

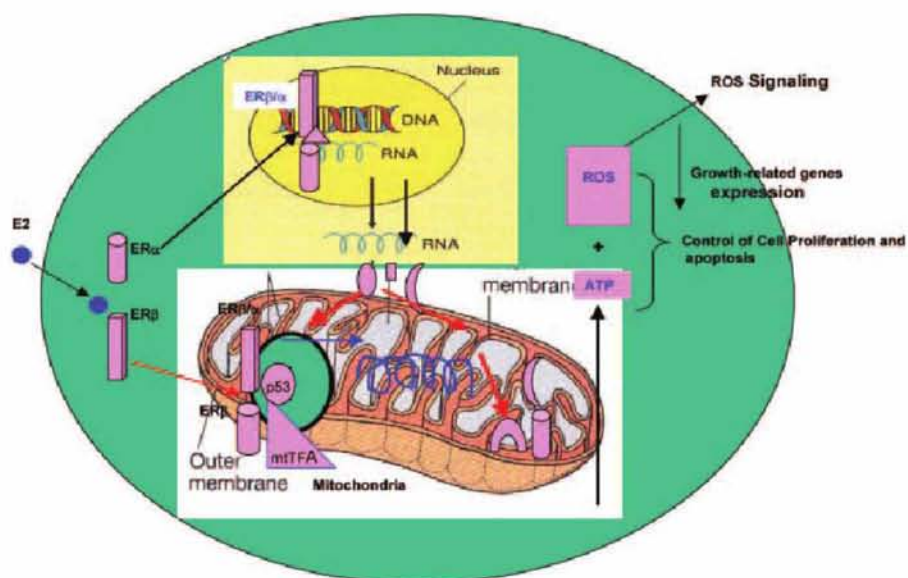


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟΝ  
 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΕ ΝΕΥΡΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ»

«ISOLATION OF MITOCHONDRIAL ESTROGEN RECEPTOR  
 INTERACTING MOLECULES IN NEURONAL CELLS»



Όνοματεπώνυμο: Κουκλαράνη-Γιαννούλη Γεωργία

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Άννα-Μαρία Γ. Ψαρρά

Λάρισα 2017

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**, Καθηγητής Βιοχημείας, ΤΒΒ, Π.Θ.

**Σαμιωτάκη Μαρίνα**, Λειτουργικός επιστήμονας Β, Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ" .

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	σελ.4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	σελ.5
ABSTRACT.....	σελ.6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ.8
1.1 ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ.....	σελ.8
1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ.....	σελ.9
1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	σελ.10
1.3.1 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ.....	σελ.10
1.3.2 ΔΟΜΗ ERs.....	σελ.11
1.3.3 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	σελ.12
1.3.4 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Β (ERβ).....	σελ.13
1.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERs.....	σελ.14
1.4.1 ΠΡΟΣΔΕΤΟΕΞΑΡΤΟΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ERs.....	σελ.14
1.4.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ERs ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΕΤΗ.....	σελ.15
1.4.3 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ERs.....	σελ.15
1.4.4 ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ERs.....	σελ.15
1.5 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ ΚΑΙ ERβ.....	σελ.17
1.5.1 ΔΡΑΣΗΤΟΥ ERβ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	σελ.19
1.6 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	σελ.21
1.7 ERs ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ .....	σελ.21
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	σελ.22
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	σελ.23
3.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	σελ.23
3.2 ΥΛΙΚΑ.....	σελ.23
3.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	σελ.27
3.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	σελ.28
4. ΑΠΟΤΕΛΑΕΜΑΤΑ.....	σελ.37
4.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ.....	σελ.37
4.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ N <sub>2</sub> A mtGFP C16 ΚΑΙ 19 ΚΑΙ N <sub>2</sub> A mtGFPERβ C34 ΚΑΙ 38 ΚΥΤΤΑΡΑ.....	σελ.38
4.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΜΟΡΦΗ ΤΟΥ ERβ.....	σελ.40
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	σελ.42
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	σελ.45

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας κα. Άννα-Μαρία Ψαρρά Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να συμμετάσχω στην ερευνητική της ομάδα και να μάθω πλήθος τεχνικών, καθώς επίσης και για την πολύτιμη καθοδήγησή της κατά τη διεξαγωγή της διπλωματικής μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, τον κ. Λεωνίδα Δημήτριο Καθηγητή Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την κα. Σαμιωτάκη Μαρτίνα, Λειτουργικό επιστήμονα Β, του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ".

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτωρ Βύρων Γοργογιέτα για την υπομονή του και την βοήθεια που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στην ερευνητική μελέτη λύνοντάς μου οποιαδήποτε απορία και παρέχοντάς μου τια απαραίτητες επεξηγήσεις, καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την ομαλή συνεργασία.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου που με την οικονομική και ηθική στήριξη τους, καθώς και με την υπομονή και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν με βοήθησαν να ολοκληρώσω ένα μεγάλο και σημαντικό κομμάτι των σπουδών μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στη Λάρισα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs) ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και είναι υποδοχείς στεροειδών ορμονών με δράση μεταγραφικών παραγόντων. Εντοπίζονται σε δύο κύριους υπότυπους: στον υποδοχέα οιστρογόνων  $\alpha$  (Estrogen Receptor alpha, ER $\alpha$ , NR3A1) και στον υποδοχέα οιστρογόνων  $\beta$  (Estrogen Receptor beta, ER $\beta$ , NR3A2) με διαφορετικό εντοπισμό σε επίπεδο ιστών, αλλά και με διαφορετική επίδραση σε επίπεδο κυττάρου. Οι προσδέτες-ενεργοποιητές τους είναι τα οιστρογόνα με το πιο δραστικό οιστρογόνο που παράγεται στον οργανισμό να είναι η 17  $\beta$ -οιστραδιόλη (E<sub>2</sub>).

Όλο και περισσότεροι ερευνητές τα τελευταία χρόνια δείχνουν μεγάλο ενδιαφέρον στις δράσεις του ER $\beta$  στο μιτοχόνδριο, έπειτα από μελέτες που έδειξαν την παρουσία του στα οργανίδια αυτά. Τα μιτοχόνδρια είναι πολύ σημαντικά κυτταρικά οργανίδια καθώς είναι υπεύθυνα για την επιβίωσή του κυττάρου εφόσον παράγουν περισσότερο από το 90% της απαιτούμενης ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, εμπλέκονται σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή της ουρίας, στη βιοσύνθεση της αίμης, καθώς και στη  $\beta$ -οξείδωση των λιπαρών οξέων. Όπως έχει δηχθεί τα μιτοχόνδρια αποτελούν συστατικά-κλειδιά στην απόκριση του κυττάρου σε καταστάσεις στρες καθώς κατέχουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες ρυθμίζοντάς το μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στη γήρανση. Φέρουν το δικό τους γονιδίωμα, που κωδικοποιεί για ένα πολύ μικρό μέρος των πρωτεϊνών που συνολικά εντοπίζονται εντός αυτών. Για το λόγο αυτό, η δραστηριότητά τους βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στην εύρυθμη συνεργασία τους με τον πυρήνα, για τη σύνθεση και είσοδο των απαραίτητων μορίων για την ομαλή έκβαση των μεταβολικών και μη μονοπατιών που πραγματοποιούνται μερικώς ή κατ'εξοχήν στα μιτοχόνδρια. Ο ER $\beta$  μέσω του πυρήνα επηρεάζει τα επίπεδα μεταγραφής ρυθμιστών των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων με μιτοχονδριακή δράση ή τα επίπεδα μεταγραφής των κωδικοποιούμενων από τον πυρήνα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Εκτός αυτών, μελέτες δείχνουν πως ο ER $\beta$  ασκεί και πιο άμεσες επιδράσεις στα μιτοχόνδρια, μέσω της εισόδου του εντός αυτών, που αφορούν στην κυτταρική επιβίωση σε καταστάσεις στρες, στο ρυθμό μεταγραφής των μιτοχονδριακών γονιδίων, στην παραγωγή ενέργειας κλπ.

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί τη τρίτη επανάληψη του ελέγχου των μορίων που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τον ER $\beta$  εντός του μιτοχονδρίου, με σκοπό να διευρύνουμε τις γνώσεις μας σχετικά με τους πιθανούς ρόλους του μιτοχονδριακού υποδοχέα και τον χαρακτηρισμό των βιοχημικών μονοπατιών στην ρύθμιση των οποίων αυτός εμπλέκεται επηρεάζοντας έτσι την φυσιολογία ολόκληρου του κυττάρου. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση για την απομόνωση των μιτοχονδρίων και στη συνέχεια ανοσοκατακρήμνιση (IP) του ER $\beta$  με μιτοχονδριακή στόχευση και των μορίων που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα μαζί του με τη χρήση μιτοχονδριακών εκχυλισμάτων από κύτταρα N<sub>2</sub>A mtGFP και N<sub>2</sub>A mtGFPER $\beta$  με χρήση ειδικών αντισωμάτων τόσο έναντι της GFP πρωτεΐνης όσο και έναντι του ER $\beta$ . Ο χαρακτηρισμός των μορίων αυτών με τη μέθοδο της φασματομετρίας μάζας και πρωτεομική ανάλυση είναι σε εξέλιξη και πραγματοποιείται σε συνεργασία με το Ινστιτούτο "Αλέξανδρος Φλέμινγκ" και τους Δρ. Μαρτίνα Σαμιωτάκη και Γιώργο Παναγιώτου.

Τα αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες έδειξαν εμπλοκή του υποδοχέα σε αρκετά μεταβολικά μονοπάτια των μιτοχονδρίων, όπως οξειδωτική φωσφορυλίωση, μεταβολισμό γλυκόζης, και κύκλο του κιτρικού οξέος, βιοσύνθεση στεροειδών και σε μηχανισμούς εισαγωγής στο μιτοχόνδριο αναδεικνύοντας νέους ρόλους του υποδοχέα στο μιτοχονδριακό περιβάλλον και καθιστώντας απαραίτητη την επαλήθευση αυτών, μέσω της παρούσας μελέτης. Το σύνολο αυτών των αποτελεσμάτων συντελεί στην ακριβέστερη και ευρύτερη εικόνα της μιτοχονδριακής επίδρασης του ERβ, σε επίπεδο συμμετοχής του σε μεταβολικά μονοπάτια πολύ μεγάλης σημασίας για την ομαλή λειτουργία του κυττάρου.

## **ABSTRACT**

Estrogen receptors (ERs) belong to the superfamily of nuclear receptors. They are steroid receptors and mainly act as transcription factors. These receptors exist in two distinct types: Estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ , NR3A1) and Estrogen receptor beta (ER $\beta$ , NR3A2) which are differentially expressed in body tissues. Furthermore, besides their different localization, they seem to differ regarding their target genes and their actions upon ligand binding and activation. Their ligand-activators in live organism are the estrogens with the most active one the 17 $\beta$ -estradiol (E $_2$ ).

In recent years their mitochondrial localization has been documented and more and more researchers have shown great interest in the elucidation of ER $\beta$ 's actions in this organelle, following studies showing their presence in these organelles. Mitochondria are very important cellular organelles while are responsible for the survival of the cell since they produce more than 90% of required energy via oxidative phosphorylation. Moreover, they are involved in many steps of intermediate metabolism, in urea production, heme biosynthesis and  $\beta$ -oxidation of fatty acids. Mitochondria are key components of the stress response as they play a central role in oxidative stress through generation of reactive oxygen species, cell differentiation and aging. They carry their own genome, which codes for a very small part of proteins which in total are located in them. For this reason, they are based to a great extent on the nucleus, for the synthesis and transport of molecules into them, necessary for the numerous metabolic and non-metabolic pathways taking place in them. As a nuclear transcription factor, ER $\beta$  affects the levels of regulators of the synthesis of nuclear encoded mitochondrial targeted transcription factors or the levels of transcription of the nuclear encoded proteins involved in oxidative phosphorylation. However, studies show that ER $\beta$  exerts also direct effects on mitochondria, through its import, and regulation of cell survival under stress conditions, the rate of transcription of mitochondrial genes, energy production, etc.

