανόν αλληλεπικαλύπτεται με την επικράτεια C (DBD). Οι πυρηνικοί υποδοχείς πιθανόν να περιέχουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο μετά την επικράτεια E, την επικράτεια F, που είναι αρκετά μεταβλητή και η δομή και η λειτουργία της οποίας είναι μέχρι στιγμής άγνωστη (Marc Robinson-Rechavi *et al.* 2003).



### Εικόνα 1

Δομική οργάνωση των επικρατειών των πυρηνικών υποδοχέων. Παρουσιάζονται οι βασικές επικράτειες, οι οποίες είναι: η περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης AF-1, καθώς και δύο αυτόνομες περιοχές AD, που βρίσκονται στο αμινοτελικό άκρο (επικράτεια A/B). Στη συνέχεια, διακρίνεται η περιοχή πρόσδεσης στο DNA, DBD (επικράτεια C) καθώς και η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη, LBD (επικράτεια E). Ανάμεσα από τις επικράτειες C και E βρίσκεται η περιοχή άρθρωσης, hinge region

(επικράτεια D), η οποία περιλαμβάνει και μια αλληλουχία πυρηνικής στόχευσης, NLS (Marc Robinson-Rechavi *et al.* 2003).

## 1.2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ

Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών αποτελούν την πρώτη τάξη των πυρηνικών υποδοχέων και περιλαμβάνουν τους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptors, GR), τους υποδοχείς οιστρογόνων (estrogen receptors, ER), τους υποδοχείς ανδρογόνων (androgen receptors, AR), τους υποδοχείς προγεσταγόνων (progesterone receptors, PR) και τους υποδοχείς μεταλλοκορτικοειδών (mineralocorticoid receptors, MR). Πρόκειται για μεταγραφικούς παράγοντες, που εντοπίζονται στο πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα, ενώ κάποιοι έχουν εντοπιστεί και στην πλασματική μεμβράνη. Στην ανενεργή τους κατάσταση σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς (chaperons), όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90, (heat shock protein 90, Hsp90). Ενεργοποιούνται μετά τη σύνδεση με τους προσδέτες τους, δηλαδή τις στεροειδείς ορμόνες, οπότε ασκούν θετική ή αρνητική ρύθμιση στα γονίδια στόχους (M. Beato *et al.* 2000).

Οι στεροειδείς ορμόνες είναι λιπόφιλα μόρια που προέρχονται από τη χοληστερόλη και συντίθενται στο φλοιό των επινεφριδίων (γλυκοκορτικοειδή, μεταλλοκορτικοειδή και ανδρογόνα επινεφριδίων), στους όρχεις (ανδρογόνα όρχεων και οιστρογόνα), καθώς και στις ωοθήκες και στον πλακούντα (οιστρογόνα και προγεσταγόνα). Οι στεροειδείς ορμόνες φτάνουν τους στόχους τους μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, όπου συνδέονται με πρωτεΐνες μεταφορείς, και λόγω της λιπόφιλης φύσης τους διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω απλής διάχυσης. Μέσα στα κύτταρα στόχους οι στεροειδείς ορμόνες συνδέονται με τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών και τους ενεργοποιούν (M. Beato *et al.* 2000).

Μετά τη σύνδεση του προσδέτη και την αποσύνδεση από τις πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς, το σύμπλοκο υποδοχέα – ορμόνης συνδέεται σε ειδικές αλληλουχίες του DNA, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (hormones response elements, HREs), επάγοντας την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και προκαλώντας την ενεργοποίηση ή καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων. Επίσης, είτε μέσω της αλληλεπίδρασής τους με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, είτε μέσω διασταυρούμενης επικοινωνίας τους με άλλα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών μπορούν οδηγήσουν στην ενεργοποίηση πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (M. Beato *et al.* 2000).

## 1.3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Τα οιστρογόνα διαδραματίζουν αρκετά σημαντικό ρόλο στην αύξηση, ανάπτυξη και διαφοροποίηση των αρσενικών και θηλυκών δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου. Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση των οιστρογόνων πραγματοποιείται μέσω των

δύο υποδοχέων οιστρογόνων, τον ERα, γνωστό και ως NR3A1 (nuclear receptor subfamily 3, group A, member 1) και ERβ, γνωστό και ως NR3A2 (nuclear receptor subfamily 3, group A, member 2), που ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Οι υποδοχείς οιστρογόνων ήταν οι πρώτοι πυρηνικοί υποδοχείς που ταυτοποιήθηκαν, με τον ERα να κλωνοποιείται το 1986 και τον ERβ μια δεκαετία αργότερα (George G.J.M. Kuiper, Jan-Ake Gustafsson 1997, Shao-Hua Yang *et al.* 2004).

Οι ERα και ERβ είναι προϊόντα διαφορετικών γονιδίων, και συγκεκριμένα των ESR1 (estrogen receptor 1) και ESR2 (estrogen receptor 2), που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Το γονίδιο ESR1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6, στο γενετικό τόπο 6q25.1, ενώ το γονίδιο ESR2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14, στο γενετικό τόπο 14q23.2. Ο ERα έχει μοριακό βάρος 67-68 kDa, ενώ ο ERβ 59-60 kDa (George G.J.M. Kuiper, Jan-Ake Gustafsson 1997, M. Beato *et al.* 2000).

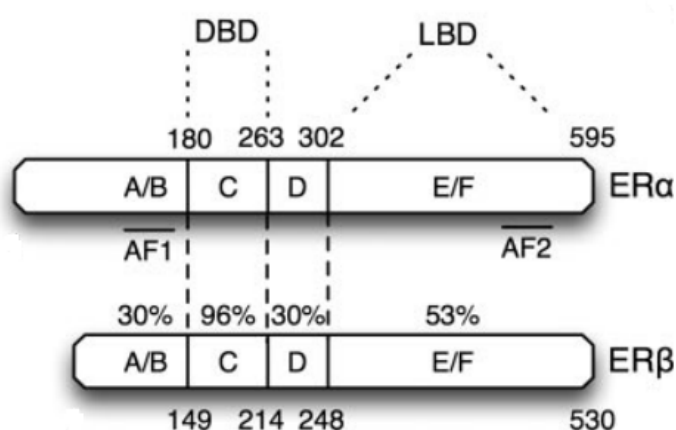
### **1.3.1. ΔΟΜΙΚΕΣ ΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΤΩΝ ERS**

Παρόλο που ο ERα μοιράζεται με τον ERβ κοινούς μεταγραφικούς μηχανισμούς, υπάρχουν κάποιοι μηχανισμοί που είναι μοναδικοί για τον ERβ. Αυτές οι διαφορές και οι ομοιότητες οφείλονται εν μέρει και στην πρωτεϊνική δομή τους. Και οι δύο ERS, περιέχουν την επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (DNA binding domain, DBD), την επικράτεια σύνδεσης στον προσδέτη (ligand binding domain, LBD) καθώς και δύο επικράτειες ενεργοποίησης (activation function domain, AF): την AF-1 στο αμινοτελικό άκρο και την AF-2 στο καρβοξυτελικό. Οι δύο επικράτειες AF-1 και AF-2 είναι αυτές που διευκολύνουν τη μεταγραφική ενεργότητα των υποδοχέων και είναι επίσης υπεύθυνες για τη στρατολόγηση συν-ρυθμιστών στον προσδεμένο στο DNA υποδοχέα. Η επικράτεια πρόσδεσης στο DNA καθώς και η AF-1 διαθέτουν τη μεγαλύτερη ομολογία ανάμεσα στους δύο υποδοχείς (96%), ενώ η AF-2 και το αμινοτελικό άκρο τη μικρότερη (30%). Παρόλο που και οι δύο ERS έχουν σχεδόν πανομοιότυπες επικράτειες πρόσδεσης στο DNA, ο ERβ έχει χαμηλότερη συγγένεια για τα EREs (ERE half-sites). Εφόσον συνδέεται σε διαφορετικές αλληλουχίες EREs, ο ERβ υφίσταται αλλαγές της στερεοδιαμόρφωσής του, που είναι ειδικές για κάθε ERE, με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση διαφορετικών συν – ενεργοποιητών. Αυτές οι διαφορετικές αλλαγές της στερεοδιαμόρφωσης ευθύνονται για τη διαφορετική μεταγραφική ενεργότητα των ERα και ERβ (Bonnie J. Deroo *et al.* 2010).

Το αμινοτελικό άκρο είναι αυτό που είναι κυρίως υπεύθυνο για τις διαφορές στη μεταγραφική ενεργότητα που παρατηρούνται ανάμεσα στους δύο ERS. Η επικράτεια AF-1 είναι συνεχώς ενεργή, *in vitro*, στον ERα, αλλά εμφανίζεται ανενεργή στον ERβ. Έτσι, όταν η επικράτεια AF-1 απομακρύνεται από τον ERβ, παρατηρείται μια αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητάς του. Γενικά, η αμινοτελική περιοχή, και συγκεκριμένα η επικράτεια AF-1, μπορεί και διευκολύνει την αλληλεπίδραση του ERβ και άλλων κυτταρικών μονοπατιών, όπως για παράδειγμα της Ras, καθώς και μονοπατιών αποικοδόμησης μέσω του πρωτεασώματος. Παρόλα αυτά, απαιτούνται περαιτέρω

έρευνες για να διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος της συγκεκριμένης περιοχής καθώς και της AF-1 επικράτειας (Bonnie J. Deroo *et al.* 2010).

Πιστεύεται ότι η επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (DBD domain) των υποδοχέων οιστρογόνων εμπλέκεται και στη σηματοδότηση που δεν περιλαμβάνει τη σύνδεση του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα απευθείας με το DNA. Θεωρείται, δηλαδή, ότι συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν με τους ERs και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι στη συνέχεια θα συνδεθούν στο DNA, και θα ρυθμίσουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων (Linda Björnström *et al.* 2005).



**Εικόνα 2**

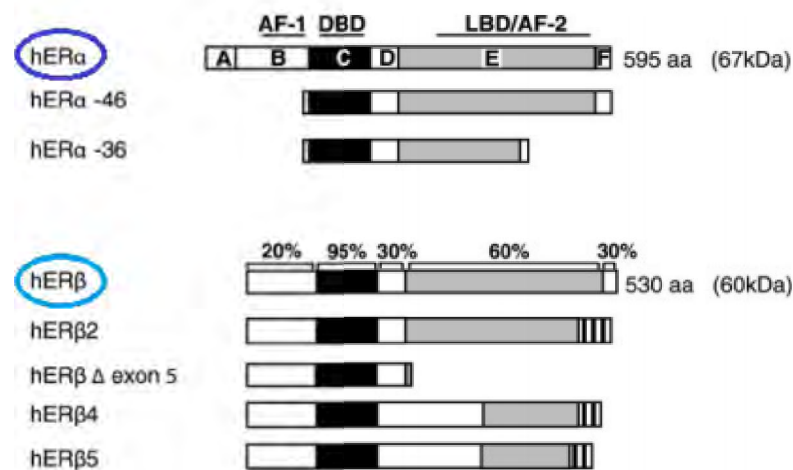
Σύγκριση πρωτεϊνικής δομής των ERα και ERβ. Όπως φαίνεται, μεγαλύτερη ομολογία παρουσιάζει η επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (DBD), έπειτα η επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (LBD), ενώ το αμινοτελικό άκρο και η περιοχή άρθρωσης έχουν τη μικρότερη ομολογία μεταξύ των δύο ERs (Bonnie J. Deroo *et al.* 2010).

### 1.3.2. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΑ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑ ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΩΝ ERs

Έχουν περιγραφεί αρκετά εναλλακτικά μετάγραφα και για τους δύο υποδοχείς οιστρογόνων, αλλά δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο αν αυτά κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες. Τα περισσότερα εναλλακτικά μετάγραφα του ERα διαφέρουν στην 5' UTR και όχι στην κωδική περιοχή. Επιπλέον, έχουν απομονωθεί μικρότερες σε μήκος ισομορφές του ERα, στις οποίες απουσιάζει το εξόνιο 1 και κατ' επέκταση η αμινοτελική AF-1 επικράτεια. Αυτές οι ισομορφές δεν έχουν μέχρι στιγμής ταυτοποιηθεί σε ιστούς, αλλά έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον αγρίου τύπου ERα και να καταστέλλουν τη μεταγραφική ενεργότητα της AF-1 επικράτειάς του (Nina Heldring *et al.* 2007).

Σε αντίθεση με τον ERα, αρκετά εναλλακτικά μετάγραφα του ERβ εκφράζονται σε διάφορους ιστούς. Η ισομορφή των 530 αμινοξέων θεωρείται ως ο αγρίου τύπου ERβ (549 αα σε αρουραίο και ποντικό). Έχουν περιγραφεί αρκετές εναλλακτικές ισομορφές του υποδοχέα και μερικοί από αυτούς εκφράζονται ως πρωτεΐνες σε

ιστούς. Ωστόσο, ο πλήρης χαρακτηρισμός της λειτουργικότητάς τους δεν έχει επιτευχθεί μέχρι στιγμής, αλλά αρκετά πειράματα αποδεικνύουν ότι οι ισομορφές του ERβ μπορούν να ρυθμίσουν τη σηματοδότηση των οιστρογόνων και κατ' επέκταση την έκφραση των γονιδίων στόχων (Nina Heldring *et al.* 2007).



**Εικόνα 3**

Ισομορφές των ERα και ERβ. Το πλήρες μήκος του ανθρώπινου ERα είναι 595 αμινοξέα. Και από τις άλλες δύο μικρότερες σε μήκος ισομορφές (-46 και -36) απουσιάζει η αμινοτελική περιοχή στην οποία περιέχεται η επικράτεια AF-1. Το πλήρες μήκος του ανθρώπινου ERβ είναι 530 αμινοξέα και στην εικόνα απεικονίζεται με ποσοστά η ομοιότητα των επικρατειών του με αυτές του ERα. Οι υπόλοιπες 4 ισομορφές του διαφέρουν στο COOH-άκρο σε σχέση με τον αγρίου τύπου ERβ (Nina Heldring *et al.*, 2007).

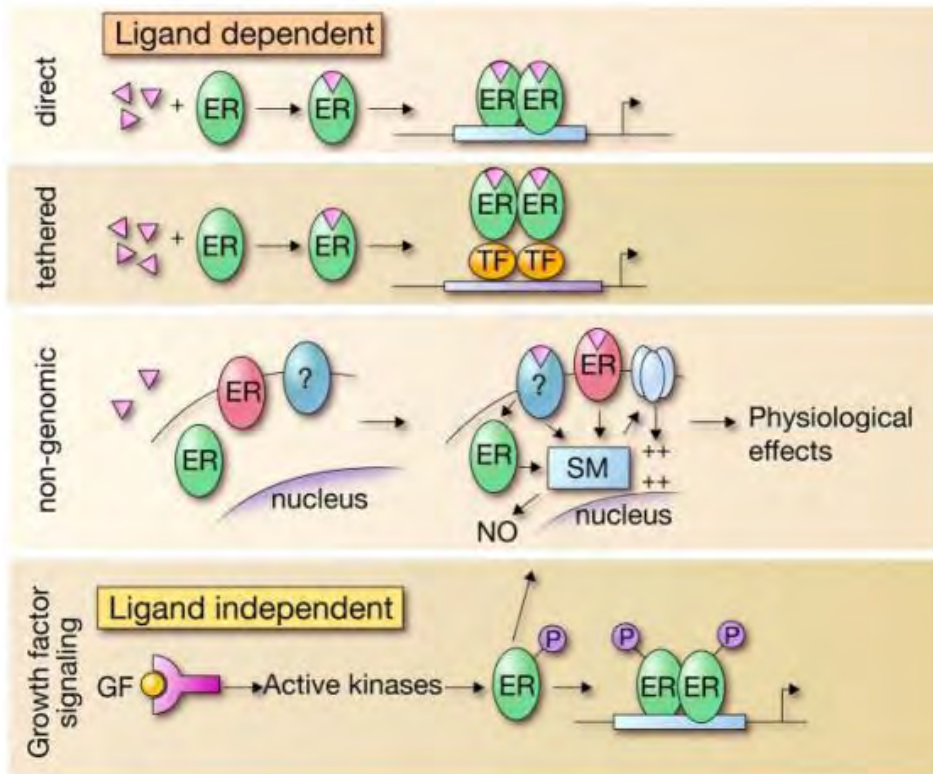
### 1.3.3. ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ERs

Είναι πλέον ξεκάθαρο το γεγονός ότι οι δύο υποδοχείς οιστρογόνων εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς, οπότε χαρακτηρίζονται και από διαφορετικές επιδράσεις στη φυσιολογία των οργάνων στόχων. Όσο αφορά τη διαφορική έκφραση των ERα και ERβ σε ποντίκια, ο ERα εκφράζεται ευρέως σε ποντίκια, με τα υψηλότερα επίπεδα mRNA του να εντοπίζονται στη μήτρα, στις ωοθήκες, στους βλεννογόνους αδένες, στα ανδρικά αναπαραγωγικά όργανα, στο λιπώδη ιστό, στον προστάτη, στο δέρμα, στους σκελετικούς μύες, στην αορτή, στους νεφρούς, στη χοληδόχο κύστη και στα οστά. Σε αντίθεση, τα επίπεδα του mRNA του ERβ είναι υψηλότερα στις ωοθήκες, στους πνεύμονες, στα ανδρικά αναπαραγωγικά όργανα, στο θύμο, στο παχύ έντερο, στον εγκέφαλο και στους νεφρούς, ενώ επίπεδα πρωτεϊνών του ERβ εντοπίζονται παντού εκτός από τους νεφρούς. Έτσι, ο ERα ασκεί τις δράσεις του σε κλασικούς ιστούς στόχους των οιστρογόνων όπως η μήτρα, οι μαστικοί αδένες και ο σκελετός, ενώ ο ERβ έχει ένα λιγότερο σημαντικό ρόλο σ' αυτούς. Ωστόσο, ο ERβ ρυθμίζει τη

σηματοδότηση στις ωθήκες, το ανοσοποιητικό σύστημα, στο γαστρεντερικό σωλήνα, στον προστάτη και στον υποθάλαμο, ενώ και οι δύο ERs έχουν πολύ μικρή αλληλεπικάλυψη των λειτουργιών τους (Bonnie J. Deroo *et al.* 2010).

#### **1.3.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ERs**

Όλο και περισσότερα δεδομένα ερευνών αποδεικνύουν ότι υπάρχουν αρκετά διαφορετικά μονοπάτια, μέσω των οποίων τα οιστρογόνα ρυθμίζουν τις βιολογικές διαδικασίες. Όταν βρίσκονται σε σύμπλοκα με τους προσδέτες τους, οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) μπορούν να συνδεθούν απευθείας σε στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες (EREs), τα οποία βρίσκονται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων. Εναλλακτικά, αλληλεπιδρούν με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως οι Fos και Jun, και επηρεάζουν τη μεταγραφή γονιδίων των οποίων οι υποκινητές τους δεν περιέχουν EREs. Σ' αυτή την περίπτωση, η ρύθμιση της μεταγραφής πραγματοποιείται μέσω έμμεσης αλληλεπίδρασης με το DNA. Η προσδετο – εξαρτώμενη ενεργοποίηση του υποδοχέα οιστρογόνων οδηγεί στη στρατολόγηση μιας ποικιλίας συν – ρυθμιστών στον υποδοχέα, γεγονός που αλλάζει τη δομή της χρωματίνης και έπειτα στρατολογεί τη μεταγραφική συσκευή της RNA πολυμεράσης II (RNA polymerase II transcriptional machinery). Επιπροσθέτως, έχει ανακαλυφθεί και ένα μη – γενωμικό μονοπάτι, μέσω του οποίου δρα ο υποδοχέας οιστρογόνων. Πιο συγκεκριμένα, μετά την ενεργοποίησή του από κάποιον προσδέτη, ξεκινά μέσω άγνωστων γεγονότων, ένας καταρράκτης σηματοδότησης που επηρεάζει κανάλια ιόντων ή αυξάνει τα επίπεδα οξειδίου του αζώτου (NO) στο κυτταρόπλασμα, γεγονότα που οδηγούν σε απόκριση χωρίς να περιλαμβάνεται γονιδιακή ρύθμιση. Και τέλος, ένα ακόμα μονοπάτι μέσω του οποίου ασκούν τις δράσεις τους τα οιστρογόνα είναι το προσδετο – ανεξάρτητο. Σ' αυτήν την περίπτωση, αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν κινάσες, οι οποίες φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τον υποδοχέα οιστρογόνων, ο οποίος με τη σειρά του διμερίζεται και συνδέεται στο DNA και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στόχων (Nina Heldring *et al.* 2007).



**Εικόνα 4**

Γενικοί μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα οιστρογόνων (ER). Οι ERs μπορεί να ασκούν τις δράσεις τους με άμεσο τρόπο, συνδεδεμένοι απευθείας στο DNA καθώς και με έμμεσο τρόπο, συνδεδεμένοι σε μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι έπειτα προσδένονται στο DNA. Επιπλέον, οι ERs μπορεί να δρουν και με έναν μη γενωμικό μηχανισμό, που δεν περιλαμβάνει την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης αλλά την ενεργοποίηση άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών μέσα στο κύτταρο. Και τέλος, μπορεί να ασκήσουν τις δράσεις τους με έναν προσδετο-ανεξάρτητο τρόπο και να ενεργοποιηθούν όχι από κάποιον προσδέτη αλλά από την ενεργοποίηση κινασών (Nina Heldring et al., 2007).

#### 1.3.4.1. ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ERs

Αρκετά γονίδια ενεργοποιούνται μέσω αλληλεπίδρασης των ER με τους μεταγραφικούς παράγοντες c-Fos και c-Jun, σε περιοχές του DNA στις οποίες συνδέεται ο AP-1 (AP-1 binding sites). Κάποια από αυτά τα γονίδια είναι η οβαλβουμίνη (ovalbumin), η κολλαγενάση (collagenase) και η κυκλίνη D1 (cyclin D1). Αντίθετα, ένα γονίδιο του οποίου η έκφραση καταστέλλεται είναι αυτό της χολυν - ακετυλοτρανσφεράσης. Γονίδια των οποίων οι υποκινητές περιέχουν αλληλουχίες πλούσιες σε GC, ρυθμίζονται με τον ίδιο τρόπο, μέσω αλληλεπίδρασης των ERs με τον μεταγραφικό παράγοντα Sp-1. Κάποια από αυτά τα γονίδια είναι ο υποδοχέας της LDL (low density lipoprotein receptor, LDL-R), το γονίδιο c-fos καθώς και αυτό της κυκλίνης D1. Επιπροσθέτως, η αλληλεπίδραση του ER με τον μεταγραφικό



παράγοντα NF-κB (nuclear factor κB) καθώς και με τον C/EBPβ (CCAAT/enhancer binding protein β) οδηγεί σε καταστολή του γονιδίου της ιντερλευκίνης – 6 (IL-6), ενώ η αλληλεπίδραση του με τον GATA-1, οδηγεί σε καταστολή της ερυθροποίησης. Επίσης, η αλληλεπίδραση των ER με τον μεταγραφικό παράγοντα STAT-5, ρυθμίζει το γονίδιο της β – καζεΐνης, αλλά το αποτέλεσμα είναι αμφιλεγόμενο, καθώς κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι το καταστέλλει, ενώ κάποιοι άλλοι ότι το ενεργοποιεί (Linda Björnström *et al.* 2005).

#### **1.3.4.2. ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ERs**

Οι μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων που έχουν αναφερθεί σε έρευνες περιλαμβάνουν τη ρύθμιση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου ασβεστίου, την ενεργοποίηση της δραστηριότητας της αδενυλικής κυκλάσης και της μετέπειτα παραγωγής cAMP, την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK καθώς και του μονοπατιού της PI3-K (phosphoinositol (PI)-3-kinase). Είναι σημαντικό να τονίσουμε, ότι οι ERα και ERβ είναι επίσης οι ίδιοι στόχοι φωσφορυλίωσης του σηματοδοτικού μονοπατιού MAPK. Έτσι, αυτή η μη γενωμική δράση των οιστρογόνων ενισχύει περαιτέρω τον κλασικό μηχανισμό δράσης των ERs (Linda Björnström *et al.* 2005).

#### **1.3.4.3. ΣΥΓΚΛΙΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERs**

Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος μπορούν και συνδέουν τη γενωμική με τη μη γενωμική δράση των οιστρογόνων. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK από την 17β-οιστραδιόλη οδηγεί στη φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων C/EBPβ και CREB καθώς και του Elk-1. Ο CREB μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί και μέσω προώθησης της παραγωγής του cAMP που προκαλείται από τον ER. Επιπροσθέτως, η 17β-οιστραδιόλη μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού Akt/PI3K, οδηγεί στη φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, με αποτέλεσμα την έκφραση γονιδίων που περιέχουν στους υποκινητές τους στοιχεία απόκρισης στον NF-κB. Επιπλέον, φαίνεται ότι η φωσφορυλίωση των μεταγραφικών παραγόντων STAT 3 και STAT 5 απαιτεί την αλληλεπίδραση με την MAPK, την κινάση PI3 και την κινάση Src, οι οποίες ενεργοποιούνται από την 17β-οιστραδιόλη. Έχει δειχθεί ότι η αλληλεπίδραση των ER με τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 οδηγεί στην ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου c-fos, αλλά αυτό ενισχύεται επιπλέον και από την ενεργοποίηση του μονοπατιού της MAPK. Επίσης, η αλληλεπίδραση των ERs με το μεταγραφικό παράγοντα Sp1 σε αλληλουχίες πλούσιες σε GC, οδηγεί στην ενεργοποίηση του γονιδίου LDL-R. Ο υποκινητής του γονιδίου LDL-R περιέχει, επιπλέον, αλληλουχίες SRE που αποτελούν στόχους για μη γενωμικές δράσεις των οιστρογόνων, όπως είναι η ενεργοποίηση των μονοπατιών MAPK και PI3K (Linda Björnström *et al.* 2005).

Είναι προφανές ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τους υποδοχείς οιστρογόνων είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία, που περιλαμβάνει γενωμικές και μη γενωμικές δράσεις, που συχνά συγκλίνουν, οδηγώντας σε κοινή απόκριση. Ωστόσο, η τελική γονιδιακή απόκριση εξαρτάται από πολλούς άλλους παράγοντες όπως ο διαφορετικός συνδυασμός μεταγραφικών παραγόντων που συνδέονται στον

υποκινητή του εκάστοτε γονιδίου στόχου, η ενδοκυτταρική εντόπιση των ERs, τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων συν-ρυθμιστικών πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών των σηματοδοτικών μονοπατιών, ο κυτταρικός τύπος καθώς και το είδος του εξωτερικού ερεθίσματος. Έτσι, τα οιστρογόνα χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς για να ασκήσουν τις δράσεις τους, οι οποίοι εξαρτώνται από τα συστατικά του κυττάρου στόχου, με αποτέλεσμα να προκαλείται διαφορετική κυτταρική απόκριση σε κάθε περίπτωση (Linda Björnström *et al.* 2005).

#### **1.3.4.4. ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ER $\alpha$ ΚΑΙ ER $\beta$**

Από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης έχει παρατηρηθεί ότι ο ER $\beta$  ανταγωνίζεται σε δραστηριότητα τον ER $\alpha$ , όσο αφορά τη σύνδεσή τους σε υποκινητές που επάγονται από την οιστραδιόλη (E2-responsive promoters). Πρόσφατες έρευνες έκφρασης όπου χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού και οστεοσαρκώματος, τροποποιημένες ώστε να εκφράζουν και τους δύο ERs, καταδεικνύουν ότι ο ER $\beta$  μπορεί να ρυθμίσει τη δραστηριότητα του ER $\alpha$ . Ο ER $\alpha$  και ο ER $\beta$ , επίσης, ρυθμίζουν την έκφραση διαφορετικών ομάδων γονιδίων σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου μαστού. Μελέτες σε κύτταρα MCF-7, τα οποία εκφράζουν ενδογενώς ER $\alpha$ , παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του ER $\beta$  ενισχύει και αναστέλλει τη ρύθμιση που ασκεί ο ER $\alpha$  και απουσία οιστραδιόλης (E<sub>2</sub>) ο ER $\beta$  επίσης ενεργοποιεί ή καταστέλλει την έκφραση γονιδίων, τα οποία ρυθμίζονται από τον ER $\alpha$  παρουσία οιστραδιόλης (E<sub>2</sub>). Επιπροσθέτως, ο ER $\beta$  ρυθμίζει μια μοναδική ομάδα γονιδίων που δεν ρυθμίζονται από τον ER $\alpha$ . Όταν συνεκφράζονται και οι δύο ERs, ο ER $\alpha$  περιορίζει την κατοχή της περιοχής πρόσδεσης του ER $\beta$ , και αντίστροφα (Bonnie J. Deroo *et al.* 2010).

#### **1.3.4.5. ΕΤΕΡΟΔΙΜΕΡΗ ER $\alpha$ /ER $\beta$**

Μέχρι προσφάτως, έρευνες έχουν αποδείξει το σχηματισμό ετεροδιμερών ER $\alpha$ /ER $\beta$ , αλλά το γεγονός της ταυτόχρονης παρουσίας τους στο DNA παραμένει αμφιλεγόμενο. Σε έρευνα στην οποία έγινε χρήση του πρωτοκόλλου ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης ChIP, καταδείχθηκε η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο ERs σε ενδογενούς υποκινητές που ρυθμίζονται από οιστρογόνα, σε σταθερή κυτταρική σειρά που εξέφραζε ενδογενώς τον ER $\alpha$  και έπειτα από επαγωγή και τον ER $\beta$ . Αυτό που μένει να διευκρινιστεί περαιτέρω είναι εάν τα ετεροδιμερή ER $\alpha$ /ER $\beta$  εντοπίζονται σε γονίδια που ρυθμίζονται ενδογενώς από την οιστραδιόλη, σε ιστούς που εκφράζουν και τους δύο ERs, όπως ο καρκινικός μαστικός ιστός (Bonnie J. Deroo *et al.* 2010).

### **1.4. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ER $\beta$**

Υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών, οιστρογόνων, ανδρογόνων, θυρεοειδικών ορμονών καθώς και άλλοι πυρηνικοί υποδοχείς έχουν εντοπιστεί σε μιτοχόνδρια λεμφοκυττάρων, ηπατικού ιστού αρουραίου, εγκεφάλου, νευρογλοιακών κυττάρων του Mueller, περιοδοντικού συνδέσμου και σπερματοκυττάρων. Επίσης, η παρουσία τους έχει παρατηρηθεί και σε μιτοχόνδρια αρκετών κυτταρικών σειρών. Μελέτες σε ηπατοκαρκινικά κύτταρα HepG2 και καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7, έδειξαν ότι

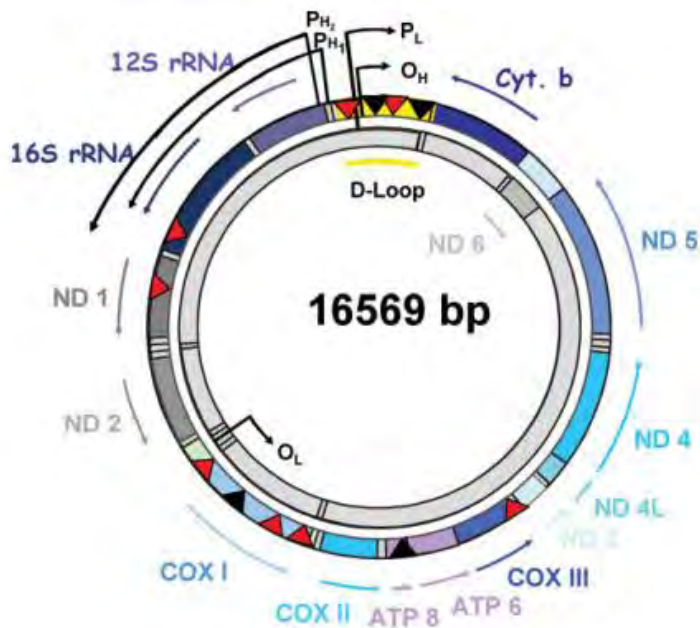
χορήγηση 17β-οιστραδιόλης προκαλεί τη μετακίνηση των δύο ERs στα μιτοχόνδρια (Psarra & Sekeris 2008).

Η πλειονότητα των δράσεων των οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια πραγματοποιείται μέσω των ERα και ERβ. Αρκετές έρευνες αναφέρουν ότι ο ERβ εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια σε διάφορα κύτταρα, όπως νευρώνες και καρδιακά μυϊκά κύτταρα αρουραίου, ανθρώπινες κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού (MCF-7, MCF-10F), ηπατικά καρκινικά κύτταρα (HepG2), ανθρώπινο σπέρμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο εντοπισμός του ERβ στα μιτοχόνδρια έχει αποδειχθεί με ανοσοκυτταροχημεία, ανοσοϊστοχημεία, ανοσοαποτύπωση καθώς επίσης και πρωτεομική (James W. Simpkins *et al.* 2008, Psarra *et al.* 2006).

#### **1.4.1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ: ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ – ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ**

Η πλήρης λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων απαιτεί τη συνεργασία τους με άλλα κυτταρικά οργάνια, και κυρίως τον πυρήνα. Η παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) είναι μια διαδικασία, στην οποία είναι απαραίτητα ένζυμα, που κωδικοποιούνται τόσο από τον πυρήνα όσο και από τα μιτοχόνδρια, με τελικό σκοπό το σχηματισμό ενεργών αναπνευστικών συμπλόκων. Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικοί αισθητήρες των ενεργειακών απαιτήσεων και επιτυγχάνουν προσαρμοστική ρύθμιση της OXPHOS. Εάν, οι ανάγκες του κυττάρου για ενέργεια δεν είναι μεγάλες, η αναπνευστική αλυσίδα αυξάνει την παραγωγή ATP μέσω αλλοστερικής ενεργοποίησης της OXPHOS από μεταβολίτες, όπως το ADP. Σε περιπτώσεις υψηλών ενεργειακών απαιτήσεων, που μπορεί να πυροδοτηθούν από γλυκοκορτικοειδείς και θυρεοειδικές ορμόνες στα κύτταρα στόχους, καθώς και κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων αναπτυξιακών περιόδων, το κύτταρο αποκρίνεται μέσω αύξησης της βιοσύνθεσης της OXPHOS, ή σε εξαιρετικές περιπτώσεις μέσω βιογένεσης των μιτοχονδρίων, που περιλαμβάνει και αύξηση της μεταγραφής πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Anna-Maria G. Psarra & Sekeris 2008).

Η παροχή ενέργειας από τα μιτοχόνδρια μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS), γεγονός που μπορεί να προκαλέσει απόπτωση των κυττάρων. Έτσι, η διακύμανση της παραγωγής ενέργειας μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας, μπορεί να έχει επιβλαβείς επιδράσεις στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα μιτοχόνδρια λαμβάνουν πολλά ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά προ-αποπτωτικά και αντι-αποπτωτικά σήματα, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στη μοίρα του κυττάρου (ανασκόπηση βιβλιογραφίας από 2008).



**Εικόνα 5**

Μιτοχονδριακό γονιδίωμα και πιθανές θέσεις των στοιχείων απόκρισης στις ορμόνες (*hormone response elements, HREs*). Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο 16,6 kb, αποτελούμενο από ένα βαρύ (H) κι έναν ελαφρύ (L) κλώνο. Κωδικοποιεί 13 υπομονάδες της αναπνευστικής αλυσίδας, 2 rRNA και 22 tRNA. Ο ελαφρύς κλώνος μεταγράφεται από τον υποκινητή PL, ενώ ο βαρύς κλώνος από τους γειτονικούς PH1 και PH2. Όλοι οι υποκινητές εντοπίζονται στη ρυθμιστική περιοχή του D-loop, ενώ πιθανολογείται και η παρουσία εσωτερικών HREs, που μπορεί να ρυθμίζουν τη διαδικασία της μεταγραφής σε άλλα στάδια. Η μεταγραφή από τους υποκινητές PH2 και PL, δημιουργεί μεγάλα πολυκιστρονικά προϊόντα που κωδικοποιούν ώριμα mRNAs και tRNAs. Αντίθετα, η μεταγραφή από τον PH1 υποκινητή δημιουργεί ένα μικρό σε μήκος μετάγραφο που κωδικοποιεί δύο rRNAs. Τα κόκκινα τρίγωνα αντιπροσωπεύουν τα HREs των πυρηνικών υποδοχέων τάξης I, ενώ τα μαύρα τα HREs των υποδοχέων τάξης II (Psarra & Sekeris 2008).

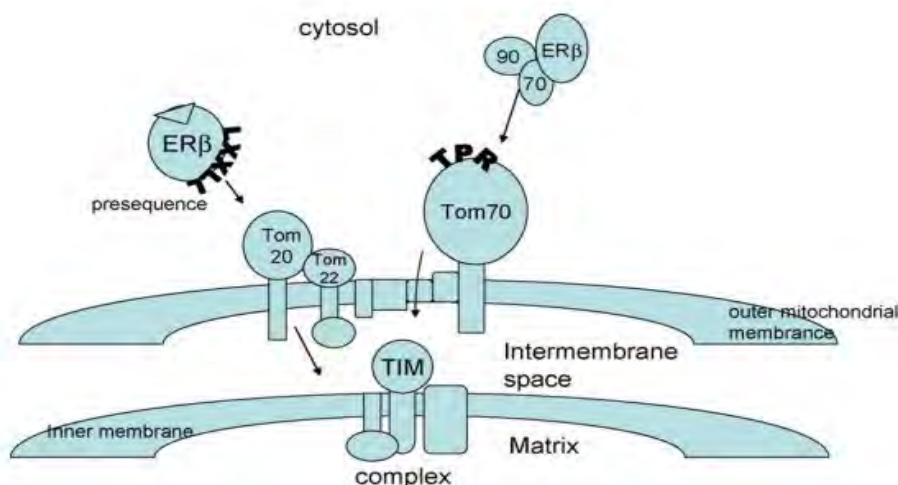
#### 1.4.2. ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ ΕΡΒ ΣΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ

Η μιτοχονδριακή δραστηριότητα εξαρτάται μεταξύ άλλων από την είσοδο και στρατολόγηση πυρηνικά κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών. Η έκφραση πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα, όπως μεταγραφικοί παράγοντες και πυρηνικοί συνενεργοποιητές, ρυθμίζουν τη βιογένεση των μιτοχονδρίων πιθανόν μέσω συνεργασίας πυρήνα – μιτοχονδρίων. Οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται στον πυρήνα, συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια κατευθύνονται σε υποδοχείς εισόδου στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη μέσω 20-50 αμινοξικών καταλοίπων στο αμινοτελικό άκρο. Άλλες είναι πρωτεΐνες μεταφορείς που περιέχουν εσωτερικές αλληλουχίες. Οι πρωτεΐνες που δεν περιέχουν

αλληλουχίες σύνδεσης με υποδοχείς του μιτοχόνδριου, αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς (chaperons), μέσω ειδικών αλληλουχιών (James W. Simpkins *et al.* 2008).

Οι πιο γνωστές πρωτεΐνες εισέρχονται στο μιτοχόνδριο μέσω του συμπλόκου της μετατοπάσης (translocase) της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (TOM). Το σύμπλεγμα Tom αναγνωρίζει αλληλουχίες με trans και cis περιοχές σύνδεσης και μεταφέρει τις πρωτεΐνες μέσα στο μιτοχόνδριο. Το συγκεκριμένο σύμπλοκο αποτελείται από τουλάχιστον 7 υπομονάδες που περιλαμβάνουν υποδοχείς εισόδου και πρωτεΐνες κανάλια. Η Tom20 και Tom70 είναι οι βασικές πρωτεΐνες υποδοχείς του συμπλόκου. Η Tom20 συνδέεται με προ-αλληλουχίες (presequences) προ-πρωτεϊνών (preproteins), ενώ η Tom70 συνδέεται σε εσωτερικές αλληλουχίες μεμβρανικών πρωτεϊνών. Οι Tom20 και Tom22 αναγνωρίζουν ένα μοτίβο φΧΧφφ, όπου φ είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ και Χ ένα οποιοδήποτε αμινοξύ. Η Tom70 θεωρείται υποδοχέας πρωτεϊνών, οι οποίες δεν περιέχουν προ-αλληλουχία καθώς και πρωτεϊνών μοριακών συνοδών, όπως η Hsp70. Οι Hsp70 και Hsp90 συνδέονται σε μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες ή υδρόφοβες προ-πρωτεΐνες και τις μεταφέρουν στην Tom70 μέσω συγκεκριμένων πεπτιδικών επαναλήψεων (tetra-tricopeptide repeats, TPR) (James W. Simpkins *et al.* 2008).

Ο ERβ εισέρχεται στα μιτοχόνδρια μέσω δύο εναλλακτικών οδών. Στην πρώτη οδό, ο ERβ που βρίσκεται χωρίς προσδέτη συνδέει τις Hsp70 και Hsp90 και στη συνέχεια αναγνωρίζεται από την Tom70. Στη δεύτερη οδό, όταν ο ERβ βρίσκεται συνδεδεμένος με τον προσδέτη του, αναγνωρίζεται από τις Tom20/Tom22, μέσω του μοτίβου LXXLL (όπου L λευκίνη) που βρίσκεται στην περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (αμινοτελικό άκρο). Αφού περάσει διαμέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, έπειτα κατευθύνεται στο σύμπλοκο TIM μέσω του οποίου εισέρχεται στη μήτρα του μιτοχόνδριου (James W. Simpkins *et al.* 2008).



**Εικόνα 6**

*Είσοδος του ERβ στο μιτοχόνδριο μέσω των δύο εναλλακτικών οδών (James W. Simpkins et al. 2008).*

### **1.4.3. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ERβ**

Τα περισσότερα γονίδια που ρυθμίζονται από τον ERβ είναι μιτοχονδριακές δομικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Η μιτοχονδριακή εντόπιση του ERβ του δίνει την ικανότητα να ρυθμίζει άμεσα την έκφραση πολλών διαφορετικών ομάδων μιτοχονδριακών γονιδίων είτε έμμεσα την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούνται στον πυρήνα και έχουν στόχο τα μιτοχόνδρια. Έχει βρεθεί ότι τα οιστρογόνα αυξάνουν την έκφραση των υπομονάδων I, II και III της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γένωμα (Psarra & Sekeris 2008, James W. Simpkins et al. 2008).

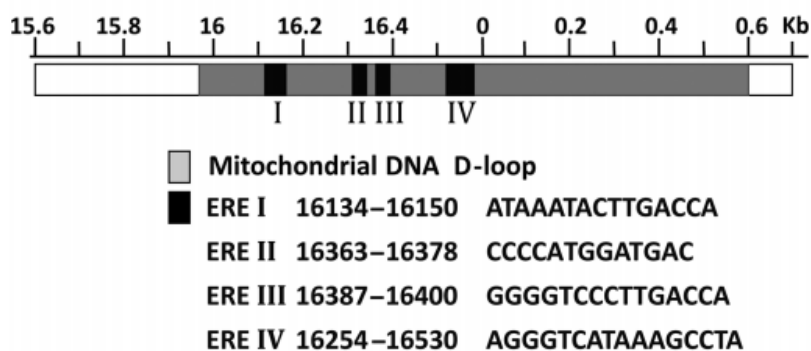
Η βιογένεση των μιτοχονδρίων εξαρτάται από τη συνεργασία πυρήνα – μιτοχονδρίου. Η δομή του ERβ του επιτρέπει να μετακινείται μεταξύ πυρήνα και μιτοχονδρίου, με αποτέλεσμα να μπορεί να ρυθμίζει τη λειτουργία του μιτοχονδρίου μέσω της πυρηνικής του δράσης (James W. Simpkins et al. 2008).

Έρευνες έχουν δείξει ότι ο μιτοχονδριακός ERβ μπορεί να αυξήσει τη μεταγραφή των υπομονάδων I, II και III της οξειδάσης του κυτοχρώματος c, που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Επιπλέον, μπορεί να αυξήσει την αναπνευστική ικανότητα, να αυξήσει την αντιοξειδωτική δραστηριότητα καθώς και να αναστείλει την απόπτωση (Psarra et al. 2008, Jin-Qiang Chen 2009, Tien-Ling Liao et al. 2015).

Ο ERβ έχει βρεθεί σε εγκέφαλο ποντικού να αλληλεπιδρά με τη μιτοχονδριακή κινάση της καζεΐνης 2 (casein kinase 2, CK2) και τη φωσφοκινάση C (PKC), οι οποίες συνεισφέρουν στη βιογένεση της μιτοχονδριακής μετατοπάσης (translocase) της εξωτερικής μεμβράνης και στη ρύθμιση των μιτοχονδριακών καναλιών καλίου που είναι ευαίσθητα στο ATP, αντίστοιχα. (Tien-Ling Liao et al. 2015)

Επιπροσθέτως, έχει παρατηρηθεί ότι ο mtERβ συνδέεται στα στοιχεία απόκρισης οιστρογόνων (estrogen response elements, EREs), τα οποία εντοπίζονται στην περιοχή του D-loop του μιτοχονδριακού DNA. Εναλλακτικά, μπορεί να ασκήσει τις δράσεις του μέσω της πρωτεΐνης CREB (cAMP-response element binding protein), η οποία συνδέεται επίσης στην περιοχή του D-loop του μιτοχονδριακού DNA. Οι αλληλεπιδράσεις του ERβ και του μιτοχονδριακού DNA υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα μπορούν να τροποποιήσουν τη μεταγραφή των μιτοχονδριακών γονιδίων καθώς και τα κυτταρικά ενεργειακά επίπεδα. (Tien-Ling Liao et al. 2015)

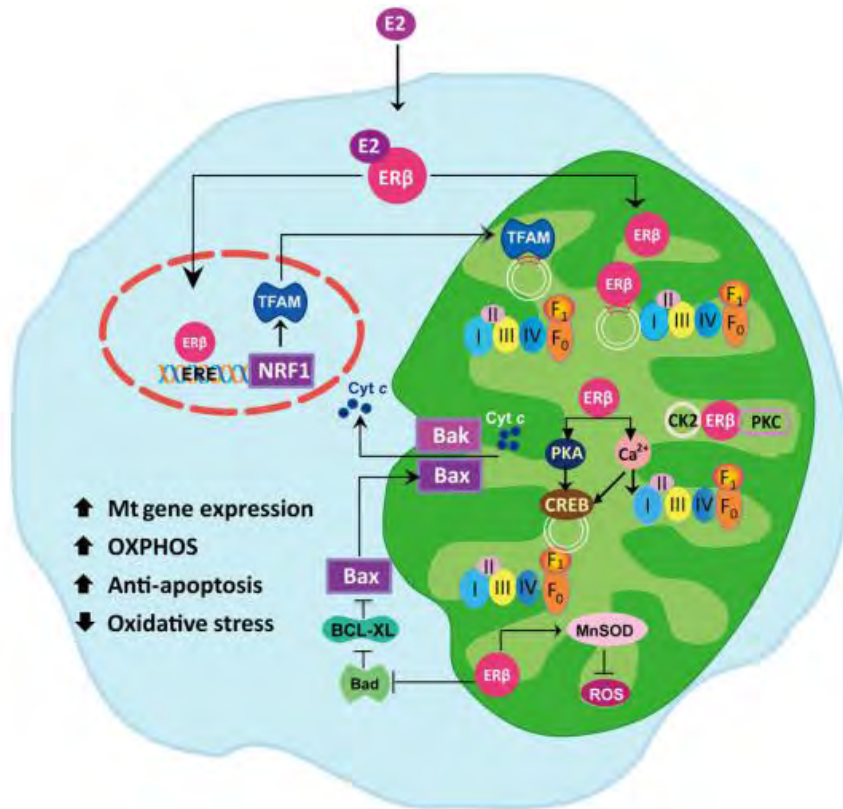
### Predicted mitochondrial DNA ERE in the D-loop region



#### Εικόνα 7

Αλληλουχίες στοιχείων απόκρισης στα οιστρογόνα (EREs), που έχουν βρεθεί στην περιοχή του D-loop του μιτοχονδριακού DNA. (Sekeris, 1990, Tien-Ling Liao et al. 2015)

Επιπλέον, ο mtERβ έχει βρεθεί να εμπλέκεται στην κυτταρική επιβίωση καθώς και σε αντι-αποπτωτικές δραστηριότητες. Ο mtERβ μπορεί να αλληλεπιδρά με την αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη Bad, οδηγώντας στην καταστολή της ενεργοποίησης του Bax και της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c, μέσω ενός προσδετο-εξαρτώμενου ή ανεξάρτητου τρόπου. Επίσης, ο ERβ μπορεί να αλληλεπιδρά με πυρηνικούς στόχους όπως ο πυρηνικός αναπνευστικός παράγοντας-1 (nuclear respiratory factor-1, NRF-1) και ο μιτοχονδριακός παράγοντας της μεταγραφής A (mitochondrial transcription factor A, TFAM-A- ), που ενεργοποιούν τη μιτοχονδριακή βιογένεση (Tien-Ling Liao et al. 2015).



**Εικόνα 8**

Ο πιθανός ρόλος του μιτοχονδριακού ERβ στη βιοενεργητική, στην μιτοχονδριακή βιογένεση και σε αντι-αποπτωτικά μονοπάτια (Tien-Ling Liao *et al.* 2015).

Ο mtERβ ρυθμίζει την μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS), είτε μέσω άμεσης σύνδεσης στα mtEREs ή ενεργοποιώντας τη μιτοχονδριακή σηματοδότηση ασβεστίου και φωσφορυλίωση του CREB, είτε έμμεσα μέσω επαγωγής του TFAM. Ο μιτοχονδριακός ERβ, επίσης, αναστέλλει τη λειτουργία της Bad, διακόπτοντας τις αλληλεπιδράσεις της με τις Bcl-X(L) και Bcl-2 και οδηγώντας σε αντι-αποπτωτικές επιδράσεις (Tien-Ling Liao *et al.* 2015).

Προς κατανόηση του μηχανισμού της αντιαποπτωτικής δράσης του mtERβ αναφέρουμε ότι η πρωτεΐνη Bad (Bcl-2 - associated agonist of cell death) είναι μια προ-αποπτωτική πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας Bcl-2, που συμμετέχει στην έναρξη της απόπτωσης. Όταν η Bad είναι μη φωσφορυλιωμένη σχηματίζει ετεροδιμερή με τις Bcl-2 και Bcl-xL, απενεργοποιώντας τους, και επιτρέποντας έτσι την πρωτεΐνη Bax να ξεκινήσει την απόπτωση. Όταν η Bad φωσφορυλιώνεται, σχηματίζει ομοδιμερή και αφήνει την Bcl-2 ελεύθερη να καταστείλει τη λειτουργία της Bax. Η αναστολή της Bax οδηγεί έπειτα και σε αναστολή της απόπτωσης (KSR Sastry *et al.* 2014).

Ο mtERβ, επιπλέον, αλληλεπιδρά με τις KC2 και PKC, συνεισφέροντας στη βιογένεση της μιτοχονδριακής τρانشλοκάσης της εξωτερικής μεμβράνης και



ρυθμίζοντας τα μιτοχονδριακά κανάλια καλίου που είναι ευαίσθητα στο ATP, αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, ο ERβ πιθανόν να ενεργοποιεί τη δραστικότητα της MnSOD (manganese superoxide dismutase), με αποτέλεσμα τη μείωση της δημιουργίας ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) (Tien-Ling Liao *et al.* 2015).

### **1.5. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ**

Τα οιστρογόνα είναι σημαντικά αντι-αποπτωτικά σήματα για πολλούς κυτταρικούς τύπους, όπως καρκινικά κύτταρα μαστού, ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και κύτταρα εγκεφάλου. Έχει παρατηρηθεί ότι, προωθούν την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Σε αντίθεση, τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν αποπτωτικά σήματα για θυμοκύτταρα και λευχαιμικά κύτταρα. Ωστόσο, η άμεση εμπλοκή των μιτοχονδριακών υποδοχέων σε αποπτωτικές διαδικασίες και στις δύο περιπτώσεις, είναι μια καινούρια ανακάλυψη που χρήζει περαιτέρω έρευνας (Psarra & Sekeris 2008).