This diploma study constitutes the third repetition of a series of experiment aimed to characterize the molecules that interact directly or indirectly with ER $\beta$  inside the mitochondria in order to broaden our knowledge of the possible roles of the mitochondrial receptor and the characterization of the biochemical pathways in the regulation of which are involved in influencing the physiology of the entire cell. For that purpose mitochondrial, fractionation and isolation from N2A cells stably transfected to produce the mtGFP (N $_2$ A mtGFP cells) and the mtGFPER $\beta$  (N $_2$ A

mtGFPER $\beta$  cells) proteins was achieved. Immunoprecipitation of the mitochondrial targeted ER $\beta$  from the N2A mtGFPER $\beta$  mitochondrial extracts, was followed by the use of an  $\alpha$ -GFP and an  $\alpha$ -ER $\beta$  antibody. Immunoprecipitated proteins of mitochondrial extracts from N<sub>2</sub>A mtGFP cells, by the use of  $\alpha$ -GFP antibody were used as controls. Characterization of the immunoprecipitated molecules is in progress and is achieved in collaboration with Dr. Martina Samiotaki and Dr. George Panayiotou from Alexandros Fleming Institute, by the application of mass spectrometry and proteomic analysis.

Our preliminary results showed involvement of the receptor in several metabolic pathways in mitochondria, such as oxidative phosphorylation, glycolysis, citric acid cycle, steroid biosynthesis and mitochondrial import mechanisms with many of the molecules of such paths associated with the pathogenesis of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer and Huntington's. Our results shed light to the elucidation of the role of the mitochondrial ER $\beta$ , in transcription regulation and in the regulation of many mitochondrial biochemical pathways of paramount importance for the smooth functioning of the cell.

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

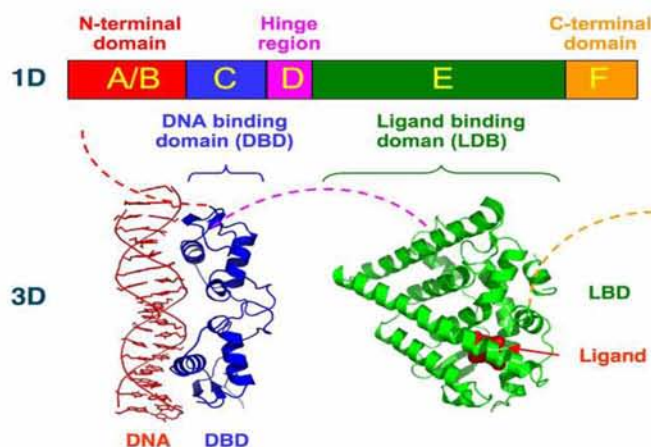
### 1.1 ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (nuclear receptors, NRs) αποτελούν μία υπερκογένεια μεταγραφικών παραγόντων, καθώς έχουν την δυνατότητα να προσδένονται άμεσα στο DNA και να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων ελέγχοντας την ομοίωση του οργανισμού, την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, το ανοσοποιητικό σύστημα και τον μεταβολισμό. Συνεπώς μια πιθανή δυσλειτουργία στη σηματοδότηση τους μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες που σχετίζονται, με τον μεταβολισμό, την ανάπτυξη ή την αναπαραγωγή. (M. Robinson-Rechavi et al, 2003, A.-M. Psarra et al, 2008)

Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι διαλυτοί και οι προσδέτες τους είναι λιπόφιλα μόρια που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη. Τα λιπόφιλα αυτά μόρια μπορεί να είναι στεροειδείς ορμόνες, θυρεοειδικές ορμόνες, η βιταμίνη D, και λιπαρά οξέα. Οι πυρηνικοί υποδοχείς εντοπίζονται ως μονομερή στην ανενεργή τους κατάσταση μέσα στο κύτταρο, και η σύνδεση με τον προσδέτη τους οδηγεί στον διμερισμό τους και στη συνέχεια στην πρόσδεση στο DNA και στην τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης είτε επάγοντας, είτε αίροντας την μεταγραφή γονιδίων. (Mc Ewan et al, 2009, Germain et al, 2006)

Στο σύνολο τους οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι πολύ συντηρημένοι καθώς έχουν την ίδια βασική δομή, η οποία περιλαμβάνει: ένα ευμετάβλητο τόσο σε μέγεθος όσο και σε αλληλουχία αμινοτελικό άκρο(A/B), μία εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή σύνδεσης με το DNA (DNA Binding Domain, DBD)(C) η οποία αποτελείται από δύο χαρακτηριστικές δομές δακτύλου ψευδαργύρου (zinc finger), μια μικρή περιοχή υπεύθυνη για τον πυρηνικό εντοπισμό του υποδοχέα(D) και ένα καρβοξυτελικό άκρο, υπεύθυνο για τη σύνδεση του υποδοχέα με τον προσδέτη του και τον ολιγομερισμό του (Ligand Binding Domain LBD)(E). Επιπλέον στο καρβοξυτελικό άκρο ορισμένων πυρηνικών υποδοχέων εντοπίζεται μια ακόμη επικράτεια, γνωστή ως επικράτεια F, η οποία είναι εξαιρετικά μεταβλητή και της οποίας ο ρόλος δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως. (R. Sever et al, 2013)

#### **Structural Organization of Nuclear Receptors**



Εικόνα 1. Δομική οργάνωση των πυρηνικών υποδοχέων (Y. Zhang et al,2015)



Οι πυρηνικοί υποδοχείς ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών, που λειτουργούν ως ομοδιμερή, στη δεύτερη οι υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος και θυρεοειδικών ορμονών RXR (retinoid X receptor), που λειτουργούν ως ετεροδιμερή και στην τρίτη και τέταρτη κατηγορία περιλαμβάνονται οι “ορφανοί υποδοχείς, οι οποίοι λειτουργούν είτε ως ομοδιμερή (τρίτη κατηγορία), είτε ως μονομερή (τέταρτη κατηγορία) και δεν έχουν ταυτοποιηθεί φυσικοί προσδέτες γι’ αυτούς. (J. M. Olefsky et al. 2001).

## **1.2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ**

Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών αποτελούν μέλη της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων, συνεπώς πρόκειται για μεταγραφικούς παράγοντες, που εντοπίζονται στο πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα, ενώ κάποιοι έχουν εντοπιστεί και στην πλασματική μεμβράνη. Στην ανενεργή τους μορφή βρίσκονται συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsps (Heat shock proteins), ενώ με την σύνδεσή τους με τον κατάλληλο προσδέτη (στεροειδή ορμόνη) ενεργοποιούνται. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση του από την πρωτεΐνη θερμικού σοκ, τον διμερισμό του με έναν όμοιό του, προς σχηματισμό ενός ομοδιμερούς και τέλος, τη μετατόπιση του ομοδιμερούς στον πυρήνα. Εκεί, ο ενεργοποιημένος υποδοχέας, συνδέεται με το DNA σε κατάλληλα σημεία αλληλεπίδρασης, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης σε ορμόνες HREs (Hormone Response Elements) και βρίσκονται συνήθως στους υποκινητές των γονιδίων στόχων, επιτρέποντας έτσι την θετική ή αρνητική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Επίσης, είτε μέσω της αλληλεπίδρασής τους με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, είτε μέσω διασταυρούμενης επικοινωνίας τους με άλλα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια (cross talk), οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών μπορούν οδηγήσουν στην ενεργοποίηση πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων. (A.-M. Psarra et al, 2006, M. Beato et al, 2000)

Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών 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). (M. Beato et al, 2000) Οι ειδικοί προσδέτες για τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών, είναι οι στεροειδείς ορμόνες, λιπόφιλα μόρια, που έχουν ως πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη. Οι στεροειδείς ορμόνες διαχωρίζονται σε: α) στεροειδή του φύλου: οιστρογόνα, προγεστερόνη και τεστοστερόνη με τα παράγωγά της, β) γλυκοκορτικοειδή και αλτακορτικοειδή, που παράγονται από το φλοιό των επινεφριδίων και γ) σε όμοιες με τα στεροειδή ενώσεις, όπως είναι η βιταμίνη D. Οι στεροειδείς ορμόνες φτάνουν τους στόχους τους μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, συνδεδεμένες με πρωτεΐνες μεταφορείς, και λόγω της λιπόφιλης φύσης τους διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω απλής διάχυσης. Στη συνέχεια στα κύτταρα στόχους οι στεροειδείς ορμόνες συνδέονται με τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών και τους ενεργοποιούν. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ιδιαίτερα οι στεροειδείς ορμόνες του φύλου φαίνεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη ασθενειών και πιο συχνά στην εμφάνιση καρκίνου

του μαστού και του προστάτη, όπου κεντρικό ρόλο διαδραματίζουν τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα αντίστοιχα. (A.-M. Psarra et al, 2006, M. Beato et al, 2000)

### **1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ**

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs) ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και είναι υποδοχείς στεροειδών ορμονών με δράση μεταγραφικών παραγόντων. Μέσω της προσδετοεξαρτόμενης ενεργοποίησής τους επηρεάζουν πολλές φυσιολογικές διεργασίες στα θηλαστικά, με κυριότερες την αύξηση, την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των αρσενικών και θηλυκών δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, τη συμπεριφορά και στα δύο φύλα, την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη των οργάνων, την φυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος και τη διαμόρφωση των οστών. Προσδέτες των υποδοχέων οιστρογόνων είναι τα οιστρογόνα, με το πιο δραστικό οιστρογόνο που παράγεται στον οργανισμό να είναι η 17 β-οιστραδιόλη (E<sub>2</sub>). Λόγω της ευρείας δράσης των υποδοχέων οιστρογόνων στην φυσιολογία του ανθρώπου, έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται και στην ανάπτυξη ασθενειών όπως νευροεκφυλιστικές νόσοι, καρδιαγγειακές παθήσεις, παχυσαρκία, οστεοπόρωση, καθώς και στην ανάπτυξη ή και στην εξέλιξη καρκίνου και πιο ειδικά καρκίνου του μαστού, των ωοθηκών, του παχέως εντέρου, του προστάτη και του ενδομητρίου, όπου οι ERs μπορούν να αξιοποιηθούν και ως προγνωστικοί δείκτες. (J. R. Rettberg et al, 2013)

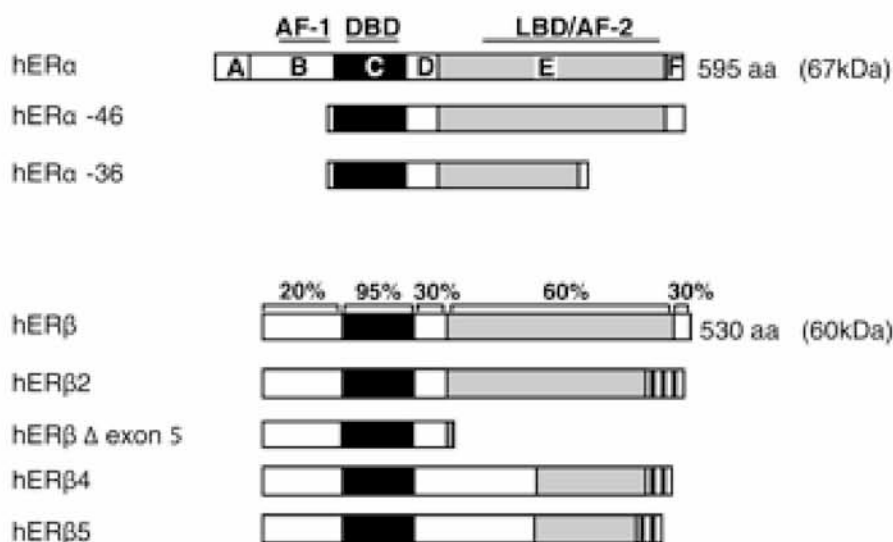
#### **1.3.1 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ**

Οι υποδοχείς οιστρογόνων εντοπίζονται σε δύο κύριους υπότυπους: στον υποδοχέα οιστρογόνων α (Estrogen Receptor alpha, ERα, NR3A1) και στον υποδοχέα οιστρογόνων β (Estrogen Receptor beta, ERβ, NR3A2) που ανήκουν στους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. (N. Heldring et al., 2007)

Οι ERα και ERβ είναι προϊόντα διαφορετικών γονιδίων, και πιο συγκεκριμένα των ESR1 (estrogen receptor 1) και ESR2 (estrogen receptor 2), που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Το γονίδιο ESR1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6, στο γενετικό τόπο 6q25.1 και εκφράζεται ως ERα με μοριακό βάρος 67-68 kDa, ενώ το γονίδιο ESR2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14, στο γενετικό τόπο 14q23.2 και εκφράζεται ως ERβ με μοριακό βάρος 59-60 kDa. (M. Beato et al. 2000) Επίσης έχει περιγραφεί μία μεγάλη ποικιλία από εναλλακτικά μετάγραφα, που οδηγούν σε διαφορετικά mRNA και για τους δύο τύπους υποδοχέων, ωστόσο, δεν είναι γνωστό το πότε εκφράζονται ως λειτουργικές πρωτεΐνες με βιολογική λειτουργία. (N.Heldring et al., 2007)