Έρευνες έχουν δείξει ότι ο ERβ ασκεί αντι-πολλαπλασιαστικές δράσεις, ενώ μείωση των επιπέδων του έχει παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια της καρκινογενετικής διαδικασίας σε ανθρώπινο καρκίνο μαστού και προστάτη. Ωστόσο, μερικές έρευνες υποστηρίζουν ότι ο ERβ ασκεί τόσο αντι-πολλαπλασιαστικές όσο και πολλαπλασιαστικές επιδράσεις, έχοντας έναν πολύπλευρο ρόλο. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η υπερέκφραση του ERβ αύξησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε κύτταρα MCF-7, ενώ ο εξειδικευμένος αναστολέας του, πυραζολο-πυριμιδίνη (PHTTP), μείωσε την κυτταρική ανάπτυξη και διείσδυση σε καρκίνο της ουροδόχου κύστης. (Bonnie J. Deroo *et al.* 2006)

### **1.6. ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ**

Τα τελευταία χρόνια, φαίνεται ότι υπάρχει ένα όλο και αυξανόμενο ενδιαφέρον σχετικά με τις δράσεις των οιστρογόνων, και ειδικότερα της οιστραδιόλης, στον εγκέφαλο και για το αν μπορούν να παρέχουν νευροπροστασία σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer (AD) και του Parkinson (PD). Έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί για το πώς η 17β – οιστραδιόλη μπορεί να προστατέψει τον εγκέφαλο. Σε αυτούς περιλαμβάνονται: α) ο γενωμικός μηχανισμός που μεσολαβείται από τον υποδοχέα οιστρογόνων (genomic ER-mediated), β) ο μη γενωμικός μηχανισμός που περιλαμβάνει τη συμμετοχή των σηματοδοτικών μηχανισμών της MAPK ή/και της PI3K και γ) ένας μηχανισμός ανεξάρτητος με τον ER, που εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Ο τρίτος μηχανισμός έχει παρατηρηθεί σε υψηλή δοσολογία των οιστρογόνων, ενώ οι δύο πρώτοι σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις. (Krishnan M. Dhandapani, *et al.* 2002)

#### **1.6.1. ER – ΜΕΣΟΛΑΒΟΥΜΕΝΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ**

Προκειμένου να διαπιστωθεί η μεσολάβηση του υποδοχέα οιστρογόνων, και συγκεκριμένα του υποτύπου ERα ή ERβ, δημιουργήθηκαν knockout ERα ποντίκια (ERKO) και knockout ERβ ποντίκια (βERKO). Παρατηρήθηκε ότι τα βERKO ποντίκια

παρουσίασαν σημαντικές απώλειες των νευρώνων τους, υποδεικνύοντας ο ERβ είναι απαραίτητος για τη νευρωνική επιβίωση. Ωστόσο, οι τωρινές πειραματικές ενδείξεις, στο σύνολό τους, υποδεικνύουν ότι και οι δύο υποδοχείς οιστρογόνων πιθανόν ασκούν νευροπροστατευτικές δράσεις στον εγκέφαλο. (Krishnan M. Dhandapani, et al. 2002)

### **1.6.2. ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ**

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η 17β – οιστραδιόλη ενεργοποιεί άμεσα το σηματοδοτικό μονοπάτι της MAPK σε πρωτογενείς νευρωνικές καλλιέργειες. Ο ρόλος του συγκεκριμένου μονοπατιού στη νευροπροστασία έχει αποδειχθεί μέσω του αναστολέα του PD98059, η χορήγηση του οποίου αίρει το νευροπροστατευτικό ρόλο. Έχει παρατηρηθεί ότι η οιστραδιόλη παρέχει προστασία σε νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού και του ιππόκαμπου, μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού MAPK. (Krishnan M. Dhandapani, et al. 2002)

Επιπροσθέτως, σε μια πρόσφατη έρευνα που περιλάμβανε καλλιέργειες νευρώνων εγκεφαλικού φλοιού αρουραίου, παρατηρήθηκε γρήγορη ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K και η μετέπειτα φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της Akt κινάσης. Η ενεργοποιημένη Akt κινάση φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες BAD και GSK3β (glycogen synthase kinase 3β) και τις απενεργοποιεί. (Krishnan M. Dhandapani et al. 2002). Είναι γνωστό, επίσης, ότι η ενεργοποιημένη Akt κινάση αυξάνει την έκφραση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2. Η καταστολή της απόπτωσης οδηγεί στην αύξηση της επιβίωσης των νευρώνων, γεγονός που παρέχει νευροπροστασία. Επιπροσθέτως, η αυξημένη ενεργότητα της GSK3β συνδέεται στενά με νευροεκφυλιστικές διαταραχές και επομένως η απενεργοποίησή της από την Akt κινάση προωθεί τη σηματοδότηση που οδηγεί σε επιβίωση των νευρώνων. Επιπλέον, η 17β – οιστραδιόλη ρυθμίζει την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Tau με την GSK3β και άλλες πρωτεΐνες του μονοπατιού της PI3K, μειώνοντας την υπερφωσφορυλίωσή της. Η υπερφωσφορυλιωμένη Tau είναι χαρακτηριστικό εύρημα στη νόσο του Alzheimer. (Lydia L. DonCarlos et al. 2009)

### **1.6.3. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ**

Πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν ότι η 17β – οιστραδιόλη όταν χορηγείται σε φαρμακολογικές συγκεντρώσεις μπορεί να δράσει ως αντιοξειδωτικό. Η αντιοξειδωτική ικανότητα του στεροειδούς προέρχεται από ένα φαινολικό δακτύλιο που δρα ως πιθανός δότης ηλεκτρονίων, εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες και εμποδίζοντας τη λιπιδική υπεροξειδωση που προκαλεί βλάβη των μεμβρανών. (Krishnan M. Dhandapani et al. 2002)

### **1.7. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΣΕ ΝΕΥΡΟΕΚΦΥΛΙΣΤΙΚΕΣ ΝΟΣΟΥΣ**

Οι περισσότερες μιτοχονδριοπάθειες σχετίζονται με δυσλειτουργία στην αλυσίδα μεταφοράς μιτοχονδρίων, γεγονός που αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών και

μειώνει την παραγωγή ενέργειας. Συστήματα οργάνων που είναι ιδιαίτερα ευπαθή σε μιτοχονδριοπάθειες είναι οι μεταβολικά ενεργοί ιστοί, όπως το περιφερικό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Ορισμένες ασθένειες που προκαλούνται από βλάβη των μιτοχονδρίων μπορεί να οφείλονται σε μεταλλάξεις πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οι οποίες εισέρχονται και δρουν στα μιτοχόνδρια. (James W. Simpkins *et al.* 2008). Μεταλλάξεις των γονιδίων που κωδικοποιούν OXPHOS οδηγούν σε δυσλειτουργικά OXPHOS και αύξηση της μερικής αναγωγής σε O<sub>2</sub>, άρα και αύξηση της δημιουργίας ROS, τα οποία στη συνέχεια προκαλούν περισσότερες μεταλλάξεις και τη δημιουργία ενός φαύλου κύκλου.

Στην περίπτωση της νόσου του Alzheimer, τα αίτια της ασθένειας είναι πολυπαραγοντικά, αλλά συνεχώς παρατηρείται χαμηλός μεταβολισμός της γλυκόζης σε εκείνες της περιοχές του εγκεφάλου που επηρεάζονται από την ασθένεια, κάτι μάλιστα που μπορεί να ανιχνευτεί ακόμα σε αρχικά στάδια της νόσου. Τα μιτοχόνδρια ασθενών με τη νόσο του Alzheimer φαίνεται ότι υπολειτουργούν, παράγουν υπέρμετρα ποσά ελευθέρων ριζών οξυγόνου και επίσης εμφανίζουν διαταραχή της λειτουργίας του συμπλόκου IV της αναπνευστικής αλυσίδας. Παρ' ότι η μιτοχονδριακή βλάβη ερμηνεύεται ως συνέπεια της νόσου και όχι ως πρωταρχική αιτία, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων εμπλέκεται σταδιακά σε προοδευτικό νευρικό θάνατο και πιθανόν αντιπροσωπεύουν ένα θεραπευτικό στόχο. (James W. Simpkins *et al.* 2008)

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες έρευνες καταδεικνύουν την μετακίνηση της βήτα μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια αρκετών κυτταρικών τύπων, υποδεικνύοντας έναν πιθανό ρυθμιστικό του ρόλο στη λειτουργία του συγκεκριμένου υποκυτταρικού οργανιδίου, όσο αφορά την παραγωγή ενέργειας, την έκφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματός, τη βιογένεσή του καθώς και την εμπλοκή του σε άλλες μιτοχονδριακές λειτουργίες.

Ως εκ τούτου, έγινε προσπάθεια από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας για διερευνηθεί η μιτοχονδριακή δράση του ERβ, με σκοπό τη διαλεύκανση του ρόλου και των μηχανισμών με τους οποίους αυτή επιτελείται. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, κατασκευάστηκαν από το συνάδελφο Βύρωνα Γοργογιέτα, στα πλαίσια της διδακτορικής του διατριβής, σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές Neuro-2a, που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων βήτα με ή χωρίς μιτοχονδριακή στόχευση. Η εισαγωγή του στα κύτταρα έγινε σε χιμαιρικό αναγνώστικό πλαίσιο με το γονίδιο αναφοράς GFP, για τον ευκολότερο εντοπισμό του, ενώ κατασκευάστηκαν και κύτταρα control (μάρτυρες), που υπερεκφράζουν μόνιμα το γονίδιο GFP με ή χωρίς μιτοχονδριακή στόχευση.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο χαρακτηρισμός των σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών N2a, όσο αφορά τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα καθώς και του μιτοχονδριακού υποδοχέα οιστρογόνων

βήτα. Η διερεύνηση της ύπαρξης καθώς και η ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση του ERβ και mtERβ προσεγγίστηκε ανοσοϊστοχημικά, σε επίπεδο ώριμων μεταγράφων (mRNA) καθώς και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Τέλος, σε επόμενο στάδιο, τέθηκε ως σκοπός η διερεύνηση της επίδρασης του μιτοχονδριακού ERβ στα επίπεδα του ενδοκυτταρικά παραγόμενου ATP, με σκοπό τη συσχέτιση της δράσης του υποδοχέα με τους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας που λαμβάνουν χώρα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο μιτοχόνδριο.

### **3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

#### **3.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ**

- Φωτόμετρο Spectronic® 20 GENESYS™
- Συσκευή καθέτου νηματικής ροής (Laminar Flow Hood) Tel Star AV-30/70
- Επωαστήρας: New Brunswick (an Eppendorf Company) Galaxy 170S
- Επωαστήρας: SHEL LAB
- Υδατόλουτρο: P SELECTA
- Ανάστροφο Μικροσκόπιο (αντίθεσης φάσης): A. Kruss Optronik Germany
- Φυγόκεντρος στις κυτταροκαλλιέργειες: Entrofriger- BLII/ PS Selecta®
- Μικροσκόπιο φθορισμού: LEICA DM 2000
- Ψυχόμενη κάμερα φθορισμού: OPTIMOS Q IMAGING
- Λουμιόμετρο: Berthold Technologies, LuBat 39508
- Φυγόκεντρος Helme Z36HK
- Φυγόκεντρος Eppendorf 5810R
- Αναδευτήρας: Heidolph Rotamax
- Ζυγοί: KERN EW + KERN 440-47 N
- Heat blocker: KISKER
- Quick spin: Nippon Genetics Europe GmbH
- Vortex: Bio Vortex V1
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης: Biorad mini-PROTEAN® tetra cell
- Συσκευή μεταφοράς (transfer): Biorad mini-trans Blot
- Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S
- Μηχάνημα εμφάνισης W.B και gel: FluoChemE/ ProteinSimple
- Σκοτεινός θάλαμος και σειτ εμφάνισης μεμβρανών από W.B Kodak
- Πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνων από την κάμερα φθορισμού: Q Capture Pro v.7.05
- DNA/RNA UV-CLEANER UVC/T-AR (BIOSAN)
- Μηχάνημα PCR: eppendorf mastercycler gradient
- Μηχάνημα real-time PCR: Stratagen Mx3005P
- Αυτόματος πιπιεταδόρος: HTL Lab solution

#### **3.2. ΥΛΙΚΑ**

### 3.2.1. XHMIKA

- Acetic acid (Scharlau)
- Acrylamide/Bis acrylamide 40% (Bio-Rad)
- Agarose (Sigma)
- APS (Sigma)
- Bradford protein assay (Bio-Rad)
- Bromophenol blue (fluka)
- $\text{CHCl}_3$  (Sigma)
- Cyanol xylene (fluka)
- HOECHST 33342 (Sigma)
- DMSO (Sigma)
- DTT (SERVA)
- Developer (Carestream)
- EDTA (SERVA)
- ECL A + ECL B (GenScript The Biology CRO)
- $\text{E}_2$  (Sigma)
- ENLITEN® ATP assay (PROMEGA)
- FBS (Gibco®)
- Fixer (Carestream)
- Glycine (SERVA)
- HCl (Merck)
- Hoechst (life technologies)
- KCl (EMSURE)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck)
- L-Glutamine (Gibco)
- Midori Green (Nippon Genetics)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (EMSURE)
- NaCl (Scharlan)
- NaOH (Merck)
- RBS 1x (Gibco)
- PMSF (SERVA)
- Polyvinyl Alcohol (PVA) (Sigma)
- RQ1 RNase-Free DNase kit (Promega)
- SDS (SIGMA)
- Skimmed milk powder (Regilait)
- SuperScript II Reverse Transcriptase kit (Invitrogen)
- SYBR Select Master Mix kit (Applied Biosystem)
- Taq DNA polymerase kit (Invitrogen)
- TEMED (Applichem)
- TCA (Applichem)
- Trizol, TRI Reagent (SIGMA)

- Tris (SERVA)
- Triton X-100 (Applichem)
- Trypsin-EDTA 5% 10× (Gibco)
- Tween 20 (BioChemica)
- Αιθανόλη 100% (SIGMA)
- Βιοαιθανόλη (Kalochem\_)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel-de Haën)
- Γλυκερόλη (Applichem)
- Ισοπροπανόλη (SIGMA)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών Pageruler™ Prestained Protein Ladder (ThermoScientific Fermentas)
- Μεθανόλη (Sigma)
- Κυανούν της βρωμοφαινόλης (Research organics)
- Πενικιλίνη - Στρεπταμυκίνη (Gibco)
- Μείγμα αναστολέων πρωτεασών (SIGMA)

### 3.2.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 1g/mol Glucose (Life Technologies - Invitrogen)  
[+] L-glutamate, [+] pyruvate
- Dulbecco's modified eagle medium DMEM Gibco® 1g/mol Glucose (Life Technologies - Invitrogen)  
[-] L-glutamate, [-] phenol red

### 3.2.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- **PMSF 200mM:**

Για την παρασκευή 2ml PMSF 200mM διαλύονται 0.07gr PMSF σε 2ml ισοπροπανόλης. Γίνεται ο διαμοιρασμός του σε aliquots των 200μl και αποθηκεύονται στους -20 °C. Με αραιώση 10% σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20mM.

- **Διάλυμα λύσης κυττάρων με χρήση υπερήχων (Lysis Buffer):**

Αποτελείται από 20mM Tris pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 250mM NaCl και 3mM EDTA και αποθηκεύεται στους 4°C. Σε 1ml από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 0.5μl PMSF 20mM (-20°C) και 2μl DTT 1M (-20°C). Η DTT χρησιμεύει ως αναγωγικός παράγοντας. Επίσης, γίνεται προσθήκη 10μl μείγματος αναστολέων πρωτεασών.

- **Διάλυμα Bradford: Stock 5x**

Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1x, αραιωμένο με ddH<sub>2</sub>O. Η αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford είναι 1:1000.

- **Sample Buffer 4x (διάλυμα επιστοίβαξης δείγματος):**

Αποτελείται από 1M Tris pH 6.8, 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% κυανούν της βρωμοφαινόλης και αποθηκεύεται στους -20°C. Η β-μερκαπτοαιθανόλη αναγάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και καταργεί την τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών.

- **Tris 20mM pH 7.5:**

Σε πλαστικό σωληνάριο τύπου eppendorf (1.5ml) αναμειγνύονται 20μl stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 (4 °C) με 980μl ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα διατηρείται σε R.T.

- **Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:**

Για την παρασκευή 0.2 lt διαλύματος ζυγίζονται 36,342 gr Tris τα οποία διαλύονται σε dH<sub>2</sub>O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 12N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4°C.

- **TEMED:**

Χρησιμοποιείται χωρίς κάποια αραιώση, όπως ακριβώς παραλαμβάνεται. Αποθηκεύεται στους 4°C.

- **Υπερθειικό αμμώνιο (APS) 10 %:**

Παρασκευάζεται διαλύοντας 100mg APS σε 1ml ddH<sub>2</sub>O. Αποθηκεύεται στους -20°C και κατά τη διάρκεια χρήσης του παραμένει τοποθετημένο σε πάγο (4 °C).

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x:**

Ζυγίζονται 30.3 gr Tris base και 144.00 gr γλυκίνης, τα οποία διαλύονται σε όγκο 1lt ddH<sub>2</sub>O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε R.T. (Ornstein, 1964; Davis, 1964).

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x:**

Για την παρασκευή του R.B. 1x αραιώνονται 100ml R.B. 10x σε 900ml dH<sub>2</sub>O (αναλογία 1:9). Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε αναλογία 0.1%, δηλαδή 10ml. (Laemmli, 1970). Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10x:**

Αποτελείται από 10% Running Buffer 10x, 20% MeOH και 0.05% SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αποθηκεύεται στους 4 °C.

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

Ζυγίζονται 2gr KCl, 2,4gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 17,8gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O και 80gr NaCl, τα οποία διαλύονται σε όγκο 1lt. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε R.T.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1x:**

Αποτελείται από 10% stock buffer PBS 10x και 1% Tween-20. Ο όγκος συμπληρώνεται με dH<sub>2</sub>O ή ddH<sub>2</sub>O. Αποθηκεύεται σε R.T.

- **Διαλύματα για εμφάνιση σήματος:**

Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα της Kodak. Αποτελείται από ένα διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Τα εκάστοτε διαλύματα παρασκευάζονται με ανάμειξη 1:3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (fixer ή developer) σε dH<sub>2</sub>O.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης νουκλεοτιδίων TAE 50x:**

Επαναδιαλυτοποιούμε 242,2gr Tris base σε 600ml ddH<sub>2</sub>O. Έπειτα, γίνεται προσθήκη 57,1ml υγρού οξικού οξέος (Scharlau) καθώς και 100ml 0,5M EDTA pH=8. Τέλος συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O μέχρι το 1lt.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης νουκλεοτιδίων σε πηκτή αγαρόζης 6x:**

Αποτελείται από 30% v/v γλυκερόλη, 0,25% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue), 0,25% w/v xylene cyanol και ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O. Αποθηκεύεται στους 4°C.

### 3.2.4. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

#### ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ

- Αντίσωμα έναντι ERβ από κόνικλο, ERβ H150 (Santa Cruz)
- Αντίσωμα έναντι ERβ από επίμυ MCA, (Serotec)
- Αντίσωμα έναντι GFP από επίμυ (Roche)
- Αντίσωμα έναντι β-ακτίνης από επίμυ (Sigma)

#### ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ

- Αντίσωμα έναντι mouse IgG-HRP (Pierce Antibodies)
- Αντίσωμα έναντι rabbit IgG-HRP (Pierce Antibodies)

### 3.2.5. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Σωληνάρια για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (cryovials ή cryotubes)
- Ειδικές φιάλες για ανάπτυξη ευκαρυωτικών κυττάρων (flasks) (Sarstedt)
- Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) (15 ml, 50 ml) (Sarstedt)
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorfs (1.5 ml, 2.0 ml) (Sarstedt)
- Πιπέττες ορολογικές - Serological (2, 5, 10 και 25 ml) (Sarstedt)
- Ρύγχχοι (0.2-10 μL, 20-200 μl και 100-1000 μl) (Sarstedt)



- Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6× και 24× wells (Sarstedt)
- Γυάλινα σιφώνια (Kimble)
- Καλυπτρίδες, coverslips
- Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου
- Μembrάνη νιτροκυτταρίνης 0,45μm: Amersham™ Protran™
- Χαρτιά Whatman
- Φωτογραφικά φιλμ ανίχνευσης σήματος σε μεμβράνη κατά τη διαδικασία western blot (FUJI MEDICAL)
- Αιμοκυτταρόμετρο για μέτρηση κυττάρων, Neubauer

### 3.2.6. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η έρευνα πραγματοποιήθηκε στις σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές Neuro-2a (N2a), που κατασκευάστηκαν από τον συνάδελφο κ. Βύρωνα Γοργογιέτα στα πλαίσια της διδακτορικής του διατριβής. Πιο συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν οι παρακάτω 4 κυτταρικές σειρές N2a:

1. κυτταρική σειρά που υπερεκφράζει την πρωτεΐνη “σημαία” GFP → **“GFP”**
2. κυτταρική σειρά που υπερεκφράζει την πρωτεΐνη GFP με μιτοχονδριακή στόχευση → **“mtGFP”**
3. κυτταρική σειρά που υπερεκφράζει τη χιμαιρική πρωτεΐνη GFP-ERβ → **“GFP ERβ”**
4. κυτταρική σειρά που υπερεκφράζει τη χιμαιρική πρωτεΐνη mtGFP-ERβ → **“mtGFP ERβ”**

#### Πληροφορίες από ATCC για την κυτταρική σειρά Neuro-2a

Neuro-2a (ATCC® CCL-131™)

Οργανισμός: Mus musculus, mouse

Ιστός: εγκέφαλος

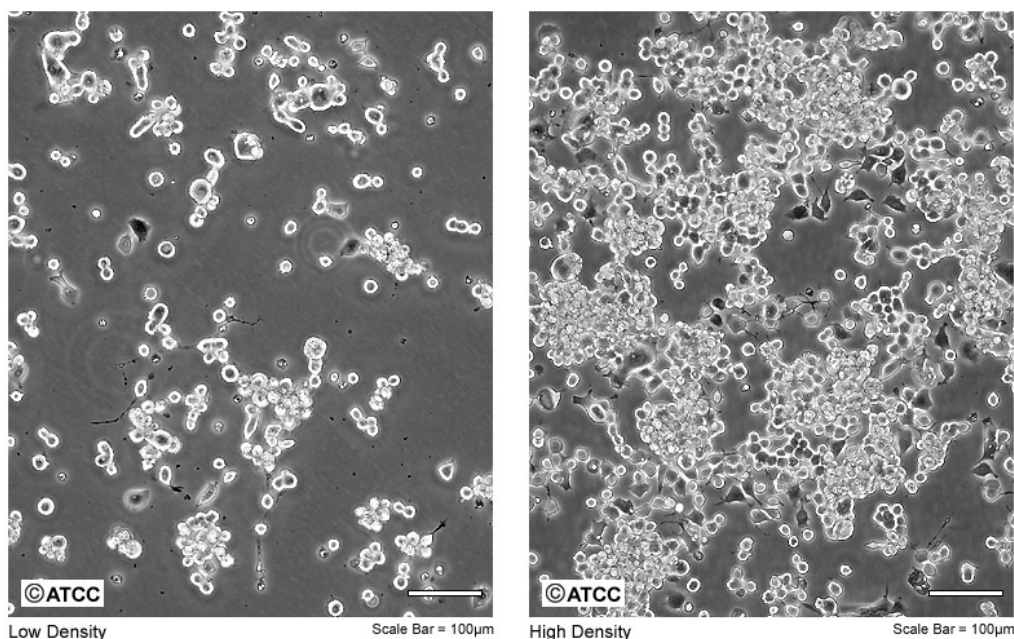
Κυτταρικός τύπος: νευροβλάστες

Ασθένεια: νευροβλάστωμα

Στέλεχος: A

Καρυότυπος: μη σταθερός που κυμαίνεται από 94-98 χρωμοσώματα

ATCC Number: **CCL-131**  
Designation: **Neuro-2a**



## Εικόνα 9

*Παρουσίαση της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς (neuro-2a) από την επίσημη ιστοσελίδα της εταιρίας (<http://www.lgcstandards-atcc.org>)*

### 3.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ

#### 3.3.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

##### 3.3.1.1. ΞΕΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι κυτταρικές σειρές που διαθέτουμε φυλάσσονται σε βαθιά κατάψυξη: είτε σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$  ή σε υγρό άζωτο,  $-120^{\circ}\text{C}$ . Η διαδικασία του ξεπαγώματος είναι κοινή και για τις δύο θερμοκρασίες φύλαξης.

Αρχικά πρέπει να προετοιμαστούν τα πάντα προκειμένου μόλις ξεπαγώσει το vial να τοποθετηθούν τα κύτταρα στο θρεπτικό και να έρθουν σε επαφή με μικρότερη συγκέντρωση DMSO το οποίο υπήρχε κατά τη φύλαξή τους.

Έχοντας ξεπαγώσει, βγάλε, και τοποθετήσει στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar flow hood) όλα τα θρεπτικά, τοποθετούμε 4 ml θρεπτικού υλικού DMEM 1g/mol Glucose σε δοκιμαστικό σωλήνα falcon των 15ml, το οποίο έχουμε από πριν τοποθετήσει στο hood με μερικώς ανοιχτό το καπάκι. Επιπλέον, βγάζουμε μία νέα φλάσκα καλλιέργειας, ανοίγουμε ελαφρώς το καπάκι και τοποθετούμε κάθετα στο hood. Κατόπιν, εξάγεται το cryovial από την κατάψυξη και τοποθετείται εντός του υδατόλουτρου. Δεν αφήνουμε το cryovial, αλλά το κρατάμε, προσέχοντας το νερό να μην έρχεται σε επαφή με το καπάκι αλλά ταυτόχρονα να καλύπτει τον μεγαλύτερο όγκο του παγωμένου περιεχομένου.

Μετά την πάροδο μερικών λεπτών (συνήθως 3-4 min) το περιεχόμενο του cryovial υγροποιείται και φαίνεται εντός του μία μικρή ποσότητα πάγου. Στη φάση αυτή, το βγάζουμε γρήγορα από τα υδατόλουτρο, σκουπίζουμε και ψεκάζουμε με αιθανόλη 70%. Αμέσως, το τοποθετούμε στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Εκεί, τοποθετούμε άμεσα το vial σε στατώ και ανοίγουμε γρήγορα και κάθετα το καπάκι του, προσέχοντας να μην έρθει σε επαφή η αιθανόλη με τα κύτταρα. Κατόπιν με σιφώνιο των 2ml παίρνουμε το περιεχόμενο και το τοποθετούμε στον δοκιμαστικό σωλήνα με τα 4ml θρεπτικού.

Το 15άρι falcon με το θρεπτικό και τα κύτταρα φυγοκεντρείται για 5 min σε 1000rpm και σε θερμοκρασία άνω των 20°C (20-25°C). Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης γράφουμε τα στοιχεία των κυττάρων στη φλάσκα (όνομα κυτταρικής σειράς, ημερομηνία παγώματος και ξεπαγώματος, passage).

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο αναρροφάται με γυάλινη πιπέτα Pasteur και κατόπιν το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται καλά, σε 5ml θρεπτικού μέσου, DMEM 1g/mol Glucose (low Glucose). Τέλος, το επαναδιαλυτοποιημένο περιεχόμενο λαμβάνεται με 5άρα ή 10άρα πιπέτα και τοποθετείται στη φλάσκα. Εκεί, γίνεται ξανά ήπια επαναδιαλυτοποίηση και κλείνοντας τη φλάσκα, βγάζουμε οριζόντια από το hood, την τοποθετούμε στο μικροσκόπιο και εξετάζουμε τη μορφή των ξεπαγωμένων κυττάρων. Φυσιολογικά, τα νευρικά κύτταρα, πρέπει να είναι επιπλέοντα, πολλά, σχετικά μεγάλα, στρογγυλά, διαπερατά από το φως και χωρίς συσσωματώματα.