Τα εναλλακτικά μετάγραφα του ERα οδηγούν σε μικρότερες ισομορφές του, καθώς στερούνται την περιοχή AF-1 του αμινοτελικού άκρου. Οι ισομορφές αυτές δεν έχουν μέχρι στιγμής ταυτοποιηθεί σε ιστούς, αλλά έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον ERα αγρίου τύπου και να καταστέλλουν τη μεταγραφική ενεργότητα της AF-1 επικράτειάς του. Παρόλα αυτά, λόγω του ότι όλα αυτά τα

εναλλακτικά μετάγραφα συνήθως συνεκφράζονται μαζί με τον υποδοχέα αγρίου τύπου, ο ρόλος τους στην παθοφυσιολογία βρίσκεται υπό συνεχή διερεύνηση. Αντίθετα με τον ERα, έχουν περιγραφεί αρκετά εναλλακτικά μετάγραφα του ERβ, τα περισσότερα εκ των οποίων εκφράζονται στους ιστούς ως πρωτεΐνες και μπορούν να ρυθμίσουν τη σηματοδότηση των οιστρογόνων και κατ' επέκταση την έκφραση των γονιδίων στόχων. (N. Heldring et al., 2007)



Εικόνα 2. Ισομορφές των ERα και ERβ. Απεικονίζονται οι έξι επικράτειες (A-F) με τα αντίστοιχα ποσοστά ομολογίας μεταξύ ERα και ERβ. Όπως φαίνεται ο ERβ έχει μικρότερο μοριακό βάρος από τον ERα και περισσότερα εναλλακτικά μετάγραφα. Τα σημεία με τις κάθετες γραμμές στα μετάγραφα 2, 4 & 5 του ERβ απεικονίζουν τις διαφορές αυτών στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Να σημειωθεί ότι η έλλειψη του εξωνίου 5, που οδηγεί στην ισομορφή hERb Δ exon 5, έχει ως αποτέλεσμα τον τερματισμό της πρωτεΐνης πριν την περιοχή LBD. (N. Heldring et al., 2007)

### 1.3.2 ΔΟΜΗ ERs

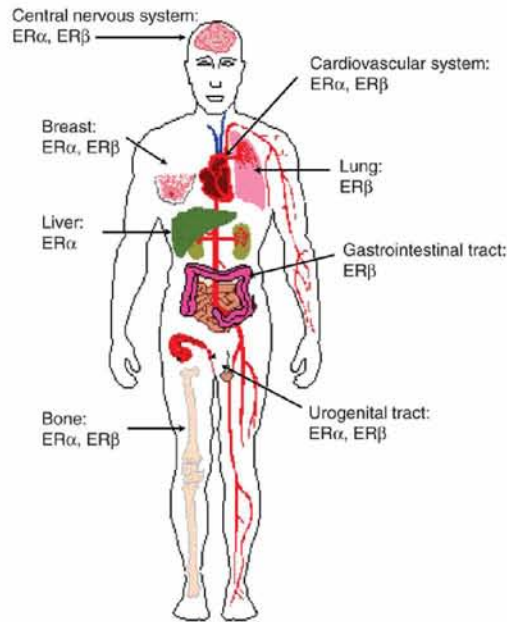
Και οι δύο τύποι υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ παρά το γεγονός ότι κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, διαθέτουν τη χαρακτηριστική δομική οργάνωση των λειτουργικών επικρατειών των υποδοχέων στεροειδών ορμονών. Συγκεκριμένες λειτουργικές επικράτειες (DBD και LBD) των παραπάνω υποδοχέων εμφανίζουν υψηλό βαθμό ομολογίας, με την DBD να εμφανίζει 97% ομολογία και την LBD 60%. Αντίθετα, στο αμινοτελικό άκρο που όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα των πυρηνικών υποδοχέων εμφανίζει μεγάλη ευμεταβλητότητα, το ποσοστό της ομολογίας αγγίζει μόλις το 20-30%. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι οι δύο υπότυποι ERα και ERβ αλληλεπιδρούν με πανομοιότυπες αλληλουχίες στο DNA, οι οποίες αποτελούν στοιχεία απόκρισης σε οιστρογόνα (Estrogen Response Elements, EREs) και παρουσιάζουν παρόμοια συγγένεια σύνδεσης με τους ενδογενείς αλλά και με συνθετικούς προσδέτες. (N. Heldring et al., 2007)

Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση διευκολύνεται από δύο διακριτές επικράτειες (Activation Functions, AF), την ιδιοσυστατικά ενεργή AF-1 που εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο και την εξαρτώμενη από τη σύνδεση του προσδέτη AF-2 που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο, στην επικράτεια LBD. Και οι δύο αλληλουχίες AF προσελκύουν μια σειρά συν-ρυθμιστικών πρωτεϊνών στον υποδοχέα που είναι συνδεδεμένος με το DNA. (N. Heldring et al, 2007)

### **1.3.3 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ**

Οι δύο τύποι υποδοχέων οιστρογόνων εκφράζονται σε διάφορους ιστούς, και με διαφορετικές επιδράσεις στη φυσιολογία των οργάνων στόχων. Ο ERα εκφράζεται κυρίως στους μαστούς, στη μήτρα και στον κόλπο αλλά και σε πολλά ακόμη όργανα-στόχους των οιστρογόνων, ενώ ο ERβ εμφανίζει ένα πιο περιορισμένο μοτίβο έκφρασης και εντοπίζεται στις ωοθήκες, στον προστάτη, στους όρχεις, στο σπλήνα, στους πνεύμονες, στον υποθάλαμο και στον θύμο αδέν, ενώ δεν εμφανίζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στη μήτρα. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί διαφορές στην τοπική έκφραση των δύο υποτύπων (ERα και ERβ) στον εγκέφαλο. Αυτή η διαφορά στην κατανομή των δύο υποτύπων, οδηγεί σε διακριτές βιολογικές λειτουργίες για τους ERs, γεγονός που ενισχύεται από τους διαφορετικούς φαινοτύπους που παρατηρούνται σε knock-out ποντίκια για τον κάθε έναν από τους δύο ERs ξεχωριστά. Πιο ειδικά, σε knock-out ποντίκια για τον ERα, τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά ήταν στείρα, ενώ στα knock-out ποντίκια για τον ERβ, η γονιμότητα των θηλυκών ήταν σχετικά μειωμένη, ενώ των αρσενικών φυσιολογική. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν έναν πιο σημαντικό ρόλο του ERα στην ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος σε σχέση με τον ERβ. (M. Bottner et al, 2014)

Επίσης οι δύο υποδοχείς ERα και ERβ μπορεί να αναγνωρίζουν ίδιες αλληλουχίες DNA, αλλά οι στόχοι τους δεν είναι πάντα ίδιοι, όπως έχει αποδειχθεί από πλήθος πειραμάτων, γεγονός που βοηθά στην κατανόηση των διαφορών που παρατηρούνται στις δράσεις τους όσον αφορά την εξειδίκευση ιστού. Όταν ο ERα και ο ERβ συνυπάρχουν στα κύτταρα ενός ιστού, ο ERβ φαίνεται να ανταγωνίζεται την εξαρτώμενη από τον ERα μεταγραφή και η τελική απόκριση να επηρεάζεται από την αναλογία αυτών των δύο, χωρίς αυτό να είναι απόλυτο, καθώς μπορεί να υπάρξει και συνεργασία των δύο υποδοχέων. (M. Bottner et al, 2014)



Εικόνα 3. Κατανομή των υποδοχέων των οιστρογόνων στους ιστούς του ανθρώπινου σώματος. (Κ. Α. Burns et al, 2012)

#### **1.3.4 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Β (ERβ)**

Η ισομορφή αυτή του υποδοχέα των οιστρογόνων, ανακαλύφθηκε το 1996 και έκτοτε προξενεί μεγάλο ενδιαφέρον για τους ρόλους και τη δράση του. (B. Deroo and A. Buensuceso, 2010) Ο ERβ κωδικοποιείται από το γονίδιο ESR2, το οποίο εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 14q23.2. (M. Beato et al. 2000) Ο υποδοχέας παράγεται από 8 εξόνια, ενώ έχουν βρεθεί αρκετές ισομορφές λόγω εναλλακτικού ματίσματος που ενδέχεται να διαφέρουν σε κάποια από τα εξώνια και κατ' επέκταση σε κάποιες λειτουργικές περιοχές. (N. Heldring et al., 2007) Η δομή των υποδοχέων οιστρογόνων και κατ' επέκταση του ERβ έχει περιγραφεί σε προηγούμενη ενότητα, για το λόγο αυτό δεν θα επαναληφθεί στην ενότητα αυτή, αλλά θα αναφερθούν τρεις βασικές διαφορές του με τον ERα.

Σύμφωνα με την πρώτη διαφορά ο ERβ φαίνεται να εμφανίζει μειωμένη λειτουργικότητα στην επικράτεια AF-1, σε σχέση με τον ERα, γεγονός που σημαίνει ότι βασίζεται περισσότερο στην επικράτεια AF-2 για τη μεταγραφική του δραστηριότητα και συνεπώς δεν μπορεί να συμμετέχει πλήρως σε καθένα από τα τέσσερα μονοπάτια της οιστρογονικής δράσης που περιγράφονται στην επόμενη ενότητα. Η δεύτερη διαφορά αφορά την συγγένεια για τα EREs. Παρόλο που ο ERα και ο ERβ έχουν υψηλή ομολογία στην επικράτεια DBD, ο ERβ εμφανίζει μικρότερη συγγένεια για τα EREs. Τέλος η τρίτη διαφορά εντοπίζεται στην επικράτεια LBD. Η κοιλότητα σύνδεσης του προσδέτη είναι σημαντικά μικρότερη στον ERβ σε σχέση με του ERα γεγονός που ίσως να εξηγεί την επιλεκτική συγγένεια που εμφανίζουν οι δύο υποδοχείς για τους προσδέτες τους. (B. Deroo and A. Buensuceso, 2010)

Ο ERβ έχει παρόμοιο μηχανισμό δράσης με τον ERα. Ωστόσο, ο ERβ έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, (cross talk), επιδρώντας έτσι στη μεταγραφή διάφορων γονιδίων. Ένα χαρακτηριστικό

παράδειγμα τέτοιας αλληλεπίδρασης, είναι η επίδραση του ERβ στη σηματοδότηση του NFκ-B. Ο ERβ ασκεί αρνητική επίδραση ως προς τη μεταγραφική ενεργότητα του NFκ-B, αποτρέποντας τη δράση του. Η αρνητική αυτή επιρροή του ERβ είναι προσδετοεξαρτώμενη. Η σχέση μεταξύ του ERβ και του NFκ-B, είναι αμφίπλευρη, καθώς έχει αποδειχθεί, πως και ο NFκ-B μπορεί να αποτρέψει ή να περιορίσει τη δράση του ERβ. (B. Deroo and A. Buensuceso, 2010)

Μέσα στο κύτταρο, ο ERβ όπως και ο ERα, εντοπίζεται στην πυρηνική του μορφή, αλλά και στη μεμβρανική. Ωστόσο, έρευνες με πλήθος διαφορετικών τεχνικών δείχνουν ότι ο ERβ εντοπίζεται και στα μιτοχόνδρια πολλών διαφορετικών κυτταρικών σειρών, ανεξάρτητα από το στάδιο διαφοροποίησής τους, λόγω μετατόπισης του πυρηνικού ή μεμβρανικού υποδοχέα στα μιτοχόνδρια. (J.-Q. Chen et al, 2009) Έκτοτε, ακολούθησαν πολλές μελέτες για τον έλεγχο της μιτοχονδριακής επίδρασης του ERβ.

#### **1.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERs**

Σύμφωνα με πλήθος επιστημονικών δημοσιεύσεων φαίνεται να υπάρχουν διακριτοί μηχανισμοί δράσης μέσω των οποίων τα οιστρογόνα και οι υποδοχείς τους ρυθμίζουν τις διάφορες βιολογικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται. Οι μηχανισμοί αυτοί χωρίζονται σε τέσσερις ανάλογα με τους τρόπους δράσης των υποδοχέων οιστρογόνων. Ο πρώτος μηχανισμός είναι ο κλασσικός μηχανισμός δράσης του υποδοχέα εξαρτώμενου από τον προσδέτη. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των υποδοχέων οιστρογόνων ανεξάρτητα από την παρουσία του προσδέτη. Ο τρίτος μηχανισμός αφορά την γενωμική δράση των ERs ανεξάρτητα από την παρουσία EREs στον υποκινητή των γονιδίων και ο τέταρτος μηχανισμός περιγράφει τη μη γενωμική δράση των οιστρογόνων.