Μετά τη μικροσκοπική παρατήρηση, τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο, σε συνθήκες 37°C και 5.0% CO<sub>2</sub>.

### **3.3.1.2. ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ**

Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, η θρυψίνη επιδρά πρωτεολύοντας πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων τόσο στην επιφάνεια της φλάσκας όσο και σε γειτονικά τους κύτταρα. Αυτό είναι αναγκαίο σε περιπτώσεις κορεσμού (κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας κατά 80-90%), σε περιπτώσεις πολλών και μεγάλων συσσωματωμάτων αλλά και πριν από τους περισσότερους χειρισμούς που απαιτείται η χρήση ή η μεταφορά κυττάρων. Η κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα πέραςμα (passage).

Ξεπαγώνει η θρυψίνη και τα θρεπτικά υλικά και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 37°C. Αφαιρείται με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό που υπάρχει στη φλάσκα και τοποθετείται 1-1,5 ml θρυψίνη. Η φλάσκα κλείνει και με ήπιες κινήσεις, επιδιώκουμε όλα τα κύτταρα να διαβρέχονται από θρυψίνη. Παρατηρούμε γρήγορα στο μικροσκόπιο. Τοποθετούμε άμεσα τη φλάσκα στον επωαστικό κλίβανο για 1-2 λεπτά. Βγάζουμε αμέσως μετά το πέρας (συνήθως του πρώτου λεπτού), εξετάζουμε στο μικροσκόπιο: ιδανικό είναι όλα τα κύτταρα – μεμονωμένα ή σε συσσωματώματα, να επιπλέουν. Αν αυτό δεν συμβαίνει, μπορούμε να κινήσουμε ελαφρά τη φλάσκα με κινήσεις αριστερά δεξιά υπό γωνία και να ξανά παρατηρήσουμε ή να τοποθετήσουμε για μισό λεπτό και πάλι στον κλίβανο. Προσέχουμε ιδιαίτερα τον χρόνο έκθεσης των

κυττάρων στη θρυψίνη, γιατί η παρατεταμένη πρωτεόλυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροτοξική δράση.

Κατόπιν, τοποθετείται η φλάσκα σε όρθια θέση στο hood και προστίθενται σε αυτή 4ml θρεπτικού μέσου, τα οποία και σταματούν τη δράση της θρυψίνης. Έπειτα, όλο το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε falcon των 15ml και φυγοκεντρείται (5min 1000rpm, 20-25 °C).

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται περαιτέρω ή επανατοποθετούνται στη φλάσκα ανάπτυξης, η οποία συμπληρώνεται έπειτα με θρεπτικό υλικό DMEM 1g/mol Glucose.

### **3.3.1.3. ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Ξεπαγώνουμε τα υλικά που θα χρειαστούμε και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 37°C, τα οποία είναι το FBS, η θρυψίνη και τα θρεπτικά που χρησιμοποιούμε. Ετοιμάζουμε παράλληλα και δύο κινουρίους σωλήνες για το πάγωμα των κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη - cryovial. Πάνω στα δύο cryovial γράφουμε τα στοιχεία των κυττάρων που πρόκειται να παγώσουμε (όνομα, ημ/νια, passage). Συνήθως παγώνουμε δύο-δύο cryovial αλλά αυτό εξαρτάται κι από το συνολικό αριθμό των κυττάρων που έχουμε, από το αν και πόση ποσότητα ανακαλλιέργεια θα βάλουμε και λοιπά.

Υπολογίζουμε πόσα ml από το FBS χρειαζόμαστε (για δύο cryovial και ανακαλλιέργεια), λαμβάνοντας υπόψη ότι απαιτούνται 0,9ml FBS ανά vial. Ξεκινάμε και κάνουμε τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, όπως αυτή περιγράφηκε στην παραπάνω παράγραφο. Μόλις τελειώσει η φυγοκέντρωση, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύεται στην ποσότητα του βόειου ορού που έχει υπολογιστεί προηγουμένως. Κατόπιν, σε κάθε cryovial τοποθετούνται 0,9 ml FBS με τα κύτταρα. Το υπόλοιπο, επανατοποθετείται στη φλάσκα και συμπληρώνεται (έως τα 5ml) DMEM Low Glucose. Η φλάσκα επανατοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο. Γενικά, προσέχουμε να τακτοποιήσουμε όλες τις «εκκρεμότητες» στο γύρω χώρο πριν προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα του παγώματος.

Μόλις είμαστε έτοιμοι, τοποθετούμε 0,1ml DMSO (εξαιρετικά κυτταροτοξικό), κλείνουμε άμεσα το cryovial και με συνεχόμενη ανάδευση πάνω- κάτω, τοποθετούμε σε κατάψυξη, κατά το γρηγορότερο δυνατόν. Τέλος, σημειώνεται σε κατάλληλο αρχείο, η θέση του/ των cryovial.

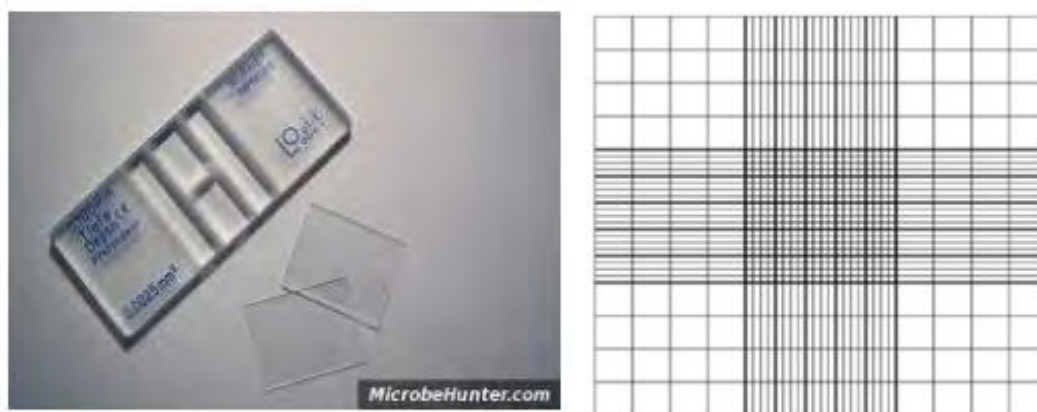
### **3.3.1.4. ΜΕΤΡΗΜΑ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΙΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Για τους μετέπειτα χειρισμούς των κυττάρων (πχ. στρώσιμο σε πλάκες κυτταροκαλλιέργειας (well-plates) με 6x και 24x wells), για να προστεθούν ουσίες και κατόπιν, συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος, να μετρηθεί με ανοσολογικές μεθόδους η κυτταρική απόκριση, για μετέπειτα εξέταση με ανασοϊστοχημικές τεχνικές

(IHC) και λοιπά, απαιτείται μέτρηση του κυτταρικού πληθυσμού και ισόποση τοποθέτησή του σε well plate.

Κατά τη διαδικασία λοιπόν του μετρήματος του κυτταρικού πληθυσμού, ξεκινάμε με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης. Μετά την επαναδιαλυτοποίηση (που στην περίπτωση της μέτρησης πρέπει να είναι ακριβής), παίρνουμε 10μl (με κατάλληλη πιπέτα) από τα κύτταρα και τα εισάγουμε εντός της καλυπτρίδας στο αιμοκυτταρόμετρο neubaueg.

Κατόπιν τοποθετούμε την πλάκα neubaueg στο μικροσκόπιο. Εκεί, εστιάζουμε στα τεταρτημόρια και ξεκινάμε να μετράμε για κάθε ένα τα κύτταρα που βρίσκονται εκεί.



**Εικόνα 10**

*Αριστερά απεικονίζεται το αιμοκυτταρόμετρο neubaueg με τις καλυπτρίδες και δεξιά σε μεγέθυνση όπως φαίνονται τα τεταρτημόρια στο μικροσκόπιο.*

Όπως, φαίνεται και στην εικόνα πάνω δεξιά, αρχικά εστιάζουμε στο σταυρό και κατόπιν από το κέντρο του μπορούμε να ξεχωρίσουμε τα τεταρτημόρια (αλλά και να προσανατολιστούμε). Συνήθως το 1ο πάνω αριστερά τεταρτημόριο, ονομάζεται Α, το αμέσως διπλανό του Β, κάτω από το Β είναι το Γ και αριστερά του Γ (δηλ. κάτω από το Α) είναι το Δ. έτσι, η μέτρηση γίνεται από το Α→Δ. Για κάθε τεταρτημόριο, σημειώνεται ο αριθμός των κυττάρων που βρέθηκε. Κατόπιν, βγαίνει ο μέσος όρος των κυττάρων ανά τεταρτημόριο:  $\mu.o. = (A+B+\Gamma+\Delta)/4$  και αυτός έπειτα πολλαπλασιάζεται με 10.000. Έτσι, ξέρουμε κατά προσέγγιση τον κυτταρικό πληθυσμό που διαθέτουμε, ανά ml.

Έπειτα, για να υπολογιστούν τα ml (από το επαναδιαλυτοποιημένο κυτταρικό ίζημα της φυγοκέντρωσης) και έχοντας ήδη υπολογίσει ανάλογα με το τι θα κάνουμε μετά, το συνολικό πληθυσμό που χρειαζόμαστε, κάνουμε το εξής:

«διαιρούμε→ (κύτταρα που θέλουμε ) / (κύτταρα που έχουμε)»

Η διαίρεση αυτή μας δίνει τον όγκο που πρέπει να πάρουμε από το falcon που περιέχει τα κύτταρα, προκειμένου να συνεχιστεί η πειραματική διαδικασία η οποία επιτελείται. Επειδή, συνήθως έχει περάσει αρκετή ώρα από την πρώτη

επαναδιαλυτοποίηση, αυτή γίνεται εκ νέου, ώστε ο κυτταρικός πληθυσμός να είναι ομοιογενής στο θρεπτικό.

Ο όγκος που λαμβάνεται, τοποθετείται σε νέο falcon, προκειμένου να φυγοκεντρηθεί (όμοια, 5 λεπτά 1000rpm 20-25°C) και να χρησιμοποιηθεί εν συνεχεία, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα συνήθως επιστρέφονται για ανακαλλιέργεια.

Ανάλογα με την πειραματική διαδικασία που επιτελείται, μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, επαναδιαλυτοποιούμε στην υπολογισμένη ποσότητα θρεπτικού DMEM cis και μοιράζουμε στα wells που θα χρειαστούμε. Το DMEM cis περιέχει 10% charcoal inactivated FBS (CIS charcoal inactivated serum, περιγράφεται παρακάτω), 1% L-γλουταμίνη διαλυμένα σε DMEM 1g/mol χωρίς phenol red.

Στην περίπτωση, που απαιτείται η μελέτη του αποτελέσματος της κυτταρικής αποκρίσεως με ανοσοϊστοχημεία, έχει προηγηθεί το στρώσιμο αποστειρωμένων καλυπτρίδων (coverslips) εντός των wells στο plate. Μετά την τοποθέτηση των καλυπτρίδων, που γίνεται στον χώρο των κυτταροκαλλιιεργειών, το plate παραμένει στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής, ανοιχτό και υπό τη δράση του UV light, για τουλάχιστον μισή ώρα, προκειμένου να είναι πλήρως αποστειρωμένο. Η πλάκα που φέρει καλυπτρίδες, κατά τη διαδικασία του στρωσίματος αντιμετωπίζεται όμοια με αυτή που δε φέρει.

Τέλος, μετά την τοποθέτηση των κυττάρων εντός των πηγαδιών, το plate κλείνει και γίνεται μία περιφερική κίνηση προκειμένου να είναι ομοιόμορφη η κατανομή των κυττάρων εντός των πηγαδιών. Προσοχή, να μην γίνεται έντονη ανακίνηση, διότι λόγω στατικού ηλεκτρισμού και δύνης τα κύτταρα τείνουν να συγκροτούν συσσωματώματα στο κέντρο. Πριν, τοποθετηθούν στον επωαστικό κλίβανο, εξετάζεται η εικόνα τους μικροσκοπικά.

### **3.3.1.5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Μετά το πέρας των δεδομένων ημερών γίνεται συλλογή των κυττάρων (Harvesting). Κατά τη διαδικασία της συλλογής των κυττάρων από το πηγαδάκι, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και γίνεται μια πλύση με PBS 1x (500μl). Έπειτα, χρησιμοποιώντας το κατάλληλο μηχάνημα scraper (ράβδο με πλαστική εύκαμπτη επιφάνεια στην άκρη) σύρουμε καθόλη την επιφάνεια του well ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα και τα συλλέγουμε σε αποστειρωμένα erpendorfs, τα οποία βρίσκονται σε πάγο. Πραγματοποιούμε και μια δεύτερη πλύση με PBS 1x (500μl) και πάλι scraping. Επειδή τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι εύκολο να ξεκολλήσουν από τον πάτο του well, σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες, το scraping πραγματοποιήθηκε απευθείας στο θρεπτικό υλικό χωρίς. Μετά τη συλλογή των κυττάρων στα erpendorfs, φυγοκεντρούνται για 5min στα 1500rpm σε RT. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα με τα κύτταρα είτε φυλάσσεται στους -80°C είτε χρησιμοποιείται για ακόλουθη πειραματική διαδικασία. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να αποθηκεύσουμε τα κύτταρα στους -80°C με το PBS ή το θρεπτικό τους γιατί υπάρχει ο κίνδυνος λύσης.

### **3.3.1.6. ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ CIS-FBS**

Για την απενεργοποίηση του FBS, δηλαδή την απόρριψη όλων των ενεργών βιολογικών συστατικών του, όπως είναι για παράδειγμα οι ορμόνες, προς παρασκευή charcoal inactivated FBS (cis) εφαρμόστηκε κατεργασία με ενεργό άνθρακα σύμφωνα με το πρωτόκολλο καθαρισμού. Ο ενεργός άνθρακας έχει τη δυνατότητα να προσδένεται σε λιπόφιλα μόρια κι ως εκ τούτου να αφαιρεί ορμόνες (ή έστω να μειώνει σημαντικά τα επίπεδά τους) όπως ανδρογόνα, οιστραδιόλη, προγεστερόνη, κορτιζόλη, T3 και T4 από το FBS. Οι συγκεκριμένες λιπιδικές ορμόνες του ορού είναι απαραίτητο να αφαιρεθούν ώστε να είναι δυνατή η εκτίμηση της επίδρασής τους μετά την εξωγενή τους προσθήκη, η οποία και είναι απαραίτητη για την περαιτέρω μελέτη και την πρόοδο του πειράματος.

### **3.3.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

#### **3.3.2.1. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ – ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ**

Με την ανοσοϊστοχημική μελέτη, επιτρέπεται ο προσδιορισμός μορίων τοπικά, μέσα στον ιστό ή το κύτταρο που μελετάται με τη χρήση συγκεκριμένων, φθορίζοντων αντισωμάτων, ειδικά για κυτταρικά οργανίδια αλλά και για τα υπό μελέτη μόρια. Η αρχή της διαδικασίας, λαμβάνει χώρα στην αίθουσα των κυτταροκαλλιεργειών, όπου πριν από την προσθήκη των κυττάρων στα ειδικά πηγαδάκια, τοποθετούνται καλυπτρίδες (coverslips). Μετά την τοποθέτησή τους, οι καλυπτρίδες αφήνονται για τουλάχιστον μισή ώρα υπό την ακτινοβολία του UV. Κατόπιν της αποστείρωσης, όλες οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα είναι όμοιες με εκείνες που αναλύθηκαν παραπάνω, για τη μέτρηση και το στρώσιμο των κυττάρων. Επιπλέον, όλοι οι κυτταρικοί χειρισμοί (αλλαγή θρεπτικού μέσου, φύλαξη, μικροσκοπική παρατήρηση), γίνονται κατά πανομοιότυπο τρόπο, είτε υπάρχουν είτε όχι καλυπτρίδες.

Εφόσον λοιπόν, έχουν γίνει όλοι οι απαραίτητοι πειραματικοί χειρισμοί, προκειμένου να εξεταστούν τα δείγματα ανοσοϊστοχημικά, απαιτείται ο χειρισμός τους με μία συγκεκριμένη μεθοδολογία, που περιλαμβάνει τη μονιμοποίηση (fixation), την προσθήκη πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων, και εν τέλη την προσκόλλησή των καλυπτρίδων σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες και την εξέταση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού. Στην παρούσα μελέτη δεν πραγματοποιήθηκε προσθήκη αντισωμάτων, αλλά επώαση ζωντανών κυττάρων με κατάλληλους φθορίζοντες δείκτες, όπως το Hoechst 33342 (μπλε χρωστική), που αποτελεί μια χρωστική που σημαίνει πυρηνικό DNA ζωντανών ή μη κυττάρων και έπειτα απευθείας μονιμοποίηση.

Αρχικά, δημιουργείται ένα mix θρεπτικού υλικού low glucose, στο οποίο προστίθεται η χρωστική Hoechst σε αναλογία 1:1000. Για παράδειγμα, στα 2ml θρεπτικού γίνεται προσθήκη 2μl Hoechst. Ακολουθεί επώαση 20-30 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο. Στη συνέχεια, το plate απομακρύνεται από το χώρο των κυτταροκαλλιεργειών και η υπόλοιπη διαδικασία λαμβάνει χώρα στον πάγκο του εργαστηρίου. Ακολουθεί έκπλυση με PBS (500μl σε κάθε well) και μονιμοποίηση των κυττάρων.

Κατά τη διαδικασία της μονιμοποίησης, γίνεται προσθήκη 500μl κρύας μεθανόλης (-20°C) σε κάθε well, ώστε να καλύπτει όλη την επιφάνειά του και έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται στους -20°C για 10min. Μετά το πέρας των 10 λεπτών, αφαιρούμε όλη τη μεθανόλη και ακολουθούν 2 πλύσεις με κρύο PBS 1x.



Το τελευταίο βήμα περιλαμβάνει τη σταθεροποίησή τους, από την πλευρά που έχουν γίνει οι επωάσεις, με την προσθήκη μίας σταγόνας ρυθμιστικού διαλύματος polyvinyl alcohol PVA, στην αντικειμενοφόρο πλάκα, όπως απεικονίζεται στην εικόνα πάνω. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες, τοποθετούνται σε ειδική κασετίνα, όπου αφήνονται στους 4°C, για να στεγνώσουν. Το ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει polyvinyl alcohol χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση των καλυπτρίδων και την προστασία των δειγμάτων από την εξασθένηση του φθορισμού των φθορίζουσών χρωστικών, Hoechst και της GFP πρωτεΐνης.

Σε δεύτερο χρόνο γίνεται η παρατήρηση των δειγμάτων σε μικροσκόπιο φθορισμού Leica 2000 και η λήψη εικόνων με ψυχόμενη κάμερα φθορισμού Qimaging, χορηγία του ιδρύματος Μποδοσάκη στην Δρ. Άννα – Μαρία Ψαρρά.

### **3.3.2.2. ΛΥΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (SONICATION) ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ (ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD)**

Αρχικά, γίνεται λύση του κυτταρικού ιζήματος με προσθήκη lysis buffer, ο όγκος του οποίου εξαρτάται από την ποσότητα του εκάστοτε ιζήματος (συνήθως 40-70μl). Πραγματοποιείται μια μικρή ανάδευση με την πιπέτα και έπειτα, τα κύτταρα επωάζονται για 20-25 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια, ακολουθεί η διαδικασία της λύσης με χρήση υπερήχων (sonication).

Κατά τη διαδικασία του sonication, ουσιαστικά, θέλουμε να επιτύχουμε κατά το δυνατόν αποτελεσματικότερη λύση των κυττάρων. Συνήθως, επαναλαμβάνουμε 5 κύκλους όπου τα κυτταρικά περιεχόμενα εκτίθενται για 1'' στους υπερήχους που εκπέμπονται από την αντίστοιχη συσκευή (Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S). Οι κύκλοι απέχουν μεταξύ τους διάστημα ίσο με μισό λεπτό.

Εφόσον ολοκληρωθούν οι δεδομένοι κύκλοι, τα δείγματα είναι πλέον έτοιμα για περαιτέρω επεξεργασία. Στην προκειμένη περίπτωση, γίνεται μέτρηση του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου, με τη μέθοδο Bradford. Αυτό αποσκοπεί στον μετέπειτα



υπολογισμό της ποσότητας από τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθεί για να γίνει ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Η μέθοδος Bradford έχει βασική αρχή την αλλαγή της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία υπό όξινες συνθήκες, μπορεί από την καφέ-κόκκινη να μετατραπεί στη μπλε μορφή της, προσδεδεμένη με τις πρωτεΐνες που εμπεριέχονται στο προς εξέταση διάλυμα. Η μεταβολή της απορρόφησης μετράται στα 595nm.

Πρακτικά, ετοιμάζονται τόσο δοκιμαστικοί σωλήνες όσα και τα δείγματα που διαθέτουμε και ένας επιπλέον, που θα χρησιμοποιηθεί ως τυφλό, για το μηδενισμό του φωτομέτρου. Επειδή, το απόθεμα του αντιδραστήριου Bradford που διατίθεται στο εργαστήριο είναι 5X, χρησιμοποιώντας το νόμο της αραιώσης προκύπτει το επιθυμητό 1X. Από αυτό, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετείται 1ml αντιδραστήριου Bradford και κατόπιν σχεδόν παράλληλα σε όλα, 1μl από το κάθε δείγμα. Μετά από άμεσο vortex, τα δείγματα τοποθετούνται σε σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Μόλις ολοκληρωθεί ο χρόνος αντίδρασης, τα δείγματα αφαιρούνται από το σκοτάδι και φωτομετρούνται στα 595nm, μετά από μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου με το τυφλό.

Η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος υπολογίζεται από τον τύπο  $y=0,0345x+0,01$ , όπως αυτός προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA, που έγινε στο εργαστήριο. Τα δεδομένα αναλύονται με τη βοήθεια του προγράμματος excel, παρέχοντας τελικώς την ακριβή σύσταση των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση.

### 3.3.2.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ - ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Μετά τον υπολογισμό της σύστασης των δειγμάτων που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, προχωρούμε στην παρασκευή τους. Τα δείγματα ηλεκτροφόρησης περιέχουν τα εξής:

- Total cell extract
- Tris HCl pH 7,5
- Sample buffer 4x (π.χ. 20μl σε 80μl συνολικού διαλύματος)

Οι υπόλοιποι όγκοι, δηλαδή του Tris-HCl και του κυτταρικού εκχυλίσματος καθορίζονται ανάλογα με την πρωτεϊνική συγκέντρωση του κυτταρικού εκχυλίσματος. Επιθυμητή είναι η ποσότητα 30-50μg ανά διαδρομή ηλεκτροφόρησης.

Μετά την ετοιμασία τους, τα δείγματα φόρτωσης παραμένουν στον πάγο. Παράλληλα ξεκινάμε την κατασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης. Πρώτα, παρασκευάζεται η γέλη διαχωρισμού (separating gel), η σύσταση της οποίας περιλαμβάνει τα εξής:

Συστατικό	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	
	10%	7,5%

ddH <sub>2</sub> O	2,425 ml	2,730 ml
Tris HCl 1,5 M pH= 8,8	1,25 ml	1,25 ml
SDS 10%	50 μl	50μl
Bis Acr. 40%	1,25 ml	0,93 ml
Temed	2.5 μl	2,5 μl
APS 10%	25 μl	25 μl

Για να ξεκινήσουμε την όλη διαδικασία, πρέπει να έχει ετοιμαστεί και στηθεί η συσκευή κατασκευής του gel. Ουσιαστικά, πρέπει να εφαρμοστούν και να κλείσουν σωστά τα δύο τζάμια, να τοποθετηθούν στη βάση τους και να γίνει έλεγχος για τυχόν διαρροή. Είναι επίσης σημαντικό, κατά την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού να μπουν τα συστατικά με τη σειρά που παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα. Τα τελευταία τρία συστατικά, απαιτείται να εισαχθούν κατά το δυνατόν ταυτόχρονα.

Μόλις ετοιμαστεί το gel, αναδεύεται και άμεσα, εκχύνεται μεταξύ των δύο τζαμιών. Ταυτόχρονα, στην πάνω περιοχή μένει ένα κενό 2-3 εκατοστών για να τοποθετηθεί σε δεύτερο χρόνο το gel προσκόλλησης. Στο κενό εκείνο τοποθετείται ισοπροπανόλη, προκειμένου να διατηρηθεί υγρό και να μην έρθει σε επαφή με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας, κατά το χρόνο πήξης του υπόλοιπου όγκου του. Το οξυγόνο δρα ανασταλτικά στον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Ο χρόνος πήξης είναι περίπου 20 λεπτά.

Με την πάροδο του χρόνου πήξης, ξεκινάμε τη δημιουργία της γέλης προσκόλλησης (stalking gel), η σύσταση της οποίας είναι η ακόλουθη:

ddH <sub>2</sub> O	2,025 ml
Tris HCl pH= 6,8	0,21 ml
SDS 10%	25 μl
Bis Acr.40%	0,25 ml
Temed	2,5 μl
APS 10%	12,5 μl

Κατά την δημιουργία του gel αυτού, πριν εισαχθούν τα τρία τελευταία συστατικά, που είναι άκρως σημαντικό να μπουν σχεδόν ταυτόχρονα και το gel να εισαχθεί στη βάση του, αφαιρείται η ισοπροπανόλη από το πάνω μέρος του διαχωριστικού gel, με απόχυσή της στο πλάι. Κατόπιν, τοποθετούνται τα τρία τελευταία συστατικά, γίνεται γρήγορα ομογενοποίηση και τέλος αποχύνεται το νέο gel στα τζαμάκια στη βάση, προκειμένου να πήξει και παράλληλα να κολλήσει με το gel διαχωρισμού. Αμέσως

μόλις αποχυθεί το υγρό gel, εισάγονται τα χτενάκια που θα δημιουργήσουν τα πηγαδάκια φόρτωσης. Ο χρόνος πήξεως είναι περίπου 20 λεπτά.

Ενώ αναμένεται η ολοκλήρωση της αντίδρασης πολυμερισμού της ακρυλαμίδης, ενεργοποιούμε τη συσκευή Heat Blocker, ρυθμίζοντας τη θερμοκρασία στους 95°C. Παράλληλα, στήνουμε και τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στήνοντας την ειδική κασετίνα και κατόπιν γεμίζοντας εξωτερικά με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (δεύτερης χρήσης). Εφόσον, έχει πήξει το gel, τα τζαμάκια εξάγονται από τη βάση τους και τοποθετούνται στην κασετίνα που έχουμε εισάγει στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Έπειτα, αφαιρείται το χτενάκι, προκειμένου να ετοιμαστούν τα πηγαδάκια. Μόλις όλα αυτά ετοιμαστούν, γεμίζουμε ως το χείλος, εντός της κασετίνας με φρέσκο διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Σε επόμενο στάδιο, εξάγουμε τα δείγματα από τον πάγο και τα τοποθετούμε στο Heat Blocker (5min ή 3min ανάλογα με το αν έχουν υποστεί ξανά θέρμανση ή όχι).