##### **1.4.1 ΠΡΟΣΔΕΤΟΕΞΑΡΤΟΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ERs**

Οι ERs βρίσκονται σε ανενεργή μορφή απουσία του κατάλληλου προσδέτη (ορμόνη), λόγω του ότι αλληλεπιδρούν με την Hsp90 η οποία παρεμποδίζει την αποικοδόμηση του υποδοχέα και συντελεί στη σωστή διαμόρφωση του υποδοχέα. Παρουσία του προσδέτη, οι ERs, ενεργοποιούνται καθώς φωσφορυλιώνονται, διμερίζονται και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες αλληλεπιδρώντας με τα EREs. Η αλληλεπίδραση αυτή επιτρέπει την κάμψη του DNA έτσι ώστε να διευκολυνθεί η αλληλεπίδραση του συμπλόκου ER-E<sub>2</sub> με το μηχανισμό της μεταγραφής καθώς και με συνενεργοποιητές ή συγκαταστολείς, ακετυλοτρανσφεράσες και απακετυλάσες των ιστονών. Συνεπώς, η απόκριση του οργάνου-στόχου στη δράση των οιστρογόνων εξαρτάται τόσο από την ποικιλία των ρυθμιστικών παραγόντων που διαθέτει, όσο και από τα χαρακτηριστικά των υποκινητών των γονιδίων που αποκρίνονται στα οιστρογόνα. (N. Heldring et al, 2007)

#### **1.4.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ERs ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΕΤΗ**

Η ενεργοποίηση του ER μπορεί να ρυθμίζεται και από εξωκυτταρικά σήματα απουσία της  $E_2$ . Τέτοια εξωκυτταρικά σήματα προέρχονται κυρίως από πεπτίδια με λειτουργία αυξητικών παραγόντων, τα οποία ενεργοποιούν τους ERs και αυξάνουν την έκφραση γονιδίων που αποτελούν στόχους των ERs. Η ενεργοποίηση επέρχεται από κινάσες οι οποίες συμμετέχουν στον καταρράκτη αντιδράσεων που ενεργοποιούν οι αυξητικοί παράγοντες. Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν τους ERs σε κατάλληλα αμινοξικά κατάλοιπα, με αποτέλεσμα να επιφέρουν τον διμερισμό και την ενεργοποίηση αυτών, οδηγώντας στην πρόσδεση στα EREs χωρίς να χρειάζονται την  $E_2$ . Ωστόσο, ο βιολογικός ρόλος αυτών των διαδικασιών δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί. Είναι πιθανό ότι το μονοπάτι αυτό επιτρέπει την ενεργοποίηση των ERs παρουσία χαμηλών επιπέδων  $E_2$ , όπως συμβαίνει στα αρσενικά, ή ίσως λειτουργεί ως μηχανισμός ενίσχυσης των μονοπατιών των αυξητικών παραγόντων ώστε να επιταχυνθεί η μιτογένεση στους συγκεκριμένους ιστούς που εκφράζονται οι ERs. (J. M. Hall et al, 2001)

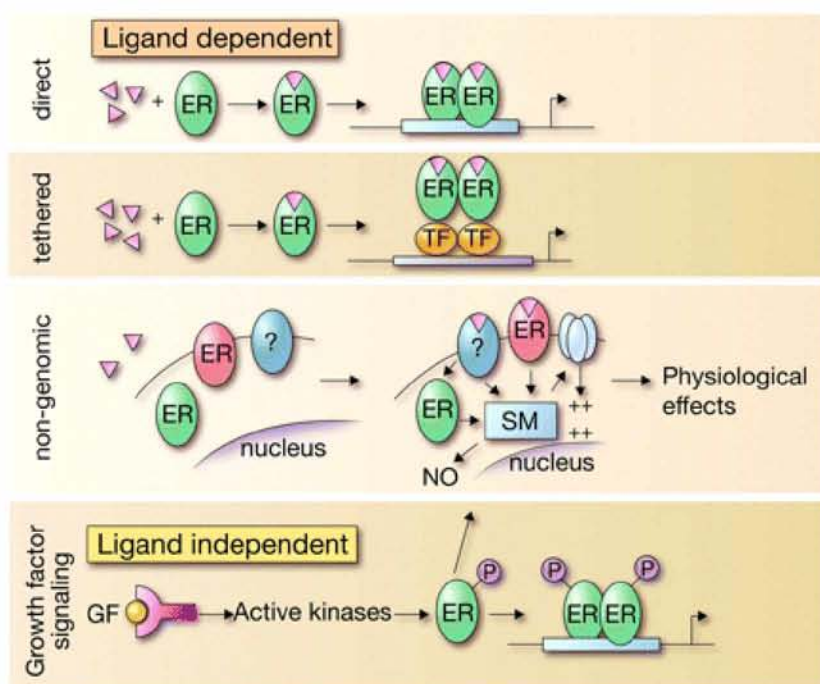
#### **1.4.3 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ERs**

Το σύμπλοκο ER -  $E_2$  μπορεί να επάγει γονίδια τα οποία δεν διαθέτουν EREs στους υποκινητές τους ή άλλες ομοιάζουσες αλληλουχίες, συνεπώς οι ERs αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες, μπορούν να ασκήσουν τη γενωμική τους δράση χωρίς άμεση σύνδεση στο DNA. Ο μηχανισμός αυτός χρησιμοποιείται από πολλά μέλη της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και χαρακτηρίζεται ως διασταυρούμενη επικοινωνία στη μεταγραφή (transcriptional cross talk). Στον μηχανισμό αυτό λοιπόν, η επικράτεια DBD των ERs έχει σημαντικό ρόλο, έτσι ώστε να πραγματοποιηθούν σωστά οι απαραίτητες αλληλεπιδράσεις με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, καθώς επίσης και να στρατολογηθούν επιπλέον συνενεργοποιητές στον υποκινητή του εκάστοτε γονιδίου. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτού του μηχανισμού δράσης είναι η αλληλεπίδραση των ERs με τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1 (Activation Protein 1), ο οποίος είναι ετεροδιμερές αποτελούμενο από πρωτεΐνες της οικογένειας Fos/Jun. Η μεταγραφική ρύθμιση μέσω αυτού του μονοπατιού φαίνεται να απαιτεί τη συμμετοχή και των δύο επικρατειών AF των ERs, οι οποίες συνεισφέρουν στην προσέλκυση περισσότερων συνενεργοποιητών, έτσι ώστε να αλληλεπιδράσουν με το μηχανισμό της μεταγραφής. Λόγω του ότι ο ERβ δεν διαθέτει τόσο λειτουργική επικράτεια AF-1 όσο ο ERα, δεν μπορεί να επέμβει στην ρύθμιση γονιδίων μέσω αυτού του μονοπατιού, γεγονός που διαφοροποιεί περαιτέρω τη βιολογική δράση των ERα και ERβ. (J. M. Hall et al, 2001)

#### **1.4.4 ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ERs**

Μέσω άμεσων επιπτώσεων της δράσης των ERs στα οστά, τους μαστούς, τα αγγεία και στο νευρικό σύστημα, μέσα σε μόλις μερικά λεπτά από την έκθεση σε  $E_2$ , προτείνεται ότι οι ERs ίσως ασκούν και μη γενωμικές επιδράσεις. Αυτές οι άμεσες επιπτώσεις περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση κινασών και φωσφατασών που

συμμετέχουν σε πλήθος αντιδράσεων, έχοντας ποικίλα αποτέλεσμα, όπως την αύξηση της ροής ιόντων διαμέσου των μεμβρανών, την ενεργοποίηση της αδενυλικής κυκλάσης για παραγωγή cAMP. Αυτός ο μηχανισμός δράσης πιθανότατα διεξάγεται μέσω των υποπληθυσμών των ERs που εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου, οι οποίοι έχουν την ίδια δομή με τους πυρηνικούς με τη διαφορά ότι βρίσκονται συζευγμένοι με G πρωτεΐνες. Είναι απαραίτητες συνεπώς, περαιτέρω μελέτες για τον πλήρη προσδιορισμό αυτών των υποδοχέων και της μη γενωμικής δράσης τους, καθώς αυτός ο μηχανισμός δράσης και τα μονοπάτια σηματοδότησης που ενεργοποιούνται θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και ως στόχοι φαρμάκων. (J. M. Hall et al, 2001)



Εικόνα 4. Μηχανισμοί δράσης των ERs.

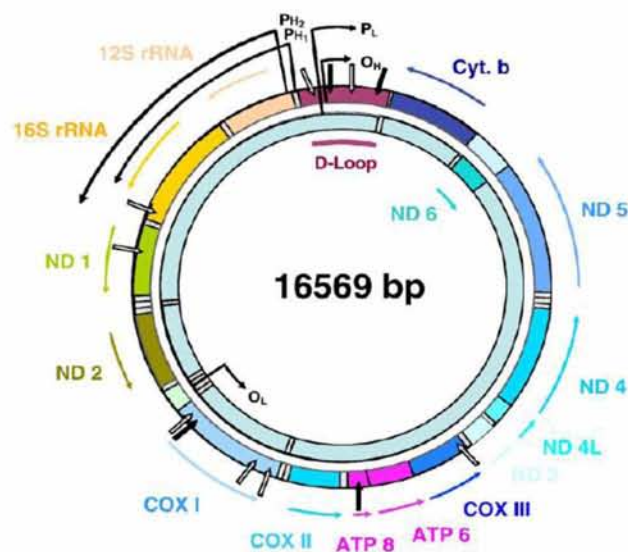
1) Κλασικός τρόπος σηματοδότησης προσδετοεξαρτόμενος: Οι ERs συνδέονται με τον προσδέτη τους, διμερίζονται και ενεργοποιούνται, προσδένονται ειδικά στα EREs, στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων. 2) Μη κλασικός τρόπος σηματοδότησης-ανεξάρτητος από την πρόσδεση στα EREs: Οι υποδοχείς που έχουν ενεργοποιηθεί από τον προσδέτη τους, αλληλεπιδρούν με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, σχηματίζοντας σύμπλοκα που μεσολαβούν στην μεταγραφή γονιδίων, των οποίων οι υποκινητές δεν φέρουν EREs. 3) Μη γενωμική δράση: Οι ERs που εντοπίζονται κοντά ή πάνω στην κυτταρική μεμβράνη μπορούν να προκαλέσουν γρήγορη απόκριση ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια όπως P13K/Akt και PKC/MAPK και μέσω δεύτερων μηνυμάτων (SM) επηρεάζουν κανάλια ιόντων, αυξάνουν τα επίπεδα μονοξειδίου του αζώτου στο κυτταρόπλασμα και οδηγούν σε ταχεία φυσιολογική απόκριση. 4) Γενωμική δράση, διασταυρούμενη επικοινωνία στη μεταγραφή (transcriptional cross talk): Οι ERs διεγείρονται από αυξητικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα ο IGF-1. Ακολουθεί φωσφορυλίωση από κινάσες και ο διμερισμός των υποδοχέων. Στη συνέχεια οι ERs συνδέονται στο DNA και οδηγούν στην έκφραση γονιδίων στόχων. (N. Heldring et al, 2007)



## 1.5 MITOXONΔΡΙΑ ΚΑΙ ERβ

Τα μιτοχόνδρια είναι πολύ σημαντικά κυτταρικά οργανίδια καθώς είναι υπεύθυνα για την επιβίωσή του κυττάρου εφόσον παράγουν περισσότερο από το 90% της απαιτούμενης ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, εμπλέκονται σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή της ουρίας, στη βιοσύνθεση της αίμης, καθώς και στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Όπως έχει δηχθεί τα μιτοχόνδρια αποτελούν συστατικά-κλειδιά στην απόκριση του κυττάρου σε καταστάσεις στρες καθώς κατέχουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, στην κυτταρική διαφοροποίηση και τη γήρανση. (A. M. Psarra, C. Sekeris, 2008)