Τέλος, τα δείγματα υπόκεινται σε ελαφρό spin για χρόνο 3" και κατόπιν, φορτώνονται στα πηγαδάκια. Ο όγκος φόρτωσης για τα δείγματα είναι 15-16μl (30-50μg πρωτεΐνης) και παράλληλα, σε παρακείμενο πηγαδάκι, φορτώνονται 1,2μl δείκτη γνωστού μοριακού βάρους.

Μετά την ολοκλήρωση της φόρτωσης των δειγμάτων, τοποθετείται προσεχτικά, το καπάκι με τα ηλεκτρόδια της συσκευής. Είναι πολύ σημαντικό, τα χρώματα των επαφών (μαύρο και κόκκινο) και των ηλεκτροδίων να ταυτίζονται. Ενεργοποιείται και ρυθμίζεται το τροφοδοτικό ρεύματος στα 0,02mA. Ξεκινάμε την εφαρμογή της τάσης. Το gel αφήνεται να «τρέξει» για όσο χρόνο χρειαστεί.

Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία, απενεργοποιείται το τροφοδοτικό και γίνονται οι προετοιμασίες για να γίνει ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης

#### **3.3.2.4. ΕΞΙΣΟΡΡΟΠΗΣΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ**

Καθώς ολοκληρωθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ξεκινάει το επόμενο βήμα, στο οποίο γίνεται η εξισορρόπηση, δηλαδή η εμβάπτιση της μεμβράνης, των σφουγγαριών, των χαρτιών whatman, καθώς και του gel, στο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς για 10 λεπτά. Πρακτικά, σε δοχείο που χωράει τη μεμβράνη, τα χαρτιά whatman και τα σφουγγαράκια, τοποθετείται φρέσκο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και εμβαπτίζονται όλα τα παραπάνω μέσα σε αυτό.

Παρομοίως, σε δεύτερο δοχείο, τοποθετείται χρησιμοποιημένο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς και εμβαπτίζεται εντός του το gel. Μετά το πέρας του δεκαλέπτου, στήνεται η κασετίνα στην οποία θα τοποθετηθούν τα περιεχόμενα των δύο δοχείων.

Κατά το στήσιμο αυτής της κασετίνας, εργαζόμαστε ως εξής:

Η κασετίνα τοποθετείται ανοιχτή, με την μαύρη πλευρά προς τα κάτω και την άσπρη προς τα πάνω. Στην κάτω πλευρά, τοποθετείται πρωτίστως, ένα σφουγγαράκι, όχι

πολύ στραγγισμένο και έπειτα δύο χαρτιά whatman. Παίρνοντας το δεύτερο χαρτί whatman από το διάλυμα, επιχειρείται η ταυτόχρονη «αλίευση» και της μεμβράνης, η οποία τοποθετείται ακριβώς πάνω από το δεύτερο χαρτί. Κατόπιν το gel τοποθετείται ακριβώς πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, προσέχοντας όσο γίνεται να είναι ευθυγραμμισμένο με αυτή αλλά και όλες οι περιοχές που έχουν μπάντες να εφάπτονται στη μεμβράνη. Μετά, τοποθετούνται εκ νέου δύο χαρτιά whatman. Σημαντικό είναι, σε κάθε βήμα από την τοποθέτηση της μεμβράνης και έπειτα να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην πλήρη εφαρμογή των αντικειμένων μεταξύ τους, διότι η ύπαρξη φυσαλίδων, θα έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη κενών σημείων στη μεμβράνη. Τέλος, τοποθετείται και το δεύτερο σφουγγαράκι, κλείνοντας την κασετίνα πολύ προσεκτικά και τοποθετώντας τη στη συσκευή που θα γίνει η ηλεκτρομεταφορά.

Η συσκευή αυτή είναι πολύ σημαντικό να είναι βυθισμένη σε πάγο γιατί είναι επικίνδυνο, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται από την εφαρμογή της τάσης και από το κύκλωμα που δημιουργείται κατά την ηλεκτρομεταφορά, ενδέχεται να καταστραφούν οι πρωτεΐνες που επιδιώκουμε να διατηρούν την πρωτοταγή δομή τους. Έχοντας, λοιπόν, ήδη τοποθετήσει την παγοκύστη εντός της συσκευής, τοποθετούμε την κασετίνα με συγκεκριμένη φορά και κατόπιν γεμίζουμε όλο το δοχείο με φρέσκο διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς. Η συσκευή ηλεκτρομεταφοράς τοποθετείται μέσα σε (φελιζολένιο) κουτί με μονωτικές επιφάνειες, ανάμεσα από επιπλέον παγοκύστες. Τοποθετείται τέλος, το καπάκι με τα ηλεκτρόδια, προσέχοντας να γίνει στη σωστή πλευρά η εφαρμογή και ενεργοποιείται το τροφοδοτικό. Η διαδικασία αυτή, απαιτεί τάση ίση με 0.35 A και χρόνο πραγματοποίησης 70 λεπτά.

### **3.3.2.5. BLOCKING ME ΓΑΛΑ ΚΑΙ ΕΠΩΑΣΗ ME ΠΡΩΤΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ**

Μόλις επέλθει ο χρόνος ηλεκτρομεταφοράς, το τροφοδοτικό απενεργοποιείται και η μεμβράνη (που πλέον φέρει τις πρωτεΐνες που είχαν ηλεκτροφορηθεί), τοποθετείται εντός PBST 1x προκειμένου να σημειωθεί ο δείκτης γνωστού μοριακού βάρους με μολύβι, και να μαρκαριστεί παράλληλα και η «καλή» της πλευρά, δηλαδή στη πλευρά που έχουν μεταφερθεί οι πρωτεΐνες. Με αυτό τον τρόπο, η μεμβράνη εκτός των άλλων έχει πλυθεί με PBST 1x για μία φορά.

Στη συνέχεια, έπεται το επόμενο βήμα, το οποίο έχει ως σκοπό την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων από τα αντισώματα που εμπεριέχονται στο γάλα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα εμφάνισης ψευδούς θετικού αποτελέσματος (ή μεγάλου background), λόγω μη ειδικής σύνδεσης του αντισώματος (που θα εφαρμοστεί). Η διαδικασία αυτή, περιλαμβάνει την επώαση της μεμβράνης (μία ώρα υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου), σε γάλα, 10%.

Παρασκευάζεται το διάλυμα του γάλακτος, αραιώνοντας δέκα μέρη σκόνης γάλακτος σε 100 μέρη PBST 1x (10% γάλα σε PBST) και αναδεύοντας καλά γα να γίνει η ομογενοποίησή του.

Μετά την πάροδο της μίας ώρας επώασης, γίνεται μία πλύση με PBST 1x και κατόπιν τοποθετείται η μεμβράνη στο πρώτο αντίσωμα. Σε αυτό το βήμα, το αντίσωμα που πρόκειται να επωαστεί η μεμβράνη (αντίσωμα έναντι της υπό μελέτη πρωτεΐνης, πρώτο αντίσωμα), έχει ήδη βγει από τους -20°C και έχει τοποθετηθεί σε πάγο, προκειμένου να ξεπαγώσει ομαλά. Ενώ λοιπόν αυτό έχει ξεπαγώσει, αναδεύεται ομαλά για να ομογενοποιηθεί και κατόπιν ετοιμάζεται το σακουλάκι στο οποίο θα εισαχθεί η μεμβράνη για να επωαστεί με το αντίσωμα. Πρακτικά, η μεμβράνη περικλύεται ερμητικά μεταξύ δύο νάιλον διαφανειών από τρία μέρη και πριν κλείσει και από το τέταρτο μέρος, εισάγεται σε αυτή την αυτοσχέδια σακούλα, το αντίσωμα. Κατόπιν, κλείνεται με θερμοκόλληση και από την τέταρτη πλευρά, τοποθετείται σε μεγάλο τρυβλίο και εισάγεται στον ψυχρό θάλαμο (4°C) , όπου θα παραμείνει εκεί υπό ανάδευση, για επώαση καθόλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight).

### **3.3.2.6. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΔΕΥΤΕΡΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ – WESTERN BLOT**

Την επόμενη μέρα, το πρώτο αντίσωμα μαζεύεται στο σωληνάκι (falcon) στο οποίο βρισκόταν, και η μεμβράνη πλένεται πέντε φορές με PBST 1x , προκειμένου να προετοιμαστεί για την προσθήκη του δεύτερου αντισώματος (αντίσωμα έναντι των αντισωμάτων ορού ζώου από το οποίο έχει προκύψει το πρώτο αντίσωμα). Οι πλύσεις (5 πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών η κάθε μία, σε R.T και υπό ανάδευση), έχουν ως σκοπό να διώξουν την περίσσεια του αντισώματος και επομένως να μείνει στη μεμβράνη μόνο ότι έχει δέσει ειδικά, δηλαδή στους συγκεκριμένους επιτόπους, για τους οποίους φτιάχτηκε και προστέθηκε το αντίσωμα.

Το δεύτερο αντίσωμα είναι ειδικό έναντι κάποιων επιτόπων του πρώτου αντισώματος, αφού συνήθως αναγνωρίζει ειδικά σταθερές περιοχές επιτόπων IgG του πρωτογενούς αντισώματος και είναι ειδικό του ζώου από το οποίο έχει παραχθεί. Επιπλέον, είναι χημικά προσδεδεμένο με κατάλληλο προσδέτη horseradish peroxidase (HRP), υπεροξειδάση από χρένο, που επιτρέπει την ανίχνευσή του. Εφόσον, λοιπόν, έχουν λάβει χώρα οι πλύσεις από την επώαση του πρώτου αντισώματος, γίνεται η ίδια διαδικασία για την προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος. Ο χρόνος επώασης για το δεύτερο αντίσωμα είναι περίπου 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και η αραιώσή του είναι 1:50000.

Αφού αφαιρεθεί το δευτερογενές αντίσωμα, γίνονται εκ νέου 3 πλύσεις με PBST 1X, (δύο διάρκειας 5min και μία 8min). Κατόπιν, ετοιμάζεται η κασετίνα προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης Western.

Η μεμβράνη τοποθετείται σε γυάλινη επιφάνεια και διαβρέχεται με τα διαλύματα ECL A και ECL B, τα οποία ουσιαστικά είναι αυτά που επιτρέπουν την εμφάνιση του σήματος, αφού αποτελούν υποστρώματα για το ένζυμο HRP με το οποίο είναι συζευγμένο το δευτερογενές αντίσωμα. Γίνεται ανάμειξη κατάλληλου όγκου των δύο σε αναλογία 1:1 και με το διάλυμα αυτό επωάζεται η μεμβράνη νιτροκυταρίνης για 3min (σκοτάδι, R.T.). Ακολούθως, η μεμβράνη τοποθετείται εντός μιας πλαστικής

διαφανούς μεμβράνης σε μία ειδική κασέτα που δεν επιτρέπει τη διέλευση του φωτός.

Κατόπιν, έπεται η διαδικασία της εμφάνισης σήματος, η οποία λαμβάνει χώρα στο σκοτεινό θάλαμο εμφάνισης. Εκεί, ετοιμάζεται κατάλληλα ο χώρος ούτος ώστε να είναι δυνατή η πραγματοποίηση όλων των κινήσεων σε απόλυτο σκοτάδι.

Η διαδικασία περιλαμβάνει, την τοποθέτηση κατάλληλου μήκους φωτογραφικού film εντός τη κασετίνας και την επαφή του με τη μεμβράνη για τον ανάλογο χρόνο που απαιτείται. Έπειτα, το film εξάγεται από τη κασετίνα και εμβαπτίζεται διαδοχικά σε διάλυμα εμφάνισης developer υπό ανάδευση για περίπου 1min, ξεπλένεται ελαφρώς σε νερό και αμέσως τοποθετείται σε διάλυμα σταθεροποίησης σήματος fixer (ομοίως υπό ανακίνηση για χρονική διάρκεια περίπου ενός λεπτού). Μετά την ολοκλήρωση της εμβάπτισης του film στο fixer, αυτό ξεπλένεται εκ νέου σε νερό και κατόπιν εξετάζεται το αποτέλεσμα της εμφάνισης. Αναλόγως του αποτελέσματος επαναλαμβάνουμε, εκθέτοντας το film για διαφορετικό χρονικό διάστημα στη μεμβράνη.

### 3.3.2.7. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ TRIZOL

Η απομόνωση του ολικού RNA από κυτταρικά εκχυλίσματα N2a mtGFP και mtGFP ERβ πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου Trizol.

Το Trizol γενικά, είναι ένα φωτοευαίσθητο αντιδραστήριο που φυλάσσεται στους 4°C και χρησιμοποιείται στην απομόνωση του RNA, DNA και των πρωτεϊνών. Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του ολικού RNA. Όλα τα δείγματα διαλυτοποιούνται σε 0,5ml Trizol με επακόλουθη επώαση για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη πιπέτα αναδεύουμε ήπια μέχρι να γίνει ομοιογενές μείγμα. Ακολουθεί προσθήκη ανάλογης ποσότητας (100μl) CHCl<sub>3</sub> σε κάθε δείγμα, ισχυρή ανάδευση και επώαση για 2-5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνται όλα τα δείγματα για 15min, στους 4°C υπό 11.000rpm. Παρατηρούμε ότι μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης στο κάθε δείγμα σχηματίστηκαν 3 φάσεις. Η κάτω φάση περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, η μεσαία περιλαμβάνει το DNA και η πάνω το ολικό RNA, όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα.



Με ιδιαίτερα προσεκτικούς χειρισμούς συλλέγουμε την πάνω φάση (ολικό RNA) σε νέο erpendorf για το κάθε δείγμα, προσθέτουμε 250μl ισοπροπανόλης, αναδεύουμε πάρα πολύ καλά και αφήνουμε τα δείγματα για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση για 10min, στους 4°C υπό 11.000rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο, το οποίο περιλαμβάνει τον οργανικό διαλύτη (ισοπροπανόλη) και κρατάμε μόνο το ίζημα. Επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 1ml αιθανόλη 80% και φυγοκεντρούμε τα δείγματα για τρίτη φορά για 5min, στους 4°C υπό 8.000rpm. Στη συνέχεια αφαιρείται πολύ προσεκτικά η αιθανόλη από όλα τα δείγματα. Προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα, αφήνουμε ανοικτά τα καπάκια των erpendorf για να εξατμιστεί η αιθανόλη που έχει απομείνει. Τέλος, επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 15μl ddH<sub>2</sub>O (extra clear) και αποθηκεύονται στους -80°C.

Στη συνέχεια, κρίνεται απαραίτητη η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του ολικού RNA που έχει απομονωθεί από το κάθε δείγμα ξεχωριστά. Γι' αυτό το σκοπό, πραγματοποιείται αραιώση 1μl RNA προς 99μl ddH<sub>2</sub>O σε όλα τα δείγματα και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 260nm και έπειτα κανονικοποίηση στα 280nm.

### **3.3.2.8. ΠΕΨΗ ΜΕ DNάση**

Για την απομάκρυνση του DNA που πιθανόν έχει παραμείνει στα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο RQ1 RNase-Free DNase (Promega). Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία επιτυγχάνεται η αποικοδόμηση τόσο του δίκλωνου όσο και του μονόκλωνου DNA, σχηματίζοντας ελεύθερα 3' -OH άκρα.

Στην αντίδραση πέψης με DNάσες, είναι απαραίτητο να υπάρχει σε κάθε δείγμα 2μg RNA. Η ποσότητα του RNA που πρέπει να προστεθεί για κάθε δείγμα, υπολογίζεται με την μέθοδο των τριών. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο RQ1 RNase-Free DNase, προσθέτουμε στο κάθε δείγμα 1μl Reaction Buffer x10, 2μl από το ένζυμο DNase και συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O για τελικό όγκο 10μl. Στη συνέχεια ακολουθούν οι εξής διαδικασίες:

- Επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 30 λεπτά.
- Προσθήκη 1μl σε κάθε δείγμα από το αντιδραστήριο RQ1 DNase Stop Solution για να σταματήσει η αντίδραση.
- Θέρμανση όλων των δειγμάτων στους 65°C για 10 λεπτά για να απενεργοποιηθεί η DNάση.

### **3.3.2.9. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT-PCR)**

Η RT-PCR αποσκοπεί στην μετατροπή του RNA σε cDNA. Για να επιτευχθεί αυτή η μετατροπή εφαρμόζουμε το πρωτόκολλο SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Τα βήματα που ακολουθούμε για την διαδικασία σύνθεσης του cDNA έχουν ως εξής:

Σε ένα tube των 0,2ml, προσθέτονται τα εξής αντιδραστήρια:

Random primers	1μl
dNTPs (mM)	1μl
Total RNA	2μg
ddH <sub>2</sub> O	12μl

Θερμαίνουμε τα δείγματα στους 65°C για 5 λεπτά και έπειτα παγώνονται γρήγορα με την τοποθέτηση τους στο πάγο (chill on ice). Ακολουθεί ένα γρήγορο spin κι έπειτα επιστρέφουμε και πάλι τα δείγματα στον πάγο.

Στη συνέχεια προσθέτονται τα εξής αντιδραστήρια σε κάθε δείγμα:

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

Αναδεύουμε ήπια όλα τα δείγματα κι έπειτα ακολουθεί επώαση στους 25°C για 2min. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη 1μl από το ένζυμο SuperScript II RT, ανάδευση με την πιπέτα και επώαση των δειγμάτων στους 25°C για 10min. Μετά το πέρας των δέκα λεπτών, θερμαίνουμε τα δείγματα στους 42°C για 50min κι έπειτα στους 70°C για 15min με σκοπό την απενεργοποίηση της αντίδρασης. Τέλος, τα νεοσχηματιζόμενα cDNA αποθηκεύονται στους -20°C.

### 3.3.2.10. REAL-TIME PCR

Στην παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο SYBR Select Master Mix (Applied Biosystem). Το Master Mix αποτελεί μίγμα AmpliTaq DNA πολυμεράσης (UP), SYBR GreenER χρωστικής, dNTPs, UDG ενζύμου και ρυθμιστικά διαλύματα.

Πιο συγκεκριμένα, κάθε tube γίνεται προσθήκη των παρακάτω αντιδραστηρίων με τελικό όγκο αντίδρασης 20μl:

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

Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα και σχεδιάστηκαν από την ερευνητική μας ομάδα με τη βοήθεια του προγράμματος Primer3 Version 0.4.0, όπως αναλύεται σε παρακάτω ενότητα (3.3.2.13.).



μόριο	αλληλουχία	εταιρία
ERβ	F: GCATGACAGATTTCTACCACTCC R: AAGATGTAGAGCGGGCCTTT	Invitrogen
ακτίνη	F: GGAGCAATGATCTTGATCTT R: CGTTCGTCCGCATGGAGTCCT	Invitrogen

Το θερμικό προφίλ που ακολουθείται έχει ως εξής:

UDG Activation	1 κύκλος	2 min, 52°C
AmpliTaq Fast DNA Polymerase Activation	1 κύκλος	2 min, 95°C
Denature Anneal / Extend	40 κύκλοι	15 sec, 95°C
		15 sec, 55°C
		1 min, 72°C
Dissociation step	1 κύκλος	1 min, 95°C
		30 sec, 55°C

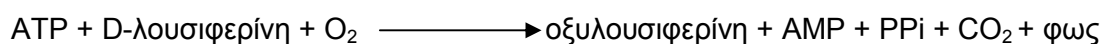
Μελετήθηκαν τα επίπεδα mRNA των μορίων ERβ και ακτίνης, ενώ η τελευταία χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε triplicates. Για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών στην αντίδραση συμπεριλήφθηκε αρνητικό control, NTC (No Template Control), δηλαδή αντίδραση που στερούνταν δείγματος cDNA.

### 3.3.2.11. ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ATP ΜΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ ΛΟΥΣΙΦΕΡΙΝΗΣ-ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ

Στην παρούσα μελέτη, το ολικό κυτταρικό ATP μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο luciferin - luciferase reaction kit (Enliten, Promega).

Η μέθοδος αυτή, στηρίζεται στην ανίχνευση του φωτός που παράγεται από την οξείδωση της λουσιφερίνης, σύμφωνα με την αντίδραση χημειοφωταύγειας:

λουσιφεράση



Εφόσον, το αντιδραστήριο δεν περιέχει ATP, το ένζυμο χρησιμοποιεί το κυτταρικό ATP για να καταλύσει την αντίδραση, με αποτέλεσμα η ένταση του φωτός να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ATP. Η παραγόμενη βιοφωταύγεια (φως) προσδιορίζεται μετά από μέτρηση των δειγμάτων σε λουμινόμετρο (Berthold Technologies, Lumat LB 9508) και εκφράζεται σε μονάδες RLU.

Αρχικά, πραγματοποιείται λύση του κυτταρικού εκχυλίσματος που πρόκειται να μετρηθεί με προσθήκη 50-70μl lysis buffer, ανά κύτταρα από ένα well ενός 6-well

τρυβλίου και επαναδιαλυτοποίηση (ο όγκος εξαρτάται από την ποσότητα του ιζήματος). Το lysis buffer που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία διαφέρει από το lysis buffer που περιγράφεται στο κεφάλαιο με τα υλικά και προέκυψε μετά από δοκιμές για βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου μέτρησης του ATP. Πιο συγκεκριμένα, για τη δημιουργία παραδείγματος χάρη 1ml lysis buffer γίνεται προσθήκη σε erpendorf 500μl ddH<sub>2</sub>O, 5μl μείγματος αναστολέων πρωτεασών, 1μl DTT και 0,25μl PMSF.

Μετά την προσθήκη του lysis buffer, τα δείγματα επωάζονται για 15min στον πάγο και έπειτα κρατάμε 10μl για Bradford (περιγράφηκε παραπάνω), για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη κρύου TCA 2% ίσου όγκου με τον όγκο του εκάστοτε δείγματος, ώστε η τελική συγκέντρωση του TCA σε κάθε δείγμα να είναι 1%. Τα δείγματα επωάζονται για 15min στον πάγο και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min, στους 4°C, υπό 12.000rpm. Είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι όλες οι διαδικασίες πραγματοποιούνται στον πάγο, προκειμένου να μην υδρολυθεί το ATP.

Τέλος, γίνεται αφαίρεση του υπερκείμενου και μεταφορά σε νέο erpendorf και προσθέτουμε ίσο όγκο 1M Tris pH=8, με σκοπό την εξουδετέρωση των διαλυμάτων (pH≈7,8).

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τόσο όσοι ο αριθμός των δειγμάτων και επιπλέον ένας που θα χρησιμεύσει ως control, γίνεται προσθήκη των παρακάτω, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100μl:

ddH <sub>2</sub> O	46μl
Δείγμα	4μl
Αντιδραστήριο Enliten	50μl

Το control που χρησιμοποιείται στην προκειμένη περίπτωση περιέχει lysis buffer, TCA 1% και ίσο όγκο Tris pH=8 1M, κατά αναλογία με το διάλυμα διαλυτοποίησης των δειγμάτων ώστε η τιμή που θα προκύψει από τη μέτρησή του να αφαιρεθεί από τα υπόλοιπα δείγματα κατά την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Το δείγμα και το αντιδραστήριο προστίθενται λίγο πριν την τοποθέτηση του δοκιμαστικού σωλήνα στην θύρα του λουμινόμετρου και σχετικά γρήγορα. Είναι σημαντικό να τονίσουμε, ότι η προσθήκη των δύο τελευταίων συστατικών και ο χρόνος που θα μεσολαβεί μέχρι την τοποθέτηση του σωλήνα στο λουμινόμετρο πρέπει να είναι ο ίδιος για όλα τα δείγματα ώστε να περιορίσουμε το σφάλμα. Η μέτρηση των δειγμάτων στο λουμινόμετρο γίνεται με το πρόγραμμα ICE (Promega).

### **3.3.2.12. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)**

Στη συγκεκριμένη μελέτη, η PCR χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της καθαρότητας των κυτταρικών σειρών. Τα δείγματά μας περιλαμβάνουν ένα αρνητικό control (το οποίο στερούταν DNA), ένα θετικό control (το οποίο περιείχε DNA που προήλθε από

μολυσμένη κυτταρική σειρά) και δείγματα DNA από τις κυτταρικές σειρές. Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούν 2 erpendorfs, όπου το ένα στο mix της αντίδρασης περιλαμβάνει εκκινητές για το μυκόπλασμα και το άλλο εκκινητές ακτίνης για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

μόριο	αλληλουχία	εταιρία
μυκόπλασμα	F: GAAAGYGTGGGGAGCAAAYAGGATTAGATA R: CCRTGCACCACTGTCTCWHHHBGWWAACCTC	Invitrogen
ακτίνη	F: GGAGCAATGATCTTGATCTT R: CGTTCGTCCGCATGGAGTCCT	Invitrogen

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήσαμε ήταν το εξής:

Συστατικό	Όγκος	Τελική C
10x PCR buffer minus Mg	10 μl	1x
10 mM dNTPs mixture	2 μl	0,2 mM (έκαστο)
50 mM MgCl <sub>2</sub>	3 μl	1,5 mM
Primer mix (10 μM έκαστο)	5 μl	0,5 μM
Taq DNA polymerase (5U/μl)	0,2-0,5 μl	1-2,5 units
Template DNA	1-10 μl	-
ddH <sub>2</sub> O	έως τα 100 μl	-

Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 35 κύκλους σύμφωνα με το ακόλουθο θερμικό προφίλ:

Denature	94°C	45 sec
Anneal	55°C	30 sec
Extend	72°C	1 min 30 sec

Τα δείγματα είτε διατηρούνται στους 4°C, είτε ηλεκτροφορούνται σε gel αγαρόζης περιεκτικότητας 1-2% w/v, κατά την δημιουργία του οποίου γίνεται προσθήκη της χρωστικής midori green ώστε να παρακολουθείται το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης. Στη συνέχεια, τα προϊόντα της PCR φορτώνονται στο gel αγαρόζης, μετά από ομογενοποίησή τους με DNA loading buffer (stock 6x) ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1x. Γεμίζουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης με TAE 1x και ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό στα 100V.

### 3.3.2.13. ΣΧΕΔΙΑΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ PCR ΚΑΙ REAL-TIME PCR

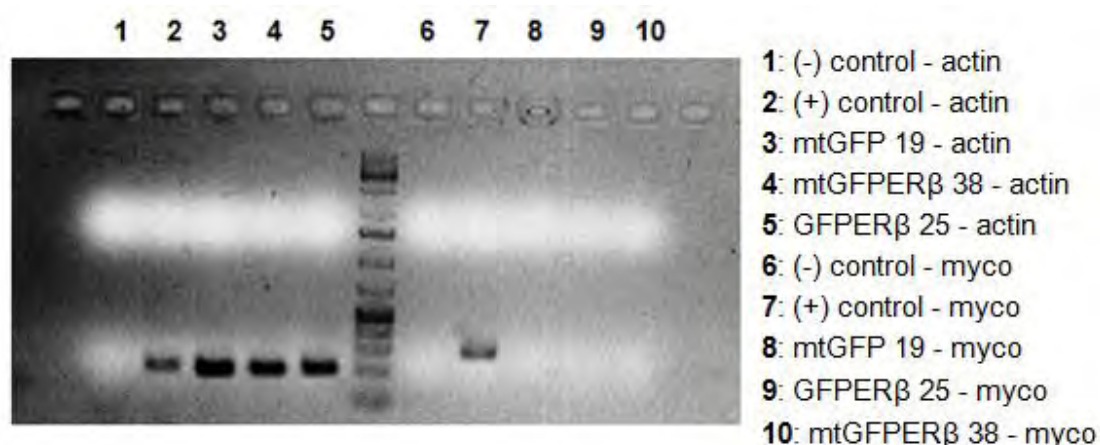
Αρχικά, μέσα από την ηλεκτρονική βάση δεδομένων PubMed του NCBI γίνεται εύρεση της πλήρους αλληλουχίας του cDNA του γονιδίου που μας ενδιαφέρει και έπειτα με τη βοήθεια του προγράμματος Primer3 Version 0.4.0 που διατίθεται δωρεάν στο διαδίκτυο, γίνεται η σχεδίαση του ζεύγους των εκκινητών. Στη συνέχεια, προκειμένου να εξακριβωθεί η μοναδικότητα και η ειδικότητα των αλληλουχιών

κάνουμε “nucleotide BLAST” (Blastn), με σκοπό τη διερεύνηση πιθανής συμπληρωματικότητας των αλληλουχιών που μας ενδιαφέρουν σε όλο το γονιδίωμα του υπό μελέτη οργανισμού (στην περίπτωση μας *mus musculus*). Εφόσον οι αλληλουχίες των εκκινητών πληρούν τα απαραίτητα κριτήρια πρέπει, τέλος, μέσω του προγράμματος Multiple Primer Analyzer της εταιρίας ThermoFisher να γίνει έλεγχος για το αν οι δύο αλληλουχίες του ζεύγους εκκινητών σχηματίζουν διμερή μεταξύ τους ή ομοδιμερή.

#### 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

##### 4.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ N2A STABLE

Κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών κρίθηκε απαραίτητο να ελεγχθεί η καθαρότητα των κυτταρικών σειρών N2a stable από μυκόπλασμα. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος, έγινε απομόνωση DNA μέσω χρήσης kit απομόνωσης DNA (DNA isolation kit, Invitrogen) και στη συνέχεια αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του γονιδίου του 16s rRNA του μυκοπλάσματος. Η ίδια PCR πραγματοποιήθηκε και για ενίσχυση του γονιδίου της ακτίνης, ως control. Τέλος, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτική αгарόζη 1,5%, με σκοπό τον ποιοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης και της έκθεσης του gel σε ακτινοβολία UV ελήφθη η παρακάτω εικόνα.



**Σχήμα 1**

**Απεικόνιση του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης ύστερα από έκθεση της πηκτής σε ακτινοβολία UV.**

*Στο δεξί τμήμα της εικόνας αναγράφονται τα δείγματα που φορτώθηκαν σε κάθε πηγαδάκι καθώς και ο αριθμός των αποικιών των κυττάρων.*

Το προϊόν της PCR του μυκοπλάσματος έχει μέγεθος περίπου 434-468 bp. Παρατηρούμε ότι, τα προϊόντα των PCR των δειγμάτων mtGFP 19, mtGFPERβ 38 και GFPERβ 25 δεν παρουσιάζουν ζώνη DNA στο μέγεθος των βάσεων, που

παρουσιάζει το θετικό control. Άρα, οι κυτταρικές σειρές πιστοποιούνται απαλλαγμένες από πρόσμειξη μυκοπλάσματος.

## **4.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΤΑΘΕΡΑ ΔΙΑΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ N2A**

Η διερεύνηση της ύπαρξης καθώς και των επιπέδων έκφρασης, συνεπώς η ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση της βήτα μορφής του υποδοχέα οιστρογόνων (ERβ) στις σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές N2a (N2a stable), N2a-GFP, N2a-mtGFP, N2a-GFPERβ και N2a-mtGFPERβ, προσεγγίστηκε με τρεις τρόπους: α) με εφαρμογή μικροσκοπίας φθορισμού (ποιοτική και ημιποσοτική εκτίμηση σε πρωτεϊνικό επίπεδο), β) με real-time PCR, εκτίμηση σε επίπεδο mRNA και γ) με ανοσοαποτύπωση Western (western blot), εκτίμηση σε πρωτεϊνικό επίπεδο.

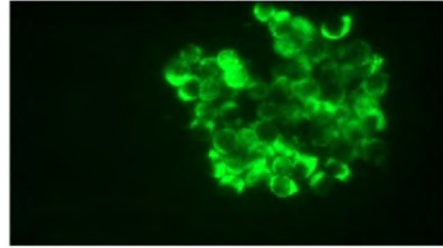
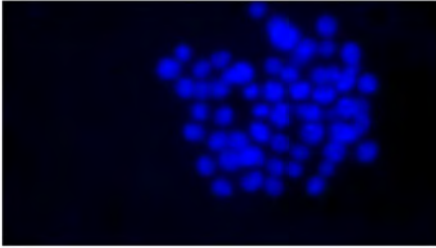
### **4.2.1. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ERβ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ N2A STABLE ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ**

Αρχικά, έγινε έλεγχος των αποικιών κυττάρων N2a-mtGFP, N2a-GFPERβ και N2a-mtGFPERβ με την τεχνική της μικροσκοπίας φθορισμού. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, έγινε στρώσιμο ίσου αριθμού κυττάρων σε coverslips σε 24-well plate και τα κύτταρα αφέθηκαν να επωαστούν με θρεπτικό low glucose μέσα στο οποίο είχε προστεθεί η χρωστική Hoechst, η οποία βάφει τους πυρήνες. Μετά την επώαση, ακολούθησε η μονιμοποίηση των κυττάρων με παγωμένη μεθανόλη (-20°C) και μετέπειτα η παρατήρησή τους σε μικροσκόπιο φθορισμού. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται οι εικόνες των δειγμάτων οι οποίες λήφθηκαν με ψυχόμενη κάμερα φθορισμού Qimaging, χορηγία του ιδρύματος Μποδοσάκη στην Δρ. Άννα – Μαρία Ψαρρά.

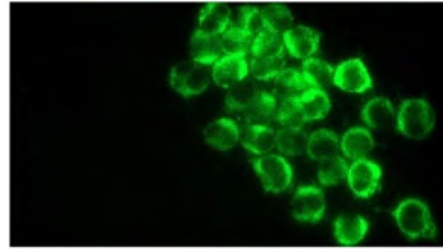
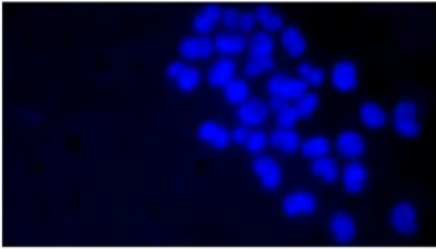
Hoechst

GFP

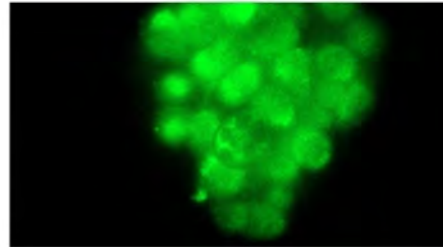
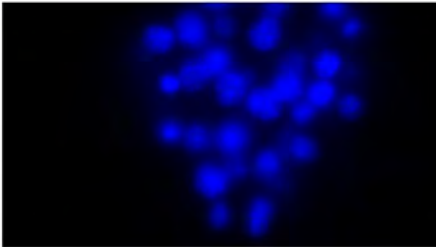
mtGFP 16



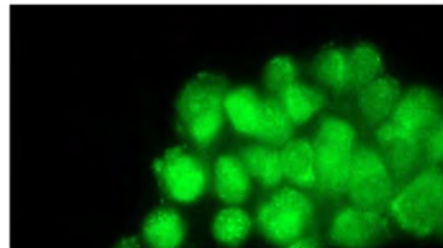
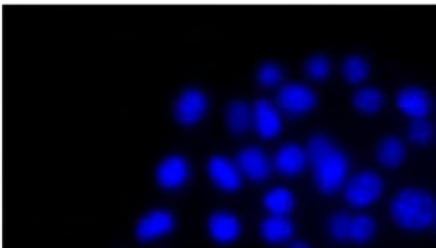
mtGFP 19



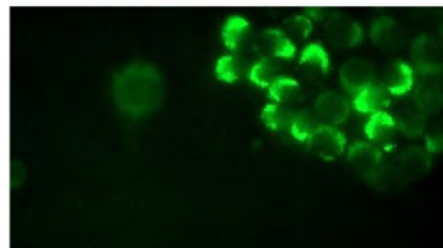
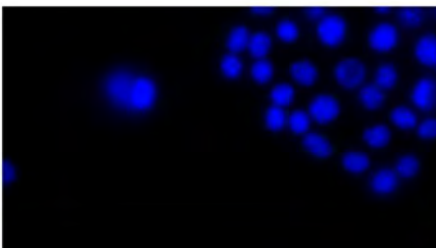
GFPER $\beta$  25



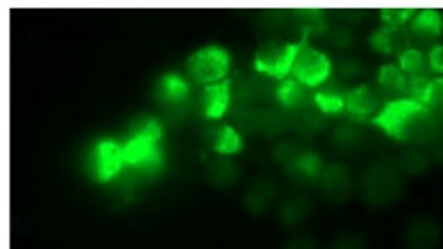
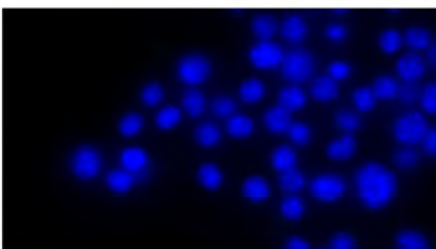
GFPER $\beta$  27



mtGFPER $\beta$  37



mtGFPER $\beta$  38



## Σχήμα 2

### **Διερεύνηση της ποιοτικής και ποσοτικής εκτίμησης των επιπέδων της χιμαιρικής πρωτεΐνης GFP-ERβ και mtGFP-ERβ.**

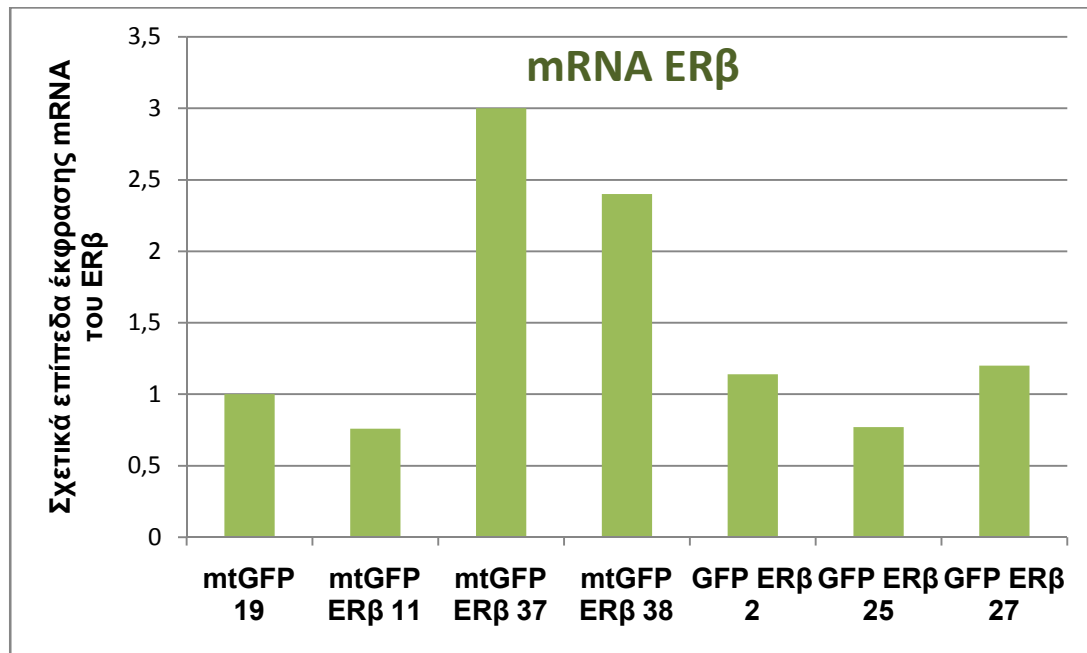
*Έγινε στρώσιμο ίσου αριθμού κυττάρων mtGFP (αποικίες 16, 19), GFPERβ (αποικίες 25, 27) και mtGFPERβ (αποικίες 37, 38) σε coverslips σε 24-well plate και τα κύτταρα έπειτα επώαστηκαν με τη χρωστική Hoechst, μια μπλε χρωστική που βάφει τους πυρήνες. Ακολούθησε μονιμοποίηση των δειγμάτων και η μετέπειτα λήψη εικόνων από μικροσκόπιο φθορισμού.*

*Στην πρώτη στήλη απεικονίζεται η χρώση των κυττάρων με τη Hoechst, όπου φαίνονται οι πυρήνες των κυττάρων, ενώ στη δεξιά στήλη απεικονίζεται το GFP, όπου φαίνεται η χιμαιρική πρωτεΐνη GFPERβ και mtGFPERβ, καθώς και η mtGFP των κυττάρων control.*

Όπως φαίνεται από την παραπάνω εικόνα, παρατηρείται τόσο η πυρηνική όσο και η κυτταροπλασματική εντόπιση της χιμαιρικής πρωτεΐνης GFPERβ στις αποικίες 25 και 27, όπως και αναμενόταν, ενώ διακρίνεται και η περιπυρηνική εντόπιση της χιμαιρικής πρωτεΐνης mtGFPERβ στις αποικίες 37 και 38, κάτι που υποδεικνύει την είσοδό της στα μιτοχόνδρια.

#### **4.2.2. ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΕΡΒ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ N2A STABLE**

Σε δεύτερο στάδιο, για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με την εφαρμογή της μικροσκοπίας φθορισμού, ελέχθησαν τα επίπεδα του ώριμου RNA (mRNA) στις υπό μελέτη αποικίες με εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time qPCR) με σκοπό τον ακριβέστερο χαρακτηρισμό των κυτταρικών μας σειρών και την ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων των ώριμων mRNA στις υπό μελέτη αποικίες. Πιο συγκεκριμένα, έγινε απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα N2a-mtGFP, N2a-mtGFPERβ και N2a-GFPERβ. Όσο αφορά τα κύτταρα mtGFPERβ και GFPERβ, απομονώθηκε RNA από 3 αποικίες για το καθένα, τις mtGFPERβ 11, 37 και 38 και GFPERβ 2, 25 και 27, οι οποίες σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης με εφαρμογή της μικροσκοπίας φθορισμού παρουσίαζαν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης GFP-ERβ, με ή χωρίς μιτοχονδριακή στόχευση, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε πέψη με DNάση προκειμένου να αποικοδομηθεί το περιεχόμενο DNA και έπειτα έγινε μετατροπή του σε cDNA με τη μέθοδο Reverse – Transcription PCR (RT-PCR). Τέλος, εφαρμόσαμε Real-Time qPCR με σκοπό να εξετάσουμε τα επίπεδα του ERβ σε κάθε ξεχωριστή αποικία των κυτταρικών μας σειρών. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ακτίνης και η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Livak ή ΔΔCt. Ως control (calibrator) χρησιμοποιήθηκε το mtGFP 19 και έγινε σύγκριση των επιπέδων των mRNA όλων των υπόλοιπων δειγμάτων σε σχέση με αυτό.



### Σχήμα 3

**Διερεύνηση των επιπέδων mRNA του ERβ καθώς και του μιτοχονδριακού ERβ (mtERβ) στις σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές N2a-mtGFP, N2a-mtGFPERβ και N2a-GFPERβ.**

Έγινε απομόνωση ολικού RNA από τις κυτταρικές σειρές mtGFP 19, mtGFPERβ 11, 37 και 38 και GFPERβ 2, 25 και 27, έπειτα πέψη με DNάση για αποικοδόμηση του DNA τους και τέλος εφαρμόστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR). Οι μέθοδοι περιγράφονται αναλυτικά σε προηγούμενη ενότητα. Σε κάθε περίπτωση έγιναν 2 επαναλήψεις. Για την εξαγωγή του λόγου που φαίνεται στο διάγραμμα χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των ct, οι διακυμάνσεις των τιμών αυτών δεν διέφεραν περισσότερο από 4,7% της μέσης τιμής.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της real-time PCR παρατηρούμε ότι ο μιτοχονδριακός ERβ εμφανίζει δύο με τρεις φορές υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στις αποικίες 37 και 38, συγκριτικά με τα επίπεδα των αποικιών αναφοράς N2a-mtGFP (αποικία 19), ενώ δεν παρατηρούμε αύξηση στην αποικία 11. Όσο αφορά τα επίπεδα έκφρασης του (πυρηνικού και κυτταροπλασματικού) ERβ παρατηρούμε πολύ μικρή αύξηση στις αποικίες 2 και 27 (στατιστικώς μη σημαντική), ενώ δεν παρατηρούμε αύξηση στην αποικία 25.

#### 4.2.3. ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΟΥ ERβ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ N2A STABLE

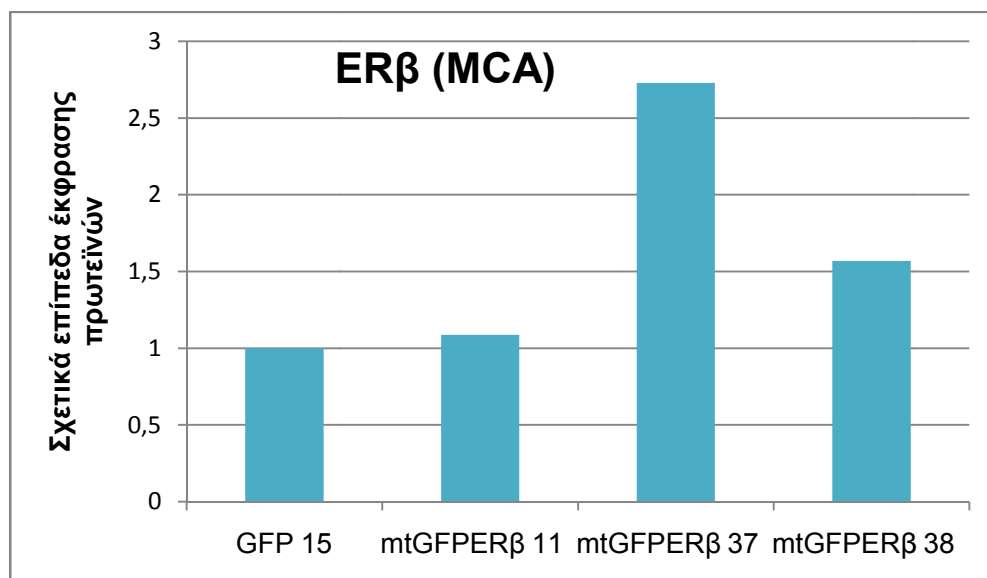
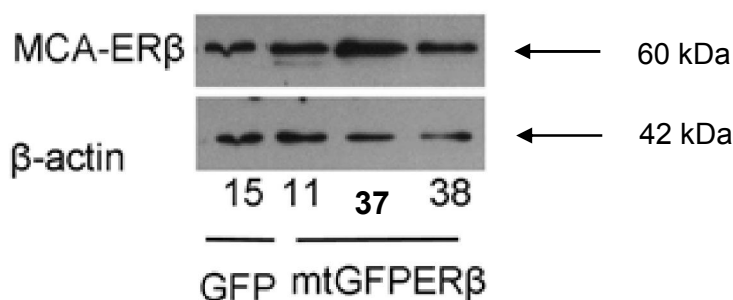
Στη συνέχεια, ακολούθησε έλεγχος των επιπέδων έκφρασης των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών GFPERβ και mtGFPERβ με εφαρμογή της μεθόδου western blotting, με χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι του ERβ, με σκοπό την επαλήθευση των αποτελεσμάτων μας, τον ποσοτικό χαρακτηρισμό των αποικιών όσο αφορά τα



επίπεδα έκφρασης των ενεργών βιομορίων μας, δηλαδή των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών, αλλά και τον έλεγχο αποτελεσματικότητας των διαθέσιμων στο εργαστήριό μας αντισωμάτων.

Αρχικά επικεντρωθήκαμε στον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης του μιτοχονδριακού GFPERβ, ο οποίος, σύμφωνα με τις μελέτες της μικροσκοπίας φθορισμού και real-time qPCR, έδειξε και τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης.

Οι αποικίες που μελετήθηκαν για τις κυτταρικές σειρές N2a-GFP και N2a-mtGFP ERβ ήταν 15 και 11, 37, 38 αντίστοιχα.



#### Σχήμα 4

**Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης του μιτοχονδριακού GFPERβ και σύγκρισή του με κύτταρα control GFP.**

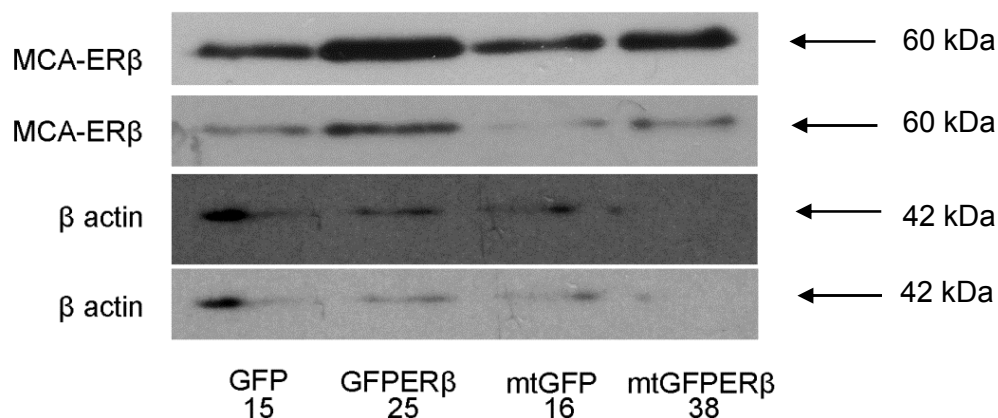
Κυτταρικά εκχυλίσματα ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου από N2a-GFP αποικία 15 και N2a-mtGFPERβ αποικία 11, 37 και 38, ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,45μm και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία ERβ και β-ακτίνης. Έγινε χρήση ενός ειδικού αντισώματος έναντι του ERβ και συγκεκριμένα του MCA (σε PBST 1x, milk

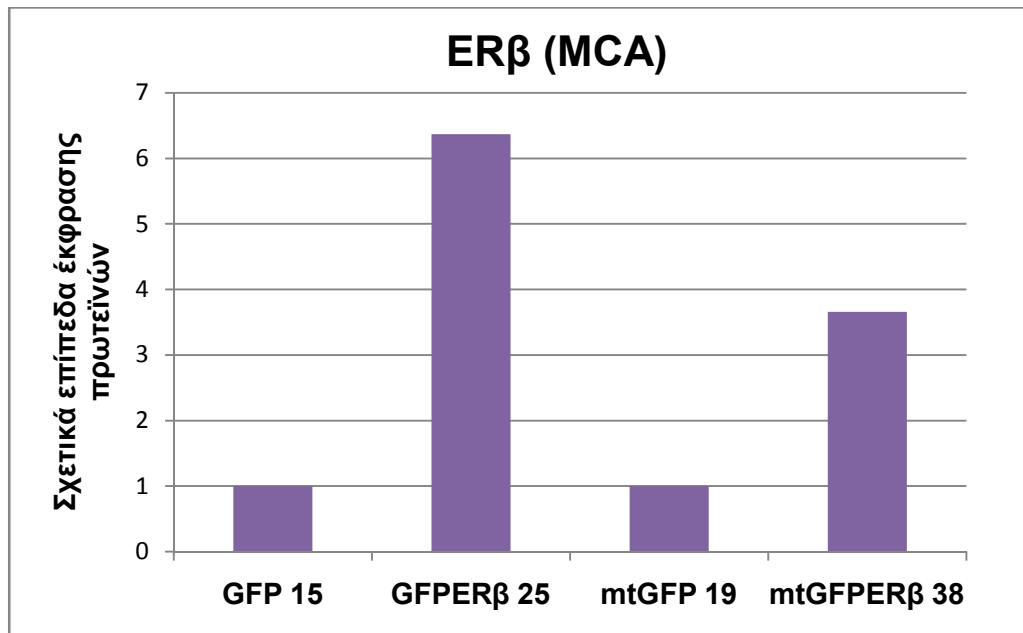
2%, 1:500, Serotec) καθώς και ενός αντισώματος έναντι της β-ακτίνης (σε PBST 1x milk 2%, 1:4000, Sigma).

Στο πάνω μέρος του σχήματος βλέπουμε τις ζώνες του ERβ (60 kDa) και της ακτίνης (42 kDa), όπως αποτυπώθηκαν κατά τη διαδικασία του western blotting, ενώ στο κάτω μέρος παρουσιάζονται σε διάγραμμα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του ERβ, μετά την κανονικοποίησή του με τη β-ακτίνη.

Παρατηρούμε ότι σε σύγκριση με την αποικία αναφοράς GFP 15, οι αποικίες mtGFPERβ 37 και 38 εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης μίας πρωτεΐνης μοριακού βάρους περίπου 60 kDa, με την αποικία 37 να παρουσιάζει μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με την αποικία 38. Δεδομένου ότι ή πρωτεΐνη αυτή αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος του ERβ, και το αντίσωμα MCA, έναντι του ERβ, δεν αναγνώρισε την mtGFPERβ χιμαιρική πρωτεΐνη, αλλά ούτε και άλλη πρωτεϊνική ζώνη, υποθέτουμε ότι η αύξηση της πρωτεϊνικής αυτής ζώνης στις αποικίες των mtGFPERβ κυττάρων αντιστοιχεί σε προϊόν διάσπασης της mtGFPERβ χιμαιρικής πρωτεΐνης και το προϊόν που ανιχνεύουμε αντιστοιχεί στον ERβ.