Κάθε μιτοχόνδριο φέρει πολλαπλά αντίγραφα ενός κυκλικού δίκλωνου μορίου DNA χωρίς ιντρόνια. Στον άνθρωπο, το κυκλικό αυτό DNA έχει μέγεθος 16.6 kb και φέρει 37 γονίδια που κωδικοποιούν για περίπου 13 πρωτεΐνες από τις 3000 που εντοπίζονται συνολικά στα μιτοχόνδρια. Από τα 37 αυτά γονίδια, τα 13 κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες της αναπνευστικής αλυσίδας, ενώ τα υπόλοιπα κωδικοποιούν για δύο rRNAs και 22 tRNAs που χρειάζονται για τη σύνθεση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών. (J.-Q. Chen et al, 2009) Οι δύο αλυσίδες του DNA έχουν μια ασύμμετρη κατανομή των πουρινών και των πυριμιδινών, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται βαριές και ελαφριές αλυσίδες. Η βαριά αλυσίδα μεταγράφεται από δύο γειτονικούς υποκινητές που εντοπίζονται στην περιοχή ελέγχου, όπου περιλαμβάνει και μια εκτοπισμένη θηλιά (D-loop), ενώ η ελαφριά αλυσίδα μεταγράφεται από έναν κυρίαρχο υποκινητή. (A.-M. G. Psarra, C. E. Sekeris, 2008) Στο D-loop έχουν βρεθεί 4 θέσεις που θεωρούνται EREs στο μιτοχόνδριο (mtEREs) και όπως έχει δηχθεί από μελέτες, στις θέσεις αυτές προσδένονται ERs και άλλες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. (J.-Q. Chen et al, 2009)



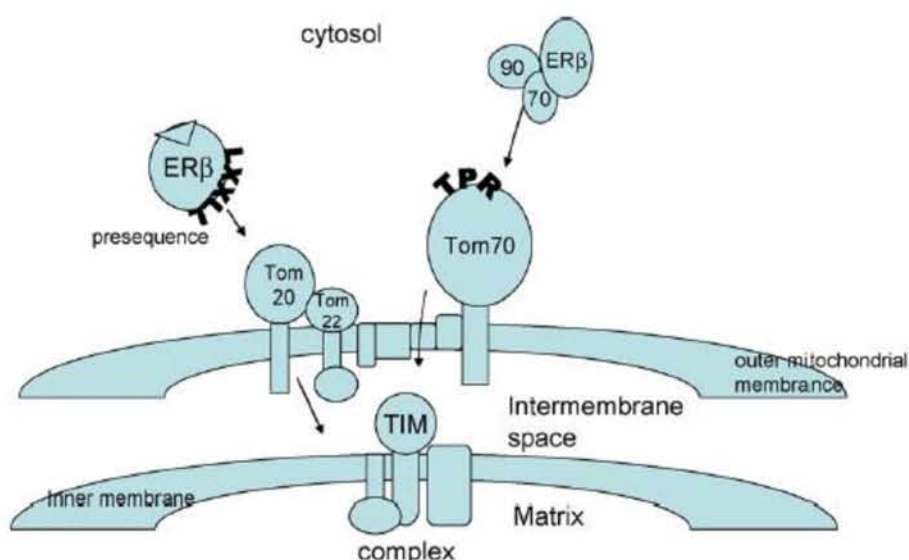
Εικόνα 5. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών έχει μήκος 16.6 kb και κωδικοποιεί για ένα μόνο μέρος από τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την πλήρη λειτουργικότητά του, γι' αυτό και βρίσκεται σε συνεχή επικοινωνία με τον πυρήνα. Οι δύο αλυσίδες του DNA έχουν

μια ασύμμετρη κατανομή των πουρινών και των πυριμιδινών, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται βαριές και ελαφριές αλυσίδες. Η βαριά αλυσίδα μεταγράφεται από δύο γειτονικούς υποκινητές (PH1 & PH2) που εντοπίζονται στην περιοχή ελέγχου που περιλαμβάνει και μια εκτοπισμένη θηλιά (D-loop), ενώ η ελαφριά αλυσίδα μεταγράφεται από έναν κυρίαρχο υποκινητή (PL). 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 mRNA και tRNAs. Αντίθετα, η μεταγραφή από τον PH1 υποκινητή δημιουργεί ένα μικρό σε μήκος μετάγραφο που κωδικοποιεί δύο rRNAs. Τα mRNA κωδικοποιούν τρεις υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης (I, II, III, COX I, COX II, COX III), επτά από την ρεδοκτάση NADH του συνενζύμου Q (ND 1-6 και ND4L), δύο από τη συνθάση του ATP (ATP 6,8), δύο ριβοσωμικά RNAs (12S και 16S rRNA) και 22 tRNAs. (J.-Q. Chen et al, 2009)

Τα μιτοχόνδρια μπορούν να συνθέσουν ένα μικρό μέρος των συστατικών που χρειάζονται για τις λειτουργίες τους. Για το λόγο αυτό επικοινωνούν με το υπόλοιπο κύτταρο και εισάγουν πρωτεΐνες που κυρίως κωδικοποιούνται από τον πυρήνα. Η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών, όπως είναι μερικοί 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 αλληλουχιών οδηγών που εντοπίζονται στα 20-50 αμινοξικά κατάλοιπα στο αμινοτελικό άκρο. Άλλες πρωτεΐνες, είναι και οι πρωτεΐνες μεταφορείς που περιέχουν εσωτερικές αλληλουχίες οδηγούς. Επίσης έχουν βρεθεί πρωτεΐνες που δεν περιέχουν αλληλουχίες σύνδεσης με υποδοχείς του μιτοχονδρίου και αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς Hsps (chaperons), μέσω ειδικών αλληλουχιών. (J. W. Simpkins et al. 2008)

Οι πιο γνωστές πυρηνικές πρωτεΐνες εισέρχονται στα μιτοχόνδρια μέσω του συμπλόκου της μετατοπάσης (translocase) (TOM) της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το σύμπλοκο TOM αναγνωρίζει αλληλουχίες με trans και cis περιοχές σύνδεσης (αλληλουχίες οδηγών) και μεταφέρει τις πρωτεΐνες μέσα στο μιτοχόνδριο. Αποτελείται από τουλάχιστον 7 υπομονάδες που περιλαμβάνουν υποδοχείς εισόδου Tom20, Tom70, Tom22 και πρωτεΐνες κανάλια Tom40, Tom6-7, με τους δύο πρώτους υποδοχείς να αποτελούν τους κυρίαρχους υποδοχείς του συμπλόκου και τα υπόλοιπα μέλη να είναι συστατικά του πόρου της μετατόπισης. Η Tom20 συνδέεται με προ-αλληλουχίες (presequences) προπρωτεϊνών (preproteins), ενώ η Tom70 συνδέεται σε εσωτερικές αλληλουχίες μεμβρανικών πρωτεϊνών. Αφού διασχίσουν την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, οι πρωτεΐνες είτε υφίστανται διαλογή και κατάλληλη αναδίπλωση είτε μεταφέρονται στο σύμπλοκο της τρανσλοκάσης της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (σύμπλοκο TIM) για να εισαχθούν στη μήτρα. Οι Tom20 και Tom22 αναγνωρίζουν ένα μοτίβο φΧΧφφ, όπου φ είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ και κατά προτίμηση η λευκίνη (L) και Χ ένα οποιοδήποτε αμινοξύ, ενώ 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-trycpeptide repeats, TPR). Συνεπώς, σύμφωνα με τα παραπάνω ο ERβ εισέρχεται στα μιτοχόνδρια μέσω τριών εναλλακτικών οδών. Στην πρώτη οδό, ο ERβ που βρίσκεται στην ανενεργή του μορφή χωρίς προσδέτη αλληλεπιδρά με 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 που βρίσκεται στην περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (αμινοτελικό άκρο). Τέλος στην τρίτη οδό, όταν ο ERβ βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση συνδεδεμένος με την Hsp70, αλληλεπιδρά με την Tom70 μέσω μιας εσωτερικής ακολουθίας. Αφού περάσει λοιπόν, ο ERβ διαμέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, κατευθύνεται στο σύμπλοκο TIM μέσω του οποίου εισέρχεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου (J. W. Simpkins et al. 2008).



Εικόνα 6. Η διαδικασία εισόδου του ERβ στο μιτοχόνδριο μέσω του συμπλόκου TOM. (James W. Simpkins et al. 2008)

### 1.5.1 ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ERβ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Ο εντοπισμός του ERβ στα μιτοχόνδρια του δίνει την ικανότητα να ρυθμίζει είτε άμεσα την έκφραση πολλών διαφορετικών ομάδων μιτοχονδριακών γονιδίων, είτε έμμεσα την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούνται στον πυρήνα και έχουν στόχο τα μιτοχόνδρια. Ο ERβ μπορεί να αλληλεπιδρά με πυρηνικούς στόχους όπως ο πυρηνικός αναπνευστικός παράγοντας-1 (nuclear respiratory factor-1, NRF1) και ο μιτοχονδριακός παράγοντας της μεταγραφής A (mitochondrial transcription factor A, TFAM-A), που ενεργοποιούν τη μιτοχονδριακή βιογένεση και να ελέγχει με αυτόν τον τρόπο την βιογένεση των μιτοχονδρίων. (T.-L. Liao et al. 2015)

Τα περισσότερα γονίδια που ρυθμίζονται από τον ERβ είναι μιτοχονδριακές δομικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση καθώς έχει βρεθεί ότι τα οιστρογόνα αυξάνουν την έκφραση των υπομονάδων I, II και III της οξειδάσης του κυτοχρώματος C, που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).

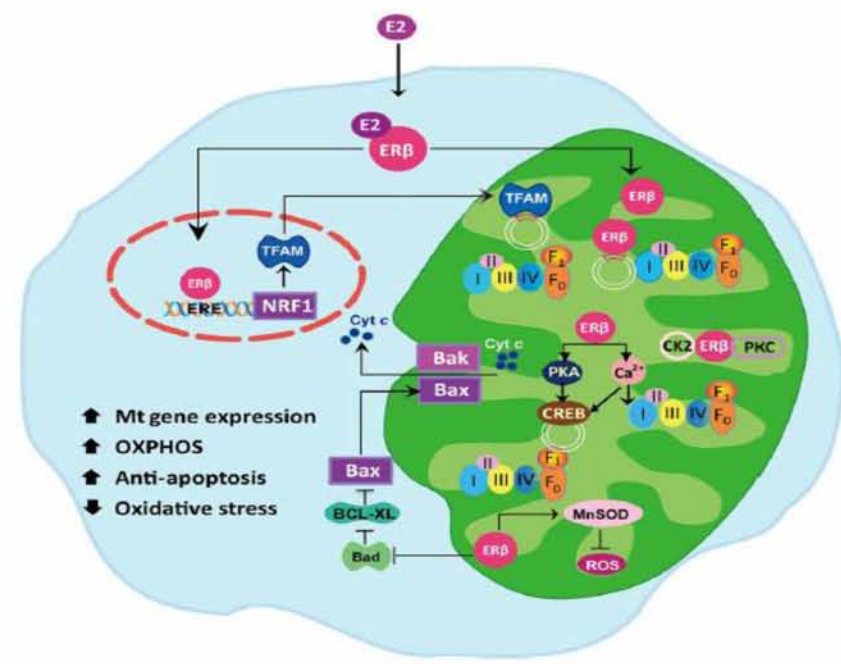
Επιπλέον, ο ERβ μπορεί να αυξήσει την αναπνευστική ικανότητα, να αυξήσει την αντιοξειδωτική δραστηριότητα καθώς και να αναστείλει την απόπτωση (A. M. Psarra, C. Sekeris, 2008, T.-L. Liao et al. 2015)

Ο mtERβ συνδέεται στα στοιχεία απόκρισης οιστρογόνων (estrogen response elements, EREs), τα οποία όπως έχει αναφερθεί εντοπίζονται στην περιοχή του D-loop του mtDNA, ή 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 mtDNA. Οι αλληλεπιδράσεις του ERβ και του mtDNA υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα μπορούν να τροποποιήσουν τη μεταγραφή των μιτοχονδριακών γονιδίων καθώς και τα κυτταρικά ενεργειακά επίπεδα. (T.-L. Liao et al. 2015)

Σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες ο ERβ φαίνεται να εμπλέκεται στην επιβίωση του κυττάρου και σε αντι-αποπτωτικές διαδικασίες, καθώς μπορεί να αλληλεπιδράσει με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bad, οπότε αυτή δεν μπορεί έτσι να εμποδίσει τη δράση της αντι-αποπτωτικής Bcl-2. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της Bax και άρα την παρεμπόδιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα. (T.-L. Liao et al. 2015)

Όσον αφορά στο ρόλο του ERβ στο οξειδωτικό στρες, έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί τη μιτοχονδριακή μαγγανική δισμουτάση του σουπεροξειδίου, MnSOD, η οποία καταλύει τη διάσπαση των ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου. (J. W. Simpkins et al. 2008, C. M. Klinge, 2008).

Τέλος ο ERβ έχει βρεθεί στον εγκέφαλο ποντικού να αλληλεπιδρά με τη μιτοχονδριακή κινάση της καζεΐνης 2 (CK2) καθώς και με την φωσφοκινάση C (PKC), οι οποίες συμβάλλουν στη βιογένεση της μιτοχονδριακής μετατοπάσης (translocase) (TOM) της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και στη ρύθμιση μιτοχονδριακών καναλιών καλίου που είναι ευαίσθητα στο ATP, αντίστοιχα. (T.-L. Liao et al. 2015)



Εικόνα 7. Ο πιθανός ρόλος του mtERβ στη βιοενεργητική, στην μιτοχονδριακή βιογένεση και σε αντι-αποπτωτικά μονοπάτια (T.-L. Liao et al. 2015).

## **1.6. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ**

Ο ERα φαίνεται να είναι ο κύριος υποδοχέας που εμπλέκεται στους σχετιζόμενους με τα οιστρογόνα καρκίνους, λόγω του γεγονότος ότι τα επίπεδά του σχετίζονται με την πρόοδο των ασθενών που υπόκεινται σε θεραπεία με ανταγωνιστές των οιστρογόνων. Από την άλλη ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμπλοκή ή μη του ERβ σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπου μπορεί να έχει επαγωγική ή προστατευτική δράση, ανάλογα με τον ιστό που εντοπίζεται ο καρκίνος. (B. J. Deroo et al. 2006)

Σύμφωνα με έρευνες 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. Επιπλέον, στον καρκίνο του παχέως εντέρου, φαίνεται να εμφανίζεται σε χαμηλότερα επίπεδα κάτι που οδηγεί στην υπόθεση ότι ίσως να έχει προστατευτική δράση στην καρκινογένεση του συγκεκριμένου ιστού, ενώ στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού και του προστάτη φαίνεται να μπορεί να αξιοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης. (B. J. Deroo et al. 2006)

Γενικά, τα αποτελέσματα είναι διφορούμενα και διαφοροποιούνται από ιστό σε ιστό, ενώ είναι πιθανόν ο ERβ να ασκεί την καρκινογενετική του δράση επεμβαίνοντας στη μιτοχονδριακή λειτουργία προκειμένου να επιτευχθεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η επιβίωση. (T.-L. Liao et al. 2015)

## **1.7. ERs ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ**

Οι υποδοχείς οιστρογόνων, φαίνεται να επηρεάζουν τον εγκέφαλο με διάφορους τρόπους. Ωστόσο αυτό που έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, είναι ότι και οι δύο τύποι υποδοχέων (ERα και ERβ) εμφανίζουν νευροπροστατευτική δράση σε νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η νόσος του Alzheimer (AD) και του Parkinson (PD). (J. W. Simpkins et al. 2008)

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. (J. W. Simpkins et al. 2008)

Αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους τα οιστρογόνα δρουν νευροπροστατευτικά δεν είναι ξεκάθαροι, φαίνεται να περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση των κινασών

MAPK/PI3/PKB. Έχει αποδειχτεί ότι οι οιστρογονικοί υποδοχείς, ενεργοποιημένοι από την οιστραδιόλη, θέτουν σε λειτουργία το μονοπάτι MAPK/PI3-K/Akt και έτσι προστατεύουν τους νευρώνες του ιππόκαμπου από την γλουταμινεργική υπερ-ενεργοποίηση, ένα φαινόμενο γνωστό ως διεγερόμενη τοξικότητα, το οποίο οδηγεί σε υψηλό φορτίο ασβεστίου εντός των νευρώνων, και εν συνεχεία σε απόπτωση. Επιπλέον, η ενεργοποίηση της Akt από την 17β-οιστραδιόλη σε νευρικά κύτταρα του ιπποκάμπου, οδηγεί σε προστασία από τον κυτταρικό θάνατο που θα επερχόταν από τα β-αμυλοειδή. (J.-Q. Chen et al, 2009)

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά εντός του μιτοχονδρίου ο ERβ (Estrogen receptor β), προκειμένου να επαληθευτούν τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από προηγούμενες εργασίες.

Αναλυτικότερα, μέσω του χαρακτηρισμού των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα ο ERβ θα μπορέσουμε να διευρύνουμε τις γνώσεις μας σχετικά με τους πιθανούς ρόλους του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια και την ρύθμιση των βιοχημικών μονοπατιών όπου εμπλέκεται ο ERβ στο μιτοχονδριακό περιβάλλον.

Για την μελέτη αυτή έγινε απομόνωση μιτοχονδριακού κλάσματος από N<sub>2</sub>A κυτταρικές νευρικές σειρές που υπερεκφράζουν σταθερά την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) με μιτοχονδριακή στόχευση και την βήτα μορφή του υποδοχέα οιστρογόνων με τη μορφή χιμαιρικής πρωτεΐνης με GFP με μιτοχονδριακή στόχευση. Με χρήση κατάλληλων αντισωμάτων έναντι είτε του ERβ είτε της GFP πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση του ERβ και των συνκατακρημνισθέντων με αυτόν πρωτεϊνών από το μιτοχονδριακό περιβάλλον.

Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες που κατακρημνίστηκαν στάλθηκαν για να χαρακτηριστούν με τη μέθοδο της φασματομετρίας μάζας, σε συνεργασία με την κα. Σαμιωτάκη Μαρτίνα στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών 'Αλεξάντερ Φλέμινγκ'. Θα ακολουθήσει επεξεργασία των αποτελεσμάτων και ομαδοποίηση των αλληλεπιδρώντων μορίων ανάλογα με τη βιοχημική οδό στην οποία αυτά εμπλέκονται με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής μόλις λάβουμε τα αποτελέσματα όπως έχει γίνει αι στις προηγούμενες δύο επαναλήψεις του πειράματος. Η μελέτη αυτή αναμένεται να επαληθεύσει τα προηγούμενα αποτελέσματα βάση των οποίων ο ERβ αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με μόρια που εμπλέκονται σε βιοχημικές οδούς όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση, ο μεταβολισμός της γλυκόζης, ο κύκλος του κιτρικού οξέος, η βιοσύνθεση στεροειδών και μηχανισμοί εισαγωγής στο μιτοχόνδριο.

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

##### ΕΝΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

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

##### ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

- Ζυγός (Kern EN)
- Ζυγός (Kern 440-47N)
- Ομογενοποιητής Potter Erlejhem (Wise Strir HS-30E)
- Φωτόμετρο Spectronic 20 GENESYS TM
- Φυγόκεντρος Helme Z36HK
- Φυγόκεντρος Eppendorf
- Πιπέτες – Air displacement pipettes όγκων 0,1-2 μl, 2-20 μl, 20-200 μl, 100-1.000 μl
- Heatblock (Kisker)
- Συσκευή ηλεκτροφόρισης: Biorad mini-PROTEAN tetra cell
- Sonicator: helscher Ultrasound Technologies, model UP400S
- Vortex (Biovortex V1)
- Quick spin (NIPPON Genetics EUROPE GmbH)
- Θερμοκυκλοποιητής (eppendorf mastercycler gradient)
- Μηχάνημα Real Time PCR (Stratagene Mx 3005p)

#### 3.2 ΥΛΙΚΑ

##### ΧΗΜΙΚΑ

##### ΣΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

- Αιθανόλη (Sigma)
- Βιοαιθανόλη (Kalochen)
- Πενικιλίνη-Στρεπταμυκίνη (Gibco)
- DMSO (Sigma)
- FBS (Gibco)
- L-glutamin (Gibco)
- Trypsin-EDTA 5% 10× (Gibco)

### ΓΙΑ PCR

- Αγαρόζη (Nippon Genetics)
- Γλυκερόλη (Punreac)
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών για DNA (Generuler 1kb, Invitrogen)
- Βρομοφαινόλη blue (Fluka)
- Kit απομόνωσης DNA (Invitrogen)
- Kit Taq Polymerase (Invitrogen): Taq polymerase, PCR Buffer 10×, dNTPs, 50mM MgCl<sub>2</sub>
- ddH<sub>2</sub>O water for injection (Bioser)
- Midori green (Nippon Genetics)
- Xylene cyanol (Fluka)

### ΓΙΑ ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

- Μαννιτόλη (Sigma)
- Σουκρόζη (Sigma)
- DTT (Serva)
- EDTA (Sigma)
- Hepes (Serva)
- KCl (EMSURE)
- KOH (Sigma)
- MgCl<sub>2</sub> (Sigma)
- PBS 10× (Gibco)
- PMSF (AppliChem)
- Tris pH=7.5 (Serva)

### ΓΙΑ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

- Διάλυμα Bradford 5× (Bio-Rad)
- Γλυκερόλη (AppliChem)
- Κυανό της βρωμοφαινόλης (Research Organics)
- Μεθανόλη (Sigma)
- Οξικό οξύ (Scharlau)
- Φορμαλίνη (Punreac)
- AgNO<sub>3</sub> (Fluka)
- Beads
- DTT (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- NaCl (Sigma)
- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Sigma)
- NP-40 (Fluka)
- Na-deoxycholate (Sigma)
- Protease Inhibitors (Roche)



- PMSF (AppliChem)
- Tris (Serva)

### ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

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

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

### ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- **DTT 1M**

Για 10 ml, διαλύονται 1,54 gr DTT 1M σε ddH<sub>2</sub>O. Ακολουθεί ανάδευση με μαγνητάκι, aliquots του 1 ml και φύλαξη στους - 20°C.

- **PMSF 200 mM**

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

- **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.

- **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 12 N και συμπληρώνεται ο όγκος με dH<sub>2</sub>O. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **APS 10 %:**

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

- **Sample Buffer 2x:**

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

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

Για διάλυμα 1 l, ζυγίζονται 30.3 gr Tris base και 144.00 gr γλυκίνης τα οποία διαλύονται ddH<sub>2</sub>O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου

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

Αποτελείται από Running Buffer 10× και dH<sub>2</sub>O σε αναλογία όγκων 1:9. Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε αναλογία 0.1 %. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

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

Για ποσότητα 1l, ζυγίζονται: 2 gKCl, 80 gNaCl, 17,8 gNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,4 gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- **Loading Buffer:**

Για 10 ml, ζυγίζουμε 0,0125 gr bromophenol blue και 0,0125 gr xylene cyanol, ενώ προσθέτουμε 1 ml γλυκερόλη 100% και μέχρι τα 10 ml dH<sub>2</sub>O. Αποθηκεύεται στους 4 °C.

- **TAE 50×:**

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

- **BufferA:**

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

- **Buffer B:**

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

- **RIPA Buffer:**

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

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

Fixing Solution:

Αποτελείται από 50% μεθανόλη, 5% οξικό οξύ και 45% ddH<sub>2</sub>O

Washing Solution:

Αποτελείται από 50% μεθανόλη και 50% ddH<sub>2</sub>O

Sensitizing Solution:

Αποτελείται από ddH<sub>2</sub>O με περιεκτικότητα σε Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,02%

Staining Solution:

Αποτελείται από ddH<sub>2</sub>O με περιεκτικότητα σε AgNO<sub>3</sub>, 0,1 %. Χρησιμοποιείται κρύο (4 °C)

#### Developing Solution:

Αποτελείται από ddH<sub>2</sub>O με περιεκτικότητα σε φορμαλίνη και Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,04% και 2% αντίστοιχα

#### Stop Solution:

Αποτελείται από 5% οξικό οξύ

#### Storing Solution:

Αποτελείται από 1% οξικό οξύ

### ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

#### ΓΙΑ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ

- Normal goat-IgG: control
- Normal goat-IgG: για ERβ
- Αντίσωμα έναντι GFP από επίμου (Roche)
- Αντίσωμα έναντι ERβ από επίμου, MCA (SEROTEC)

### ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι τύπου Falcon των 15 ml και των 50 ml (Sarstedt)
- Φλάσκες για καλλιέργεια κυττάρων, επιφάνειας 25 cm<sup>2</sup> και 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt)
- Τρυβλία καλλιέργειας 150×20 mm
- Σιφώνια Serological Pipette των 2, 5, 10 & 25 ml (Sarstedt)
- Ρύγχοι – Tips όγκων 0,1-2 μl, 2-20 μl, 20-200 μl, 100-1.000 μl
- Cryovials για φύλαξη των κυττάρων σε βαθειά κατάψυξη (Sarstedt)
- Eppendorfs των 0,2 ml, των 1,5 ml & των 2 ml
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur (Kimble)

### 3.3 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν νευρικές κυτταρικές σειρές N<sub>2</sub>A που υπερεκφράζουν σταθερά GFP με αλληλουχία-οδηγό για είσοδο στο μιτοχόνδριο (mtGFP), αποικία 16 και 19 και N<sub>2</sub>A που υπερεκφράζουν σταθερά τον ERβ με αλληλουχία-οδηγό για είσοδο στο μιτοχόνδριο σε χιμαιρική πρωτεΐνη με το GFP (mtGFPERβ), αποικία 34 και 38. Οι κυτταρικές σειρές κατασκευάστηκαν από τον συνάδελφο κ. Βύρωνα Γοργογιέτα στα πλαίσια της διδακτορικής του διατριβής.