Ακολούθησε επανέλεγχος των επιπέδων έκφρασης της αποικίας 38, η οποία σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας φθορισμού παρουσίαζε τα υψηλότερα επίπεδα της μιτοχονδριακής χιμαιρικής πρωτεΐνης GFP-ERβ, καθώς και έλεγχο των επιπέδων έκφρασης του GFPERβ στην αποικία 25, συγκριτικά με τις αποικίες αναφοράς GFP και mtGFP.





### Σχήμα 5

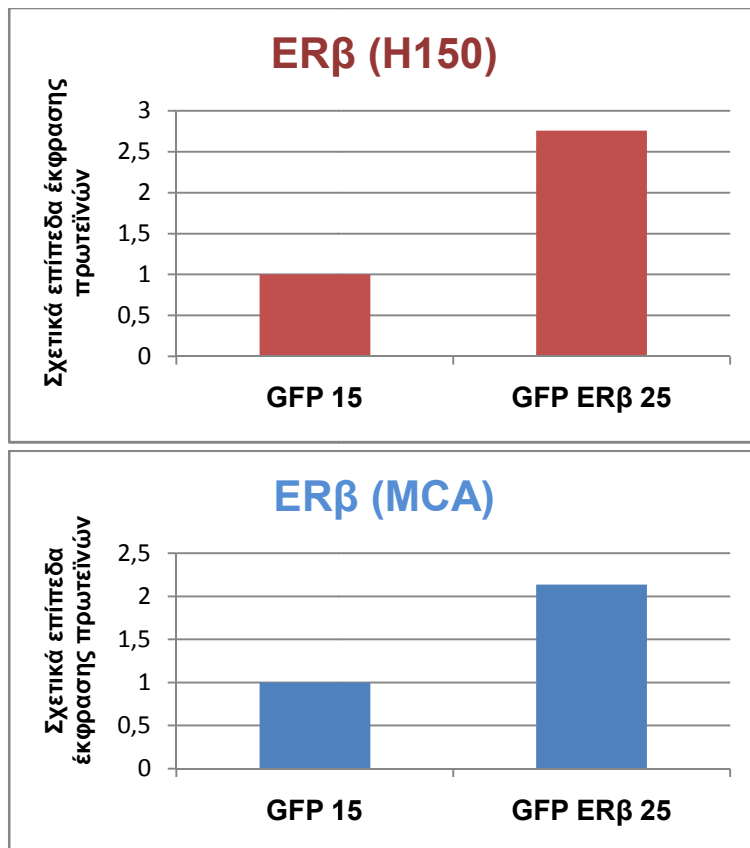
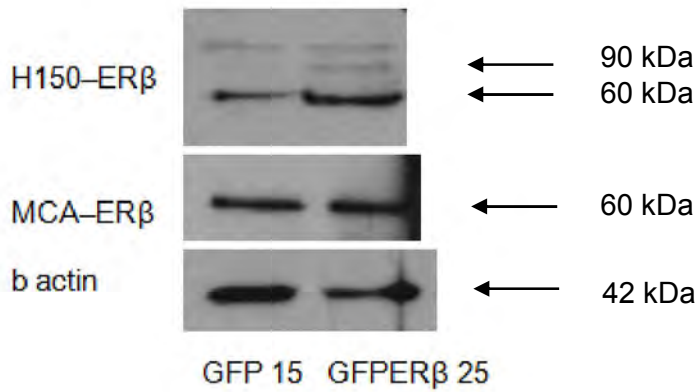
#### Διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης της GFPERβ στις αποικίες 38 και 25 των N2a-mtGFPERβ και N2a-GFPERβ κυττάρων, αντίστοιχα.

Κυτταρικά εκχυλίσματα ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου από N2a-GFP αποικία 15, N2a-GFP-ERβ αποικία 25, N2a-mtGFP αποικία 19 και N2a-mtGFPERβ αποικία 38, ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης με διάμετρο πόρων 0,45μm και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία ERβ καθώς και β-ακτίνης. Έγινε χρήση ενός ειδικού αντισώματος έναντι του ERβ και συγκεκριμένα του MCA (σε PBST 1x, milk 2%, 1:500, Serotec) καθώς και ενός αντισώματος έναντι της β-ακτίνης (σε PBST 1x milk 2%, 1:4000, Sigma).

Στο πάνω μέρος του σχήματος βλέπουμε τις ζώνες του ERβ (60 kDa) και της ακτίνης (42 kDa), όπως αποτυπώθηκαν κατά τη διαδικασία του western blotting, ενώ στο κάτω μέρος παρουσιάζονται σε διάγραμμα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του ERβ, μετά την κανονικοποίησή του με τη β-ακτίνη.

Παρατηρούμε επανάληψη των αποτελεσμάτων που υποδεικνύουν την υπερέκφραση της GFPERβ στην αποικία 25 κατά 6 φορές, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς GFP στην αποικία 15, και υπερέκφραση της mtGFPERβ στην αποικία 38 κατά 3,5 φορές περίπου, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς mtGFP στην αποικία 19. Ομοίως με πριν η πρωτεΐνη που ανιχνεύεται αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος του ERβ.

Στη συνέχεια, η υπερέκφραση της GFPERβ στην αποικία 25 επανελέχθηκε τόσο με τη χρήση του αντισώματος MCA όσο και με τη χρήση ενός άλλου εμπορικά διαθέσιμου αντισώματος, έναντι του ERβ, του H150. Ακολουθούν τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης.



### Σχήμα 6

#### Διερεύνηση της υπερέκφρασης της GFPERβ στα κύτταρα N2α-GFPERβ (25).

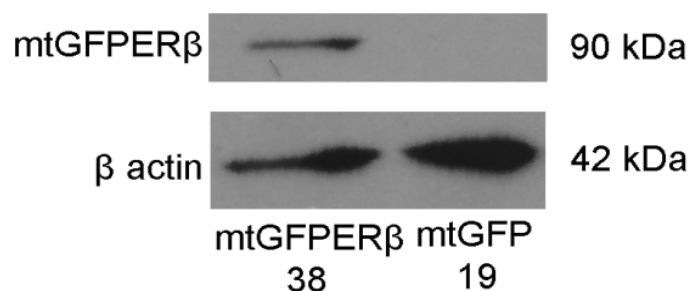
Κυτταρικά εκχυλίσματα ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου από N2α-GFP αποικία 15, και N2α-GFPERβ αποικία 25, ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτή πολυακρυλαμιδίου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης με διάμετρο πόρων 0,45μm και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία ERβ και ακτίνης. Έγινε χρήση δύο ειδικών αντισωμάτων έναντι του ERβ και συγκεκριμένα του H150 (σε PBST 1x milk 2%, 1:1000, Santa Cruz) και του MCA (σε PBST 1x, milk 2%, 1:500, Serotec) καθώς και ενός αντισώματος έναντι της β-ακτίνης (σε PBST 1x milk 2%, 1:4000, Sigma).

Στο πάνω μέρος του σχήματος βλέπουμε τις ζώνες του ERβ (60 kDa), GFPERβ (90 kDa) και της ακτίνης (42 kDa) όπως αποτυπώθηκαν κατά τη διαδικασία του western blotting, ενώ στο κάτω μέρος παρουσιάζονται σε διαγράμματα τα σχετικά επίπεδα έκφρασης του ERβ, μετά την κανονικοποίησή του με τη β-ακτίνη.

Παρατηρούμε επαλήθευση της υπερέκφρασης κατά 2 με 2μιση φορές περίπου του ERβ στην αποικία 25, συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς GFP (αποικία 15). Επίσης με τη χρήση του αντισώματος H150, εντοπίζεται και η υπερέκφραση ποσοστού της GFPERβ, σε ακέραια μορφή, μοριακού βάρους 90 kDa, όπως και αναμενόταν στα κύτταρα N2a-GFPERβ και όχι στα κύτταρα αναφοράς N2a-GFP.

Με σκοπό να επαληθεύσουμε την έκφραση της mtGFPERβ πρωτεΐνης, και τον εντοπισμό αυτής, έστω σε μικρό ποσοστό, στην ακέραια μορφή GFPERβ, δεδομένου ότι το μιτοχονδριακό σήμα απομακρύνεται μετά την είσοδο της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια, εφαρμόσαμε την τεχνική Western blotting, κάνοντας χρήση ενός αντισώματος έναντι GFP.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης φαίνονται στο σχήμα που ακολουθεί.



Σχήμα 7.

**Διερεύνηση της υπερέκφρασης του mtGFPERβ στα κύτταρα N2a-mtGFPERβ (38).**

Κυτταρικά εκχυλίσματα ίσου πρωτεϊνικού περιεχομένου από N2a-mtGFP αποικία 19, και N2a-mtGFPERβ αποικία 38, ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτική πολυακρυλαμίδιου, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,45μm και μελετήθηκαν ως προς την παρουσία mtGFPERβ και ακτίνης. Έγινε χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι της GFP πρωτεΐνης (σε PBST 1x milk 2%, 1:4000, Roche) και έναντι της ακτίνης (σε PBST 1x milk 2%, 1:4000, Sigma).

Παρατηρούμε ότι με τη χρήση του αντισώματος έναντι της GFP πρωτεΐνης ανιχνεύεται η υπερέκφραση της mtGFPERβ πρωτεΐνης (μετά την αφαίρεση του μιτοχονδριακού σήματος), στα N2a-mtGFPERβ κύτταρα και όχι στα N2a-mtGFP, γεγονός που επαληθεύει την υπερέκφραση της mtGFPERβ πρωτεΐνης και την επιτυχή στόχευση της στα μιτοχόνδρια.

### 4.3. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΕΡβ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΛΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΑΤΡ

Η μετακίνηση του ΕΡβ στο μιτοχόνδριο πιθανολογείται ότι συνδέεται στενά με την ενεργειακή κατάσταση του κυττάρου και ίσως αποτελεί ένα μηχανισμό με τον οποίο το κύτταρο ρυθμίζει τις ενεργειακές του απαιτήσεις. Η σταθερή υπερέκφραση του μιτοχονδριακού ΕΡβ στα κύτταρα N2a της παρούσας μελέτης, πιθανόν αυξάνει την ικανότητα των μιτοχονδρίων να παράγουν ΑΤΡ.

Προκειμένου να εξετάσουμε αυτήν την υπόθεση, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων N2a-mtGFP, N2a-GFP-ΕΡβ και N2a-mtGFP-ΕΡβ, απουσία και παρουσία οιστραδιόλης ( $E_2$ ) και στη συνέχεια μετρήθηκαν τα επίπεδα του ολικού κυτταρικού ΑΤΡ. Ωστόσο προηγήθηκε κάποια μελέτη με σκοπό τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου της μέτρησης του ενδοκυτταρικά παραγόμενου ΑΤΡ στα κύτταρά μας.

#### 4.3.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΡΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΑΠΟΠΡΩΤΕΪΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα ΤСА 50% w/v (stock). Το ΤСА (τριχλωρο-οξικό οξύ) έχει την ικανότητα να κατακρημνίζει τις πρωτεΐνες του κυτταρικού εκχυλίσματος, με αποτέλεσμα να απομακρύνει πρωτεϊνικά συστατικά του δείγματος και κατ'επέκταση να απενεργοποιεί και να απομακρύνει τα ένζυμα που αποικοδομούν το ΑΤΡ. Για το σκοπό αυτό, ζυγίστηκαν 12,5gr ΤСА (Applichem) και έπειτα προστέθηκαν σε συνολικό όγκο ddH<sub>2</sub>O 25ml.

Μετά την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και την απομόνωση του ΑΤΡ, το ΤСА του δείγματος θα πρέπει να εξουδετερωθεί μέσω της προσθήκης ενός ρυθμιστικού διαλύματος Tris με αποτέλεσμα το τελικό pH του διαλύματος προς μέτρηση να είναι 7,75, το οποίο είναι βέλτιστο ώστε να δράσει η λουσιφεράση. Ο όγκος του Tris που θα προστεθεί θα πρέπει να είναι τόσος ώστε η τελική συγκέντρωση του ΤСА να είναι 1% ή μικρότερη.

Για το σκοπό αυτό προχωρήσαμε στη δημιουργία τριών διαλυμάτων, με σκοπό τη μέτρηση του pH τους, η σύσταση των οποίων φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

	1o buffer	2o buffer	3o buffer
ТСА 2%	100μl	100μl	100μl
Tris	100μl 1M, pH=8	100μl 1,5M, pH=8,8	100μl 20mM, pH=8

Οι τιμές του pH που προέκυψαν για το κάθε ρυθμιστικό διάλυμα, μέσω χρήσης πεχαμετρικού χαρτιού είναι οι εξής:

1o buffer → 7-8

2o buffer → 8-9

3o buffer → κοντά στο 1

Επιλέξαμε για τη συνέχιση του πρωτοκόλλου το 1ο buffer με Tris 1M, pH=8 γιατί ήταν πιο κοντά στην βέλτιστη τιμή των 7,75. Η υψηλή συγκέντρωση Tris (1M έναντι 20mM) ήταν κατάλληλη για τη ρύθμιση του επιθυμητού pH, σε αντίθεση με το διάλυμα που περιείχε Tris 1,5M pH=8,8, που οδηγούσε σε μετακίνηση των τιμών pH προς αλκαλικές τιμές.

#### 4.3.2. ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ATP ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa

Σε δεύτερη φάση, προχωρήσαμε σε δοκιμαστική μέτρηση των ολικών κυτταρικών επιπέδων του ATP σε κύτταρα HeLa, έχοντας δύο σωλήνες ίσο αριθμό κυττάρων σε μορφή ιζήματος, που προέκυψαν μετά από φυγοκέντρηση στα 1500rpm, για 5min, RT.

- 1<sup>ο</sup> ίζημα κυττάρων HeLa:

Έγινε λύση του κυτταρικού εκχυλίσματος με Tris 20mM pH=8, στο οποίο προστέθηκαν PMSF, DTT και protease inhibitors. Τα κύτταρα αφέθηκαν για επώαση για 10-15min στον πάγο και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε sonication (2x, 40%). Μετά ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10min, στους 4oC υπό 12.000rpm, από την οποία συλλέξαμε το υπερκείμενο σε νέο erpendorf και στο οποίο προστέθηκε ίσος όγκος TCA 2%, ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1%. Μετά την προσθήκη του TCA πραγματοποιήθηκε και 2η φυγοκέντρηση με τις ίδιες συνθήκες με την προηγούμενη, από την οποία επίσης συλλέξαμε το υπερκείμενο, διότι το ίζημα ήταν οι πρωτεΐνες που κατακρημνίστηκαν. Τέλος, έγινε προσθήκη ίσου όγκου Tris 1M pH=8, με σκοπό την εξουδετέρωση, του τελικού διαλύματος προς μέτρηση.

- 2ο ίζημα κυττάρων HeLa:

Έγινε λύση του κυτταρικού εκχυλίσματος με Tris 20mM pH=8, στο οποίο προστέθηκαν PMSF, DTT και protease inhibitors, μόνο που επιπλέον στο Lysis Buffer έγινε και προσθήκη Triton X-100 με τελική συγκέντρωση 1%. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με το 1ο ίζημα.

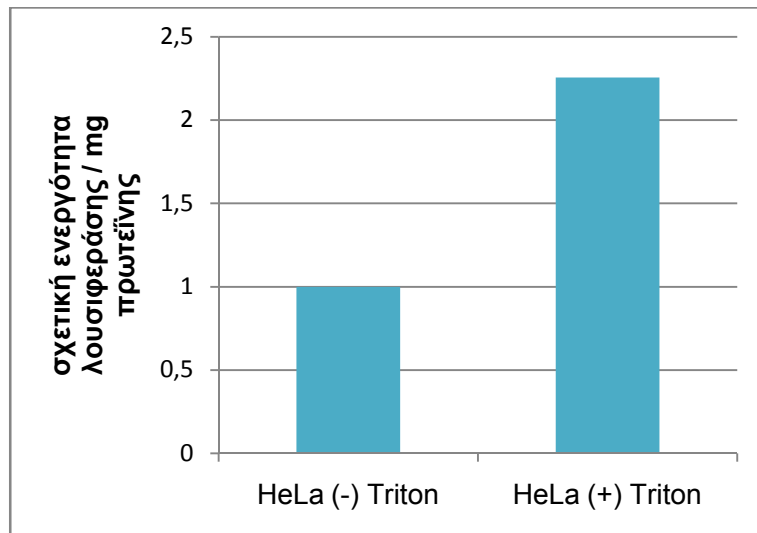
Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση στο λουμιόμετρο και των δύο δειγμάτων, το οποίο έδωσε τις παρακάτω τιμές. Να σημειωθεί ότι στο λουμιόμετρο χρησιμοποιήθηκε ως control mix lysis buffer με TCA και Tris προκειμένου να αφαιρεθεί από τις τιμές των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με βάση τη μέτρηση του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου με τη μέθοδο Bradford που ακολούθησε.

Control → 17.597

1ο ίζημα → 24.823.914

2ο ίζημα → 31.3502.343



**Σχήμα 7**

**Δοκιμαστική μέτρηση κυτταροπλασματικού ATP σε καρκινικά κύτταρα ενδομητρίου HeLa**

Παρατηρούμε ότι η προσθήκη του Triton X-100 οδήγησε σε πιο αποτελεσματική εκχύλιση του ATP.

#### **4.3.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ATP ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ N2A STABLE ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΥΣΙΑ E2**

Σε επόμενη φάση, ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία αλλά αυτή τη φορά σε κύτταρα N2a stable mtGFP (αποικία 19) παρουσία και απουσία οιστραδιόλης E<sub>2</sub>. Η λύση του κυτταρικού ιζήματος πραγματοποιήθηκε χωρίς την προσθήκη Triton X-100, ομοίως με την πειραματική διαδικασία του 1ου ιζήματος των κυττάρων HeLa.

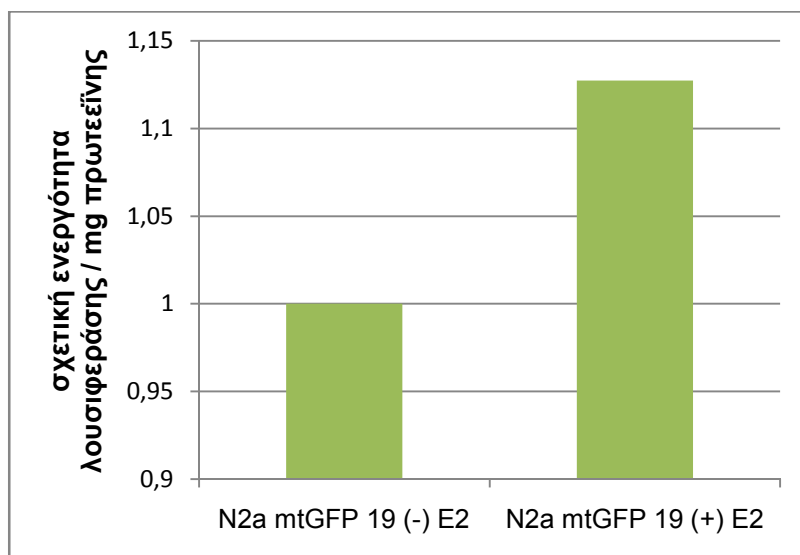
Τα αποτελέσματα της μέτρησης του λουμινομέτρου ήταν τα παρακάτω καθώς και της κανονικοποίησης, όπως και προηγουμένως.

Control → 31.560

(-) E2 → 5.983.535

(+) E2 → 6.245.725





### Σχήμα 8

#### Επίδραση της οιστραδιόλης στα ολικά κυτταρικά επίπεδα ATP κυτάρων N2a stable mtGFP.

Πραγματοποιήθηκε στρώσιμο ίσου αριθμού κυττάρων (300.000 κύτταρα/well) N2a-mtGFP (αποικία 19) σε 6-well plate. Τα κύτταρα επωάστηκαν απουσία και παρουσία οιστραδιόλης  $E_2$  (διαλυμένη σε EtOH)  $10^{-9}M$  για 12 ώρες. Στη συνέχεια, μετρήθηκαν τα κυτταρικά επίπεδα ATP μέσω του αντιδραστηρίου luciferin/luciferase (Enliten). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν μονάδες ενεργότητας λουσιφεράσης/mg πρωτεΐνης. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων του λουμιόμετρου πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της συνολικής πρωτεϊνικής ποσότητας των κυττάρων με τη μέθοδο Bradford.

Παρατηρούμε ότι όπως αναμενόταν η προσθήκη οιστραδιόλης ενισχύει την παραγωγή ATP. Όμως οι απόλυτες τιμές παραγόμενου φωτός ήταν πολύ μειωμένες σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα, πιθανόν λόγω απουσίας του Triton.

Προκειμένου να αυξήσουμε την ευαισθησία της μεθόδου (αύξηση των απόλυτων τιμών), τροποποιήσαμε περεταίρω την πειραματική διαδικασία ως ακολούθως:

Πραγματοποιήσαμε ακριβώς την ίδια διαδικασία στα ίδια κύτταρα, δηλαδή N2a stable mtGFP (αποικία 19) αλλά αυτή τη φορά η λύση του κυτταρικού εκχυλίσματος έγινε αντί για Tris 20mM pH=8 με ίσο όγκο ddH<sub>2</sub>O. Να σημειωθεί ότι στο διάλυμα με το οποίο έγινε η λύση προστέθηκε Triton X-100 με τελική συγκέντρωση 1%. Επίσης, παραλείψαμε το βήμα του sonication, οπότε μετά την λύση ακολούθησε απευθείας η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών με TCA. Τα υπόλοιπα βήματα μετά το TCA είναι ακριβώς τα ίδια με προηγούμενως.

Η προσθήκη ddH<sub>2</sub>O αντί για 20mM Tris pH=8, αποσκοπούσε στην δημιουργία συνθηκών πιο βέλτιστων (ουδέτερο pH, χωρίς ρυθμιστική ικανότητα του διαλύματος), ώστε να επιτευχθεί η πιο αποτελεσματική δράση του όξινου διαλύματος TCA και η

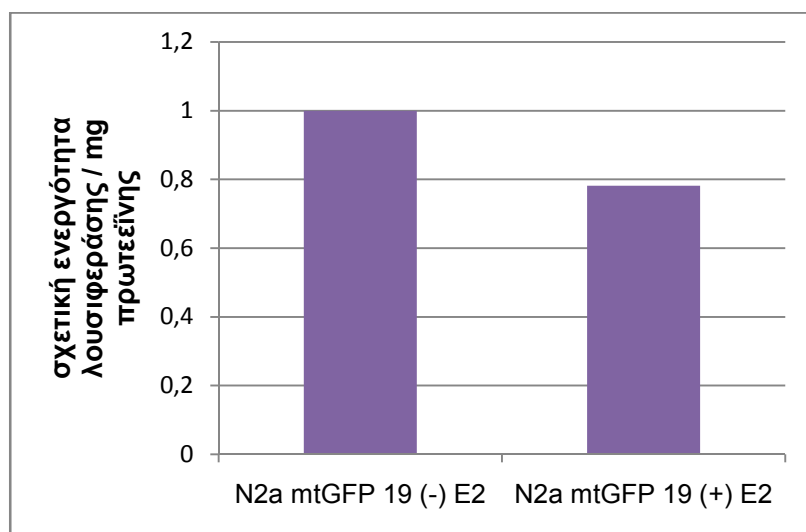
κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Η παράλειψη της διαδικασίας της λύσης με υπερήχους αποσκοπούσε στην μείωση της χρονικής διαδικασίας εφαρμογής της πειραματικής διαδικασίας και υπερθέρμανση του διαλύματος που μπορούσε να οδηγήσει σε υδρόλυση του ATP.

Τα αποτελέσματα της μέτρησης του λουμινόμετρου παρατίθενται στη συνέχεια, ενώ ακολουθεί και η κανονικοποίησή τους.

Control → 61.755

(-) E2 → 206.141.852

(+) E2 → 193.845.191



### Σχήμα 9

#### Επίδραση της οιστραδιόλης στα ολικά κυτταρικά επίπεδα ATP κυτάρων N2a stable mtGFP.

Πραγματοποιήθηκε στρώσιμο ίσου αριθμού κυτάρων (300.000 κύτταρα/well) N2a-mtGFP (αποικία 16) σε 6-well plate. Τα κύτταρα επώαστηκαν απουσία και παρουσία οιστραδιόλης E<sub>2</sub> (διαλυμένη σε EtOH) 10<sup>-9</sup>M για 12 ώρες. Στη συνέχεια, μετρήθηκαν τα κυτταρικά επίπεδα ATP μέσω του αντιδραστηρίου luciferin/luciferase (Enliten). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν μονάδες ενεργότητας λουσιφεράσης/mg πρωτεΐνης. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων του λουμινόμετρου πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της συνολικής πρωτεϊνικής ποσότητας των κυτάρων με τη μέθοδο Bradford.

Όπως παρατηρούμε οι απόλυτες τιμές μετρούμενου φωτός αυξήθηκαν σε σχέση και με τα δύο προηγούμενα πειράματα, άρα ο στόχος μας επιτεύχθηκε. Η μη παρατηρούμενη επαγωγή της παραγωγής ATP παρουσία E<sub>2</sub> πιθανόν να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα.

Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις πραγματοποιήσαμε την επόμενη μέτρησή μας, ακολουθώντας το ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο όπως προηγουμένως.

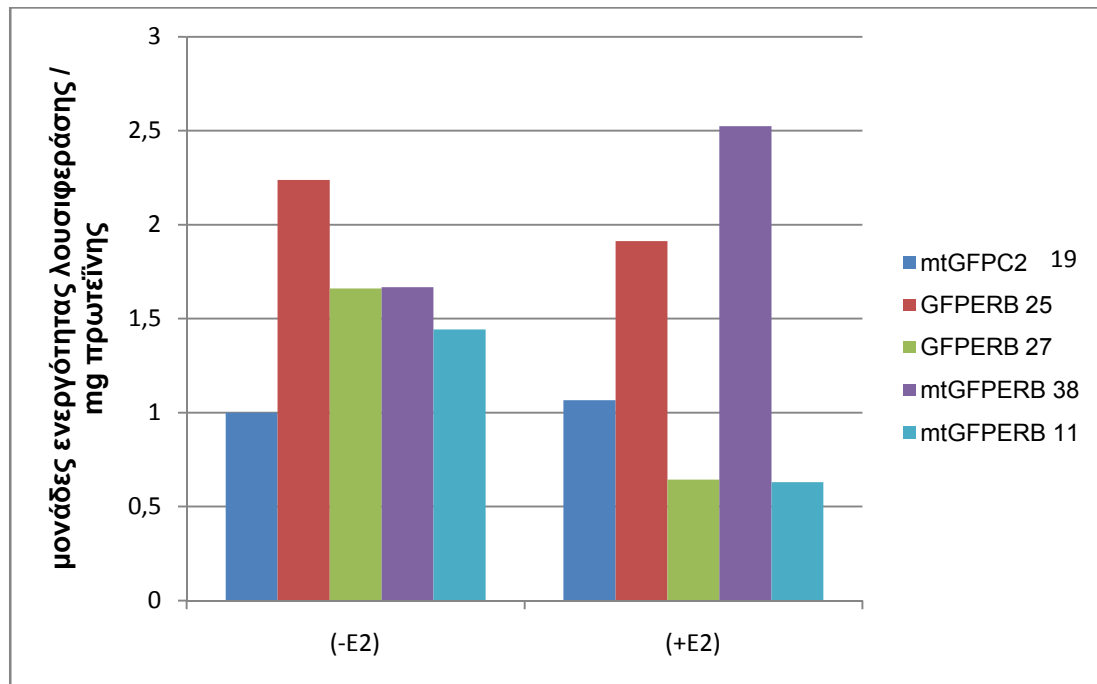
Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήσαμε μέτρηση των επιπέδων του ATP στο κυτταρόπλασμα κυττάρων N2a stable GFP (αποικία 15), N2a-GFPERβ (αποικία 25) και N2a-mtGFPERβ (αποικία 38) παρουσία και απουσία E<sub>2</sub> και τα αποτελέσματα του λουμιόμετρου παρατίθενται παρακάτω.

(-) E<sub>2</sub> GFP 15 → 7.864.439  
(-) E<sub>2</sub> GFPERβ 25 → 5.694.899  
(-) E<sub>2</sub> mtGFPERβ 38 → 6.274.150

(+) E<sub>2</sub> GFP 15 → 5.499.420  
(+) E<sub>2</sub> GFPERβ 25 → 4.164.791  
(+) E<sub>2</sub> mtGFPERβ 38 → 5.930.320

Οι απόλυτες τιμές χημειοφωταύγειας που προσδιορίστηκαν δεν ήταν οι αναμενόμενες όσο αφορά την τάξη μεγέθους, γι' αυτό και αποφασίσαμε να επαναλάβουμε το πείραμα απουσία Triton X-100.

Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε επώαση κυττάρων N2a-mtGFP αποικία 16, N2a-GFP-ERβ αποικίες 25 και 27 και N2a-mtGFP-ERβ αποικίες 11 και 38, απουσία και παρουσία οιστραδιόλης (E<sub>2</sub>) και έπειτα προχωρήσαμε σε λύση του κυτταρικού ιζήματος με βάση το προηγούμενο πρωτόκολλο, αλλά χωρίς προσθήκη Triton X-100 αυτή τη φορά. Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού ATP, μέσω του αντιδραστηρίου Enliten ATP assay (Promega), ενώ ακολούθησε και μέτρηση του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων με τη μέθοδο της Bradford. Τα αποτελέσματα του λουμιόμετρου, εκφρασμένα σε μονάδες ενεργότητας λουσιφεράσης / mg πρωτεΐνης, παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα.



**Σχήμα 10**

**Επίδραση του μιτοχονδριακού ERβ στα ολικά κυτταρικά επίπεδα ATP στα κύτταρα N2a stable.**

Πραγματοποιήθηκε στρώσιμο ίσου αριθμού κυτάρων (300.000 κύτταρα/well) N2a-mtGFP, N2a-GFPERβ και N2a-mtGFPERβ σε 6-well plate. Τα κύτταρα επωάστηκαν απουσία και παρουσία οιστραδιόλης  $E_2$  (διαλυμένη σε EtOH)  $10^{-9}M$  για 12 ώρες. Τα control κύτταρα, δηλαδή αυτά που δεν είχαν οιστραδιόλη, επωάστηκαν με ίση ποσότητα EtOH για το ίδιο χρονικό διάστημα. Μετά το πέρας των 12 ωρών έγινε συλλογή των κυτάρων και λύση. Στη συνέχεια, μετρήθηκαν τα κυτταρικά επίπεδα ATP μέσω του αντιδραστήριου luciferin/luciferase (Enliten), όπως περιγράφηκε στην ενότητα “τεχνικές”. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σαν μονάδες ενεργότητας λουσιφεράσης/mg πρωτεΐνης. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων του λουμινόμετρου πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της συνολικής πρωτεϊνικής ποσότητας των κυτάρων με τη μέθοδο Bradford.

Παρατηρούμε ότι απουσία οιστραδιόλης, η υπερέκφραση τόσο του ERβ όσο και του mtERβ προκαλεί ενεργοποίηση της παραγωγής ATP. Παρουσία οιστραδιόλης η δράση αυτή είτε ενισχύεται ελάχιστα είτε ανάλογα με την αποικία που μελετάμε παρουσιάζει και μείωση.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα οιστρογόνα διαδραματίζουν αρκετά σημαντικό ρόλο στην αύξηση, ανάπτυξη και διαφοροποίηση των αρσενικών και θηλυκών δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου. Η ενδοκυττάρια σηματοδότηση των οιστρογόνων πραγματοποιείται μέσω των

δύο υποδοχέων οιστρογόνων, τον ERα και ERβ, που ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και πιο συγκεκριμένα στους υποδοχείς στεροειδών ορμονών.

Όλο και περισσότερες έρευνες των τελευταίων χρόνων υποστηρίζουν ότι ο υποδοχέας οιστρογόνων βήτα εισέρχεται στα μιτοχόνδρια αρκετών κυτταρικών τύπων, υποδεικνύοντας ότι διαδραματίζει ένα πιθανό ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργία του συγκεκριμένου υποκυτταρικού οργανιδίου, όσο αφορά την παραγωγή ενέργειας, την έκφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματός, τη βιογένεσή του καθώς και την εμπλοκή του σε άλλες μιτοχονδριακές λειτουργίες (Psarra *et al.* 2006, 2008).

Ως εκ τούτου, έγινε προσπάθεια από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας για διερευνηθεί η μιτοχονδριακή δράση του ERβ, με σκοπό τη διαλεύκανση του ρόλου και των μηχανισμών με τους οποίους αυτή επιτελείται. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, κατασκευάστηκαν από το συνάδελφο Βύρωνα Γοργογιέτα, στα πλαίσια της διδακτορικής του διατριβής, σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος Neuro-2a, που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων βήτα με ή χωρίς μιτοχονδριακή στόχευση. Η εισαγωγή του αντίστοιχου γονιδίου στα κύτταρα έγινε σε χιμαιρικό αναγνωστικό πλαίσιο με το γονίδιο αναφοράς GFP, για τον ευκολότερο εντοπισμό της εκφρασμένης πρωτεΐνης, ενώ κατασκευάστηκαν και κύτταρα control (μάρτυρες), που υπερεκφράζουν μόνιμα το γονίδιο GFP με ή χωρίς μιτοχονδριακή στόχευση.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης που έλαβε χώρα στα πλαίσια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας, έγινε προσπάθεια για τον χαρακτηρισμό των σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών Neuro-2a, όσο αφορά τα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα, με ή χωρίς μιτοχονδριακή στόχευση. Τα επίπεδα έκφρασης των ERβ και mtERβ προσδιορίστηκαν αρχικά με μικροσκοπία φθορισμού, στη συνέχεια με real-time qPCR σε επίπεδο ώριμων μεταγράφων (mRNA) και έπειτα με Western blot σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Τέλος, σε επόμενο στάδιο, διερευνήθηκε η επίδραση του μιτοχονδριακού ERβ στα επίπεδα του ενδοκυτταρικά παραγόμενου ATP, με σκοπό τη συσχέτιση της δράσης του υποδοχέα με τους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας που λαμβάνουν χώρα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο μιτοχόνδριο.

Στα πρώτα στάδια της έρευνας μας, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μικροσκοπίας φθορισμού προσδιορίστηκαν οι αποικίες των σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών που παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα της χιμαιρικής πρωτεΐνης GFP-ERβ με ή χωρίς μιτοχονδριακή στόχευση, όσο αφορά τις κυτταρικές σειρές N2a-GFPERβ και N2a-mtGFPERβ, καθώς και οι αποικίες που παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση της πρωτεΐνης αναφοράς GFP με ή χωρίς μιτοχονδριακή στόχευση, όσο αφορά τις κυτταρικές σειρές control N2a-GFP και N2a-mtGFP. Αυτές είναι οι αποικίες 16 και 19 των κυττάρων mtGFP, οι 25 και 27 των κυττάρων GFPERβ και οι 37 και 38 των κυττάρων mtGFPERβ.

Σε δεύτερο στάδιο, για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με την εφαρμογή της μικροσκοπίας φθορισμού, ελέγχθηκαν τα επίπεδα του ώριμου RNA (mRNA) στις υπό μελέτη αποικίες με εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time qPCR) με σκοπό τον ακριβέστερο χαρακτηρισμό των κυτταρικών μας σειρών και την ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων των ώριμων mRNA του ERβ. Πιο συγκεκριμένα, έγινε έλεγχος κυττάρων N2a-mtGFP στην αποικία 19, N2a-mtGFPERβ στις αποικίες 11, 37 και 38 και N2a-GFPERβ στις αποικίες 2, 25 και 27, οι οποίες σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης με εφαρμογή της μικροσκοπίας φθορισμού παρουσίαζαν τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης GFP-ERβ, με ή χωρίς μιτοχονδριακή στόχευση. Ως control (calibrator) χρησιμοποιήθηκε το mtGFP 19 και έγινε σύγκριση των επιπέδων των mRNA όλων των υπόλοιπων δειγμάτων σε σχέση με αυτό.

Από τα αποτελέσματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου φάνηκε ότι ο μιτοχονδριακός ERβ εμφανίζει δύο με τρεις φορές υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στις αποικίες 37 και 38, συγκριτικά με τα επίπεδα των αποικιών αναφοράς N2a-mtGFP (αποικία 19), ενώ δεν παρατηρούμε αύξηση στην αποικία 11. Όσο αφορά τα επίπεδα έκφρασης του πυρηνικού ERβ παρατηρούμε πολύ μικρή αύξηση στις αποικίες 2 και 27 (στατιστικώς μη σημαντική), ενώ δεν παρατηρήθηκε αύξηση στην αποικία 25.

Στη συνέχεια, διερευνήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών GFPERβ και mtGFPERβ με εφαρμογή της μεθόδου western blotting, με χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι του ERβ. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι ένα μεγάλο πρόβλημα που αναδεικνύεται από την διεθνή βιβλιογραφία είναι η έλλειψη αποτελεσματικών και υψηλής ευαισθησίας αντισωμάτων έναντι του ERβ. Στο γεγονός αυτός σε σημαντικό βαθμό οφείλεται και η περιορισμένη εξαγόμενη γνώση σε σχέση με το ρόλο του ERβ και τους μηχανισμούς δράσης του. Δεδομένου ότι τόσο η μικροσκοπία φθορισμού και η RT-PCR αναδείκνυαν τη δημιουργία επιτυχώς διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών, τουλάχιστον όσο αφορά την υπερέκφραση του mtGFPERβ, θελήσαμε να ελέγξουμε τα επίπεδα έκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης GFPERβ με ή χωρίς μιτοχονδριακή στόχευση στις κυτταρικές σειρές που δημιουργήθηκαν με χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων και παράλληλα να ελεγχθεί και η αποτελεσματικότητα των συγκεκριμένων αντισωμάτων. Αρχικά επικεντρωθήκαμε στον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης του μιτοχονδριακού GFPERβ, ο οποίος, σύμφωνα με τις μελέτες της μικροσκοπίας φθορισμού και real-time qPCR, έδειξε και τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης. Οι αποικίες που μελετήθηκαν για τις κυτταρικές σειρές N2a-GFP και N2a-mtGFP ERβ ήταν 15, και 11, 38 αντίστοιχα. Από τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία παρατηρήθηκε ότι σε σύγκριση με την αποικία αναφοράς GFP 15, οι αποικίες mtGFPERβ 37 και 38 εμφάνιζαν αυξημένα επίπεδα ERβ κατά 1μιση-2μιση φορές, με την αποικία 37 να παρουσιάζει μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με την αποικία 38, ενώ στην αποικία 11 δεν παρατηρήθηκε αύξηση με χρήση του αντισώματος MCA. Η μεγαλύτερη επαγωγή

των επιπέδων έκφρασης σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε σχέση με αυτό σε επίπεδο mRNA πιθανόν να οφείλεται στην μεγαλύτερη αστάθεια του δεύτερου.

Ωστόσο, επειδή η αποικία 38 εμφάνισε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης mtGFP-ERβ και με βάση τη μικροσκοπία φθορισμού, έγινε επανέλεγχος των επιπέδων έκφρασης της, καθώς και έλεγχος των επιπέδων έκφρασης του GFPERβ στην αποικία 25, συγκριτικά με τις αποικίες αναφοράς GFP και mtGFP. Παρόλ' αυτά, δεν θα μπορούσαμε να αγνοήσουμε και τα υψηλά ποσοστά έκφρασης του mtGFP-ERβ που παρουσιάζει η αποικία 37, γι' αυτό ένας από τους μελλοντικούς μας στόχους είναι η περαιτέρω διερεύνησή της. Όσο αφορά τον επανέλεγχο με την τεχνική της Western Blot, παρατηρήθηκε επανάληψη των αποτελεσμάτων που δείχνουν υπερέκφραση του mtGFPERβ (με τη μορφή κολοβωμένης πρωτεΐνης μοριακού βάρους αντίστοιχου του ERβ) στην αποικία 38 κατά 3,5 φορές περίπου, ενώ του GFPERβ κατά 6 φορές, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς mtGFP (αποικία 19) και GFP (αποικία 15), αντίστοιχα. Η υπερίσχυση της κολοβωμένης έναντι της ακέραιης GFP χιμαιρικής πρωτεΐνης μπορεί να οφείλεται είτε στην ύπαρξη μη ικανοποιητικής ευαισθησίας των διαθέσιμων αντισωμάτων να ανιχνεύσουν την ακέραιη χιμαιρική πρωτεΐνη ή όντως σε υπερίσχυση της κολοβωμένης μορφής έναντι της χιμαιρικής, δεδομένης της μειωμένης σταθερότητας της πρωτεΐνης στα μιτοχόνδρια όταν αυτή υπερεκφράζεται, μιας και καθίσταται τοξική. (Okamoto k et al. 2001)

Έπειτα, η υπερέκφραση του GFPERβ στην αποικία 25 επανελέχθηκε μέσω της μεθόδου WB, τόσο με τη χρήση του αντισώματος MCA όσο και όσο και με τη χρήση ενός άλλου εμπορικά διαθέσιμου αντισώματος του H150. Από τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, παρατηρήθηκε επαλήθευση περίπου 2-2μισή φορές της υπερέκφρασης του ERβ στην αποικία 25, συγκριτικά με τα κύτταρα αναφοράς GFP (αποικία 15). Ενώ παράλληλα με τη χρήση του αντισώματος H-150 ανιχνεύτηκε η παρουσία και της ακέραιης μη κολοβωμένης μορφής GFPERβ στην κυτταρική σειρά N2a-GFPERβ (αποικία 25) και όχι στην κυτταρική σειρά control N2a-GFP (αποικία 15) επαληθεύοντας την υπερέκφραση της χιμαιρικής GFPERβ πρωτεΐνης στα N2a-GFPERβ κύτταρα. Με χρήση αντισώματος έναντι GFP επαληθεύτηκε και η παρουσία της μιτοχονδριακής GFPERβ πρωτεΐνης, στην ακέραια μορφή της (90 kDa) στα N2a-mtGFPERβ (αποικία 38) και όχι στα αντίστοιχα N2a-mtGFP κύτταρα αναφοράς.

Σε επόμενο στάδιο της έρευνάς μας, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης του μιτοχονδριακού ERβ στα επίπεδα του ενδοκυτταρικά παραγόμενου ATP, με σκοπό τη συσχέτιση της δράσης του υποδοχέα με τους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας που λαμβάνουν χώρα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στο μιτοχόνδριο. Ωστόσο προηγήθηκε κάποια μελέτη με σκοπό τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου της μέτρησης του ενδοκυτταρικά παραγόμενου ATP στα κύτταρά μας.

Αρχικά, έγινε φανερό ότι η προσθήκη Triton X-100 στο διάλυμα λύσης του ιζήματος καρκινικών κυττάρων ενδομητρίου HeLa οδήγησε σε πιο αποτελεσματική εκχύλιση

του ATP, όπως έδειξαν τα αποτελέσματα του λουμινόμετρου. Παρόλ' αυτά, σε επόμενη δοκιμαστική μέτρηση ATP σε κύτταρα N2a stable mtGFP (αποικία 19) παρουσία και απουσία οιστραδιόλης E<sub>2</sub>, η λύση του κυτταρικού ιζήματος πραγματοποιήθηκε χωρίς την προσθήκη Triton X-100. Όπως αναμενόταν, η προσθήκη οιστραδιόλης ενίσχυσε την παραγωγή ATP. Όμως οι απόλυτες τιμές παραγόμενου φωτός ήταν πολύ μειωμένες σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα, πιθανόν λόγω απουσίας του Triton.

Γι' αυτό το λόγο, στη συνέχεια, έγινε επανέλεγχος της μέτρησης του ενδοκυτταρικά παραγόμενου ATP σε κύτταρα N2a-mtGFP (αποικία 19) αλλά αυτή τη φορά η λύση του κυτταρικού εκχυλίσματος έγινε με ddH<sub>2</sub>O και προσθήκη Triton X-100, ενώ παραλήφθηκε και η λύση τους με χρήση υπερήχων (sonication). Οι απόλυτες τιμές μετρούμενου φωτός από τη συγκεκριμένη μέτρηση αυξήθηκαν σε σχέση και με τα δύο προηγούμενα πειράματα, αλλά επίσης παρατηρήθηκε μη επαγωγή της παραγωγής ATP παρουσία E<sub>2</sub>, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα.

Στη συνέχεια, έχοντας βελτιστοποιήσει το πειραματικό πρωτόκολλο με βάση τις προηγούμενες μετρήσεις, πραγματοποιήσαμε μέτρηση των επιπέδων του ATP στο κυτταρόπλασμα κυτάρων N2a-GFP (αποικία 15), N2a-GFP-ERβ (αποικία 25) και N2a-mtGFP-ERβ (αποικία 38) παρουσία και απουσία E<sub>2</sub>. Ωστόσο, οι απόλυτες τιμές χημιοφωταύγειας που προσδιορίστηκαν δεν ήταν οι αναμενόμενες όσο αφορά την τάξη μεγέθους, γι' αυτό και αποφασίσαμε να επαναλάβουμε το πείραμα απουσία Triton X-100.

Σε επόμενη φάση, προχωρήσαμε σε μέτρηση του ATP στο κυτταρόπλασμα κυτάρων N2a-mtGFP στην αποικία 16, N2a-GFP-ERβ στις αποικίες 25 και 27 και N2a-mtGFP-ERβ στις αποικίες 11 και 38, απουσία και παρουσία οιστραδιόλης (E<sub>2</sub>) και έπειτα προχωρήσαμε σε λύση του κυτταρικού ιζήματος με βάση το προηγούμενο πρωτόκολλο, αλλά χωρίς προσθήκη Triton X-100. Παρατηρούμε ότι απουσία οιστραδιόλης, η υπερέκφραση τόσο του ERβ όσο και του mtERβ προκαλεί ενεργοποίηση της παραγωγής ATP. Παρουσία οιστραδιόλης η δράση αυτή είτε ενισχύεται ελάχιστα είτε ανάλογα με την αποικία που μελετάμε παρουσιάζει και μείωση. Τα υψηλότερα επίπεδα επαγωγής παρατηρούνται στις αποικίες που παρουσιάζουν τα υψηλότερα επίπεδα ERβ με ή χωρίς μιτοχονδριακή στόχευση, υποδηλώνοντας την εμπλοκή του ERβ στην παραγωγή ATP. Η μη περαιτέρω αύξηση στην παραγωγή ATP παρουσία E<sub>2</sub> πιθανόν να οφείλεται στην ήδη ενεργοποίηση των κυτάρων λόγω της υπερέκφρασης του ERβ. Ωστόσο, ένας από τους άμεσους στόχους μας έπειτα είναι να πραγματοποιήσουμε την παραπάνω μέτρηση και παρουσία Triton X-100, προκειμένου να εξάγουμε ένα πιο ασφαλές συμπέρασμα.

Μέσα στους μελλοντικούς μας στόχους, όσο αφορά τη συνέχιση της έρευνας, είναι ο χαρακτηρισμός περισσότερων αποικιών των σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών



μας σειρών Neuro-2a που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων με ή χωρίς μιτοχονδριακή στόχευση. Κρίνεται απαραίτητη η επαναληπτική διερεύνηση της ύπαρξης και η ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση των επιπέδων του ERβ, σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο στις υπό μελέτη αποικίες μας καθώς και σε νέες, με σκοπό την αποτελεσματικότερη σύγκρισή τους και στον εντοπισμό αποικιών όπου τα επίπεδα των επιθυμητών υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών θα είναι τέτοια ώστε να μην είναι τοξικά και θα επιτρέπουν τη διατήρηση της ακέραιης χιμαιρικής πρωτεΐνης. Αυτό θα βοηθήσει στην περαιτέρω διερεύνηση της μιτοχονδριακής δράσης του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα, όσο αφορά την παραγωγή ενέργειας, τη ρύθμιση της αναπνευστικής αλυσίδας καθώς τη ρύθμιση της έκφρασης των μιτοχονδριακών γονιδίων. Όσο αφορά την παραγωγή ενέργειας μένει να διαλευκανθεί εάν το ATP που μετρήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι μιτοχονδριακής προέλευσης, ενώ όσο αφορά τη γονιδιακή ρύθμιση μελλοντικός σκοπός μας είναι η διερεύνηση των επιπέδων των mRNA των γονιδίων της αναπνευστικής αλυσίδας στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον μιτοχονδριακό υποδοχέα οιστρογόνων.

Όλα αυτά θα συμβάλλουν στην αποσαφήνιση της πυρηνικής αλλά και μιτοχονδριακής οιστρογονικής σηματοδότησης κάτι που θα βοηθήσει και στη διαλεύκανση του ρόλου του υποδοχέα οιστρογόνων στην παθογένεση ορισμένων μορφών καρκίνου αλλά και άλλων διαταραχών όπως τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα.

## Βιβλιογραφία

1. Marc Robinson-Rechavi, Hector Escrive Garcia, Vincent Laudet (2003), “The nuclear receptor superfamily”, *Journal of Cell Science* 116, 585-586
2. Jerrold M. Olefsky, (July 17, 2001), “Nuclear Receptor Minireview Series”, *The journal of biological chemistry*, Vol. 276, No. 40, pp. 36863–36864
3. Shao-Hua Yang, Ran Liu, Evelyn J. Perez, Yi Wen, Stanley M. Stevens, Jr. Thomas Valencia, Anne-Marie Brun-Zinkernagel, Laszlo Prokai, Yvonne Will, James Dykens, Peter Koulen, James W. Simpkins, (March 23, 2004), “Mitochondrial localization of estrogen receptor”, *PNAS*, vol. 101, no. 12, 4130 – 4135
4. Bonnie J. Deroo, Adrian V. Buensuceso, (2010), “Minireview: Estrogen Receptor- $\beta$ : Mechanistic Insights from Recent Studies”, *Molecular Endocrinology* 24: 1703–1714
5. Nina Heldring, Ashley Pike, Sandra Andersson, Jason Matthews, Guojun Cheng, Johan Hartman, Michel Tujague, Anders Strom, Eckardt Treuter, Margaret Warner, Jan-Ake Gustafsson, (July 2007), “Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets”, *The American Physiological Society*, vol 87, 905–931
6. James W. Simpkins, Shao-Hua Yang, Saumyendra N. Sarkar, Virginia Pearce, (2008), “Estrogen actions on mitochondria – Physiological and pathological implications”, *Molecular and Cellular Endocrinology* 290, 51–59
7. Tien-Ling Liao, Chii-Ruey Tzeng, Chao-Lan Yu, Yi-Pei Wang, Shu-Huei Kao, (2015), “Estrogen receptor –  $\beta$  in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis”, *Annals of the New York Academy of sciences*, 1350, 52–60
8. M. Beato, J. Klug, (2000), “Steroid hormone receptors: An update”, *Human reproduction update*, Vol. 6, No 3, pp. 225-236
9. George G.J.M. Kuiper, Jan-Ake Gustafsson (1997), “The novel estrogen receptor- $\beta$  subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens”, *FEBS Letters* 410, 87-90
10. Linda Björnström, Maria Sjöberg, (April 2005), “Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes”, *Molecular Endocrinology*, 19(4):833–842
11. Richard Sever, Christopher K. Glass, (July 23, 2016), “Signaling by Nuclear Receptors”, Cold Spring Harbor Laboratory Press,
12. Pierre Germain, Bart Staels, Catherine Dacquet, Michael Speeding, Vincent Laudet, (2006), “Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors”, *Pharmacological Reviews*, Vol. 58, No. 4, 58:685–704
13. KSR Sastry, MA Al-Muftah, Pu Li, MK Al-Kowari, E Wang, A Ismail Chouchane, D Kizhakayil, G Kulik, FM Marincola, A Haoudi, L Chouchane, (2014), “Targeting proapoptotic protein BAD inhibits survival and self-renewal of cancer stem cells”, *Cell Death and Differentiation*, 21,1936–1949

14. Krishnan M. Dhandapani, Darrell W. Brann, (2002), "Protective Effects of Estrogen and Selective Estrogen Receptor Modulators in the Brain", *Biology of reproduction*, 67,1379–1385
15. Lydia L. DonCarlos, Iñigo Azcoitia, Luis M. Garcia-Segura, (2009), "Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators", *National Institute of health Public Access Author Manuscript*, 34S1: S113–S122
16. Anna-Maria G. Psarra, Constantine E. Sekeris, (2008), "Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment", *Elsevier B.V.*, 1783, 1–11
17. Anna-Maria G. Psarra, Constantine E. Sekeris, (2008), "Steroid and Thyroid Hormone Receptors in Mitochondria", *IUBMB Life*, 60(4): 210–223
18. Constantine E. Sekeris, (1990), "The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones", *In vivo*, 4(5):317-20.
19. Jin-Qiang Chen, Patrick R. Cammarata, Christopher P. Baines, James D. Yager, (2009), "Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications", *Elsevier B.V*, 1793, 1540–1570
20. Okamoto K. Perlman PS, Butow RA, *Targeting of green fluorescent protein to mitochondria. Mitochondria (Edited by Lisa A Pon, Eric A. Schon) Academic Press, 2001, page 277-283.*
21. A.-M.G. Psarra, S. Solakidi, C.E. Sekeris, (2006), "The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: Presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells", *Elsevier Molecular and cellular Endocrinology*, Vol. 246, Issues 1–2, p. 21–33