Τα N<sub>2</sub>A είναι νευροβλαστωματικά κύτταρα προερχόμενα από τον οργανισμό *Mus musculus*, κοινώς το ποντίκι. Σε ότι αφορά τις συνθήκες καλλιέργειάς τους,

αναπτύσσονται παρουσία πλήρους θρεπτικού μέσου DMEM 1g/l Glucose και εμφανίζουν αργό ρυθμό ανάπτυξης. Επίσης, φέρουν τις εξής ιδιαιτερότητες:

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

2) Αποκολλώνται πολύ εύκολα από την επιφάνεια καλλιέργειάς τους και για το λόγο αυτό απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά της μεταφορά τους ώστε να μην αναταράσσεται πολύ η επιφάνειά τους.

### **3.4 ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

#### **ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

##### **ΞΕΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

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

Σημαντικό πριν την έναρξη της διαδικασίας είναι να ετοιμάσουμε όλα όσα θα χρειαστούμε προκειμένου μόλις ξεπαγώσει το φιαλίδιο (cryovial) να τοποθετηθούν τα κύτταρα στο θρεπτικό και να μείνουν όσο λιγότερο γίνεται σε επαφή με το τοξικό για αυτά DMS, το οποίο υπήρχε κατά τη φύλαξή τους. Ιδανικό είναι οι κινήσεις να εφαρμοστούν όσο πιο γρήγορα γίνεται, ώστε να εξασφαλιστεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων θα επιβιώσει από αυτή τη στρεσογόνο για αυτά διεργασία.

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 ενώ 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 cryovial 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.

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

Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, 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 πιπέτα των 5 ή των 10ml 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, η φλάσκα τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο, σε συνθήκες 37°C και 5.0% CO<sub>2</sub>, συνθήκες που ευνοούν αρχικά την προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια της φλάσκας και έπειτα την αύξηση και ανάπτυξή τους.

#### ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η θρυψίνη επιδρά πρωτεολύοντας τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων τόσο στην επιφάνεια της φλάσκας όσο και σε γειτονικά τους κύτταρα. Συνεπώς η διαδικασία της θρυψινοποίησης είναι απαραίτητη σε περιπτώσεις κορεσμού (κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας κατά 80-90%), σε περιπτώσεις πολλών και μεγάλων συσσωματωμάτων (μη επιθυμητό) αλλά και πριν από τους περισσότερους χειρισμούς που απαιτείται η χρήση ή η μεταφορά κυττάρων. Η κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα πέρασμα (passage) τον αριθμό του οποίου πρέπει απαραίτητως να σημειώνουμε επάνω στη φλάσκα μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας.

Αρχικά πραγματοποιείται ξεπάγωμα της θρυψίνης και του θρεπτικού υλικού στο υδατόλουτρο στους 37°C. Αφαιρείται με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό που υπάρχει στη φλάσκα και προστίθεται θρυψίνη. Η ποσότητα θρυψίνης που εφαρμόζεται ποικίλει ανάλογα με την κυτταρική σειρά που χειριζόμαστε, αλλά συνήθως προσθέτουμε 1 ml σε φλάσκες T-25 και 2 ml σε φλάσκες T-75. Η φλάσκα κλείνει και με ήπιες κινήσεις, επιδιώκουμε όλα τα κύτταρα να διαβρέχονται από θρυψίνη και την παρατηρούμε 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.

Στη συνέχεια, τοποθετείται η φλάσκα σε όρθια θέση στο hood και για να σταματήσουμε τη δράση της θρυψινοποίησης, προσθέτουμε στη φλάσκα θρεπτικό υλικό, ο όγκος του οποίου είναι τετραπλάσιος από τον όγκο της θρυψίνης που χρησιμοποιήσαμε αρχικά. Έπειτα, το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε Falcon των 15 ml και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 1000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου 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 (μέχρι τα 5 ml για T-25 και μέχρι τα 15ml για T-75).

### ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το πάγωμα των κυττάρων είναι σημαντικό ώστε να αποθηκεύουμε κύτταρα για μελλοντικές μελέτες. Η κρυοσυντήρηση εξασφαλίζει την ύπαρξη κυτταρικού αποθέματος ακόμα και σε περίπτωση κάποιας μόλυνσης ή κάποιας ατυχήματος, καθώς επιτρέπει την επανάκτηση καθαρής κυτταρικής σειράς και τη αποφυγή αγοράς νέας η οποία έχει μεγάλο κόστος. Αξίζει επίσης να σημειωθεί, ότι το πάγωμα είναι προτιμότερο να συμβαίνει όταν τα κύτταρα βρίσκονται στο μέγιστο ρυθμό ανάπτυξής τους ή όταν έχουν καλύψει σχεδόν το 100% της επιφάνειας της φλάσκας καλλιέργειας.

Τα κύτταρα κατά την κρυοσυντήρηση φυλάσσονται σε ειδικά φιαλίδια (cryovial) με χωρητικότητα 1 ml. Το διάλυμα του παγώματος περιέχει αντί για πλήρες θρεπτικό μέσο, FBS που αποτελεί το 90% του συνολικού όγκου και DMSO, που αποτελεί το υπόλοιπο 10%. Το DMSO λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας που μειώνει το σημείο πήξης του μέσου και επιτρέπει βραδύτερο ρυθμό ψύξης, μειώνοντας σημαντικά τον κίνδυνο σχηματισμού κρυστάλλων πάγου, που μπορεί να βλάψουν τα κύτταρα και να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, είναι ιδιαίτερα τοξικό και δεν είναι επιθυμητή μεγάλη έκθεση των κυττάρων σε αυτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το FBS προστίθεται ώστε να εξασφαλιστεί η βιωσιμότητα και η ανάκτηση του μεγαλύτερου ποσοστού των κυττάρων μετά την απόψυξη.

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, κάθε cryovial περιέχει 100μl DMSO και 900 μl FBS με τα επαναδιαλυτοποιημένα κύτταρα.

Η διαδικασία του παγώματος ξεκινά τη θρυψινοποίηση, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην προηγούμενη υποενότητα. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης ετοιμάζονται δύο cryovials στα οποία σημειώνονται όλα τα απαραίτητα στοιχεία (κυτταρική σειρά, ημερομηνία και passage). Συνήθως, παγώνουμε δύο-δύο φιαλίδια αλλά αυτό εξαρτάται κι από το συνολικό αριθμό των κυττάρων που έχουμε, από το αν θα κρατήσουμε κύτταρα για ανακαλλιέργεια και τι ποσότητα θα ανακαλλιεργήσουμε. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο

αναροφάται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 2 ml FBS. Θέλουμε 0,9 ml FBS για κάθε cryovial. Τα εναπομείναντα 0,2 ml επιστρέφονται στη φλάσκα για ανακαλλιέργεια, όπου και συμπληρώνουμε με τον αντίστοιχο όγκο θρεπτικού ανάλογα με το μέγεθος της φλάσκας. Σημειώνουμε passage και η φλάσκα επιστρέφεται στον επωαστικό κλίβανο. Το επόμενο βήμα του παγώματος πρέπει να γίνει πολύ γρήγορα και προσεκτικά, λόγω της κυτταροτοξικότητας του DMSO. Προσθέτουμε 0,1 ml DMSO σε κάθε cryovial, χωρίς καθυστερήσεις. Άμεσα και με συνεχόμενη ανάδευση, τα cryovials αποθηκεύονται στην κατάψυξη.

#### ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ PLATES 150x20 mm

Προκειμένου να γίνει συλλογή μιας ικανοποιητικής ποσότητας μιτοχονδριακού κλάσματος, καλλιεργήσαμε τα κύτταρα σε τρυβλία καλλιέργειας των 150x20 mm.

Κάθε φορά που τα κύτταρα κάλυπταν το 70-75 % της επιφάνειας της φλάσκας T-75 πραγματοποιούσαμε θρυψινοποίηση με 2 ml θρυψίνης και σταματούσαμε την διαδικασία με 8 ml θρεπτικό DMEM 1g/mol Glucose. Στη συνέχεια, επίσης μέσα στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής μεταφέραμε σε δύο plates από 4 ml στο καθένα και επιστέψαμε τα 2 ml στη φλάσκα για ανακαλλιέργεια. Συμπληρώναμε με θρεπτικό τα plates έως τελικό όγκο τα 20 ml και την φλάσκα έως τελικό όγκο τα 15 ml. Ακολουθούσε οπτική παρατήρηση τόσο της φλάσκας όσο και των plates στο μικροσκόπιο και εν συνεχεία η μεταφορά τους στον επωαστήρα για την προσκόλληση των κυττάρων και την ανάπτυξή τους.

#### ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται στη Μοριακή Βιολογία για να ενισχυθεί επιλεκτικά ένα αντίγραφο ενός κομματιού DNA σε αρκετές τάξεις μεγέθους, δημιουργώντας χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA χωρίς της μεσολάβηση ζωντανού κυττάρου. Ο τελικός αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης.

Η PCR βασίζεται στον επαναλαμβανόμενο κύκλο τριών αντιδράσεων που διαφέρουν στη θερμοκρασία και το χρόνο. Κάθε κύκλος αποτελείται από τα εξής στάδια:

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

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

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

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

Συστατικά	Όγκος για αντίδραση 25 $\mu$ l	Τελική συγκέντρωση
10X PCR buffer minus Mg	10 $\mu$ l	1X
10mM dNTP mixture	2 $\mu$ l	0.2 mM each
50mM $MgCl_2$	3 $\mu$ l	1.5 mM
Primer mix (10mM each)	5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ M each
Template DNA	1-20 $\mu$ l	n/a
Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0.2-0.5 $\mu$ l	1.0-2.5 units
Autoclaved distilled water	Το 100 $\mu$ l	n/a

Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις PCR, μια με εκκινητές για ενίσχυση της ακτίνης που είχε το ρόλο του δείκτη ποιότητας και ποσότητας του απομονωμένου DNA και μια με εκκινητές ειδικούς για το γονιδίωμα του μυκοπλάσματος. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Μόριο	Αλληλουχία	Εταιρεία
Μυκόπλασμα	R:CCRTGCACCAAYCTGTCWHHHBBGWWAACCTC	Invitrogen
	F:GAAAGYGTGGGGAGCAAAYAGGATTAGATA	
$\beta$ -ακτίνη	R:CGTTCGTCCGCATGGAGTCCT	Invitrogen
	F:GGAGCAATGATCTTGATCTT	

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

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



Το πρόγραμμα αυτό επαναλαμβάνεται για 30 κύκλους. Μετά το τέλος της αντίδρασης, τα δείγματα επωάζονται για άλλα 10 λεπτά στους 72°C. Τα αποτελέσματα της PCR ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, με περιεκτικότητα σε αγαρόζη 1,5 % και τάση 120 V. Η οπτικοποίηση των προϊόντων της PCR γίνεται με τη χρήση της midori green παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας. Το χημικό αυτό κάνει ακριβώς την ίδια δουλειά με το βρωμιούχο αιθίδιο στην ανίχνευση δίκλωνου DNA, με τη διαφορά ότι είναι πολύ λιγότερο τοξικό κι επικίνδυνο για τον άνθρωπο.

### ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΩΝ

Προκειμένου να συλλέξουμε μια ικανοποιητική ποσότητα μιτοχονδριακού κλάσματος, καλλιεργήσαμε τα κύτταρα σε τρυβλία καλλιέργειας των 150×20 mm. Όλη η διαδικασία της μιτοχονδριακής κλασμάτωσης εκτυλίσσεται στον πάγο κι έχει ως εξής: Μετά την αφαίρεση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας από τα τρυβλία, γίνονται μια με δύο εκπλύσεις με PBS×1 και έπειτα προστίθεται το διάλυμα ομογενοποίησης ή αλλιώς Buffer A. Για κάθε 1 ml του Buffer A που χρησιμοποιούμε, προσθέτουμε και 10 μl Protease Inhibitors, 2 μl DTT 1M και 0,5 μl PMSF 200μM.

Τα κύτταρα συλλέγονται με το διάλυμα αυτό (σε κάθε τρυβλίο αντιστοιχούν 700μl) με τη βοήθεια του κατάλληλου εργαλείου scraper (ράβδο με πλαστική εύκαμπτη επιφάνεια στην άκρη) σύρουμε καθόλη την επιφάνεια του plate ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα και τα συλλέγουμε σε ειδικό φιαλίδιο του Potter Elvehjem ομογενοποιητή, το οποίο βρίσκεται σε πάγο.

Ακολουθεί ομογενοποίηση στα 2000 rpm, όπου εφαρμόζουμε 2 σετ των 10 φορών πάνω-κάτω με μεσοδιάστημα ενός λεπτού. Συλλέγουμε το κυτταρικό εναιώρημα και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στα 2500 rpm, στους 4°C. Με τη φυγοκέντρωση αυτή απομακρύνονται πυρήνες, κυτταρικές μεμβράνες και άσπαστα κύτταρα. Συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στα 12000 rpm, στους 4°C. Τώρα, στο ίζημα βρίσκονται μιτοχόνδρια, λυσοσωμάτα και ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ στο υπερκείμενο έχουν απομείνει χαμηλότερου μοριακού βάρους οργανίδια (Post-Mito). Αφαιρούμε το υπερκείμενο κι επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα στο οποίο βρίσκονται τα μιτοχόνδρια σε Buffer B. Η διαδικασία της φυγοκέντρωσης επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές και τέλος το ίζημα που απομένει αποτελεί το μιτοχονδριακό κλάσμα (MITO) που φυλάσσεται στους -80 °C.

Το υπερκείμενο της δεύτερης φυγοκέντρωσης (12000 rpm) αποτελούσε το μετα-μιτοχονδριακό κλάσμα, το post-mitochondrial (PM) και αποτελούνταν από κυτταρόπλασμα και κυτταρικά οργανίδια. Ενώ ό,τι είχε εναπομείνει στο φιαλίδιο της ομογενοποίησης, αποτελούσε το total extract που περιείχε κυτταρικά οργανίδια, κυτταρόπλασμα, μεμβράνες κι άσπαστα κύτταρα.

## ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ (IMMUNOPRECIPITATION-IP)

Η ανοσοκατακρήμνιση αποτελεί μία μορφή χρωματογραφίας συγγένειας. Ως στερεή φάση χρησιμοποιούνται σφαιρίδια από αгарόζη ή κάποιο ανάλογο υλικό όπως η σεφαρόζη, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία. Πάνω στα σφαιρίδια βρίσκονται ομοιοπολικά δεσμευμένες πρωτεΐνες A ή πρωτεΐνες G, που προέρχονται από βακτήρια και έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν με μεγάλη συγγένεια την Fc περιοχή ορισμένων τύπων IgG ανοσοσφαιρινών. Με τον τρόπο αυτό, σχηματίζονται σύμπλοκα σφαιριδίων-πρωτεϊνών A/G-αντισωμάτων, όπου δεσμεύεται επιλεκτικά το αντιγόνο προς κατακρήμνιση και μαζί οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με αυτό.

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

Αναλυτικότερα:

### 1) ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Χρησιμοποιούμε μείγμα των σφαιριδίων που φέρουν πρωτεΐνη A και σφαιρίδια που είναι συνδεδεμένα με πρωτεΐνη G. Θέλουμε συνολικά 50 μl σφαιριδίων για κάθε δείγμα. Τα σφαιρίδια φυλάσσονται σε περίσσεια 70 % αιθανόλης για να μην στεγνώσουν. Η αιθανόλη απομακρύνεται σε πρώτη φάση με φυγοκέντρηση των σφαιριδίων για 3 min στα 2000 rpm, στους 4°C. Έπειτα, αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml RIPA buffer. Τα σφαιρίδια αναδεύονται στη ρόδα για 5 λεπτά, στους 4°C και φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στα 2000 rpm, στους 4°C. Αυτό το στάδιο επαναλαμβάνεται μια φορά ακόμη.

Ακολουθώς, χωρίζουμε τα σφαιρίδια σε τόσα ίσα μέρη, ανάλογα με τον αριθμό των διαφορετικών αντισωμάτων που θα χρησιμοποιήσουμε ή ανάλογα με τα διαφορετικά κλάσματα που έχουμε. Ακόμη, κρατάμε σφαιρίδια και για το στάδιο pre-clearance που θα περιγραφεί παρακάτω. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προσθήκη των αντισωμάτων στα σφαιρίδια. Προσθέτουμε x μl RIPA buffer και όσα μl από το εκάστοτε αντίσωμα απαιτούνται ώστε να υπάρχουν 2 μg αυτού στο τελικό διάλυμα. Προκειμένου να σχηματιστούν τα επιθυμητά σύμπλοκα, σύμφωνα με τα παραπάνω, πραγματοποιείται επώαση 4 ωρών των αντισωμάτων με τα σφαιρίδια υπό ανάδευση στη ρόδα, στους 4°C.

### 2) ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Στο χρονικό διάστημα επώασης των αντισωμάτων με τα σφαιρίδια (4 ώρες), προετοιμάζουμε το μιτοχονδριακό εκχύλισμα. Πρώτα, επαναδιαλυτοποιούμε το σύνολο των μιτοχονδριακών ιζημάτων σε έναν α όγκο RIPA buffer, ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος. Για κάθε 1ml RIPA buffer που χρησιμοποιούμε, προσθέτουμε και 10 μl Protease Inhibitors, 2 μl DTT 1M και 0,5 μl PMSF 200μM. Τα 3 αυτά συστατικά προστίθενται σε κάθε διάλυμα που χρησιμοποιείται για διαδικασίες λύσης κυττάρων ή οργανιδίων, ώστε όταν κατά τη λύση απελευθερώνονται

πρωτεολυτικά ένζυμα να μην καταστρέφονται οι πρωτεΐνες. Έπειτα, ομογενοποιούμε τα μιτοχόνδρια με τη χρήση υπερήχων, εφαρμόζοντας 3 σετ των 10 δευτερολέπτων με μεσοδιάστημα ενός λεπτού. Κατά τη διαδικασία αυτή, το δείγμα βρίσκεται στον πάγο.

Μετά το βήμα αυτό, προστίθεται στο εκχύλισμα PBS×1 που φέρει κι αυτό τους κατάλληλους αναστολείς πρωτεασών, όπως το RIPA. Η αναλογία όγκων των PBS και RIPA στο τελικό διάλυμα πρέπει να είναι 4:1. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στα 13000 rpm, στους 4°C και το υπερκείμενο προστίθεται σε eppendorf με σφαιρίδια, αλλά χωρίς αντίσωμα για επώαση μια ώρα υπό ανάδευση, στους 4°C. Το βήμα αυτό ονομάζεται pre-clearance και εφαρμόζεται ώστε να απομακρυνθεί από το εκχύλισμα ένα ορισμένο ποσοστό πρωτεϊνών που μπορεί να συνδεθούν μη ειδικά με τα αντισώματα

Μετά το πέρας των απαραίτητων χρόνων επώασης, το μιτοχονδριακό εκχύλισμα διαμοιράζεται ισόποσα σε κάθε eppendorf με διαφορετικό αντίσωμα κι ακολουθεί επώαση over night υπό ανάδευση, στους 4°C.

Την επόμενη μέρα, φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 4 λεπτά στα 3000 rpm, στους 4°C, ώστε να απομακρύνουμε τα συστατικά του εκχυλίσματος που δεν κατακρημνίστηκαν (unbound). Ακολουθούν 4 εκπλύσεις με PBS×1 και στη συνέχεια, προσθέτουμε στα σφαιρίδια sample buffer 2×. Αναδεύουμε προσεκτικά και τα θερμαίνουμε στους 95 °C για 2 λεπτά. Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στα 2000 rpm, στους 20°C και συλλέγουμε σε νέο eppendorf το υπερκείμενο. Επαναλαμβάνουμε το βήμα με το sample buffer και αφού συλλέξουμε για δεύτερη φορά το υπερκείμενο, πραγματοποιούμε μια τελευταία φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 2000 rpm, στους 20 °C, ώστε να απομακρύνουμε τυχόν υπολείμματα σφαιριδίων που μπορεί να συλλέχθηκαν μαζί με το υπερκείμενο. Έτσι, πλέον έχουμε συλλέξει τις πρωτεΐνες που κατακρημνίστηκαν.

### 3) ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

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

#### Πηκτική διαχωρισμού (separating)

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

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

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

Φορτώνουμε τα δείγματα και εφαρμόζεται τάση ίση με 0,02 A. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι δύο με δυόμιση ώρες.

#### 4) SILVER STAINING ΓΙΑ 2D GELS ΣΥΜΒΑΤΟ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

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

Η διαδικασία έχει ως εξής:

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

#### ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια αναλυτική τεχνική για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό του τύπου των χημικών ουσιών που υπάρχουν σε ένα δείγμα, μέσα από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μάζας κάθε ένωσης. Τα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη

συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους ( $m/z$ ). Η φασματομετρία μαζών είναι από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης και εφαρμόζεται, ευρέως, σε πολλούς τομείς τεχνολογίας και έρευνας.

Η πρόοδος στη μικροηλεκτρονική και οι αυξανόμενες απαιτήσεις στη χημική ανάλυση, έχουν προωθήσει την ανάπτυξη της τεχνικής και την έχουν καταστήσει απαραίτητο εργαλείο για μεγάλο φάσμα επιστημονικών, ερευνητικών δραστηριοτήτων. Η φασματομετρία μαζών προσφέρει πληροφορίες για: α) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μιγμάτων, β) τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων, γ) την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων, δ) τη δομή και σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging).

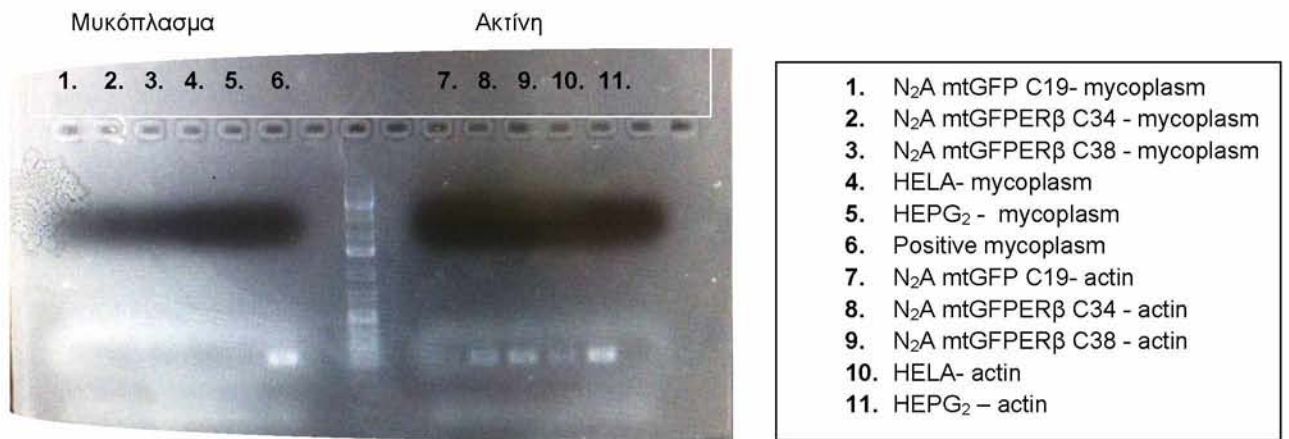
Στην πρωτεομική, η φασματομετρία μαζών εφαρμόζεται για την εύρεση μοριακών βαρών, την ταυτοποίηση και την ποσοτική αποτίμηση πεπτιδίων πρωτεϊνών, την εύρεση δομής (πρωτοταγούς), τη μελέτη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, την αλληλεπίδρασεων πρωτεϊνών κλπ.

Η παρούσα εργασία αποτελεί την τρίτη επανάληψη του πειράματος. Σύμφωνα με τις προηγούμενες επαναλήψεις τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη MS, αρχικά επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού linux, για αφαίρεση των μορίων που ήταν κοινά μεταξύ των συνθηκών control και των δειγμάτων. Το λογισμικό αυτό φέρει το πλεονέκτημα ότι σε σύντομο χρονικό διάστημα και με τη χρήση κατάλληλων εντολών μπορούμε να ολοκληρώσουμε διεργασίες που με τη χρήση του υπολογιστικού φύλλου excel θα απαιτούνταν πολύς χρόνος. Έπειτα, τα μόρια των δειγμάτων απαλλαγμένα πια από τα κοινά μόρια με τη συνθήκη control αναλύθηκαν με βάση το πρόγραμμα David Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis ώστε να κατηγοριοποιηθούν σε μονοπάτια ανάλογα με τη βιολογική τους δράση.

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **4.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ**

Προκειμένου να ελέγξουμε αν οι κυτταρικές σειρές N<sub>2</sub>A με τις οποίες δουλέψαμε ήταν καθαρές από μυκόπλασμα κάναμε 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:



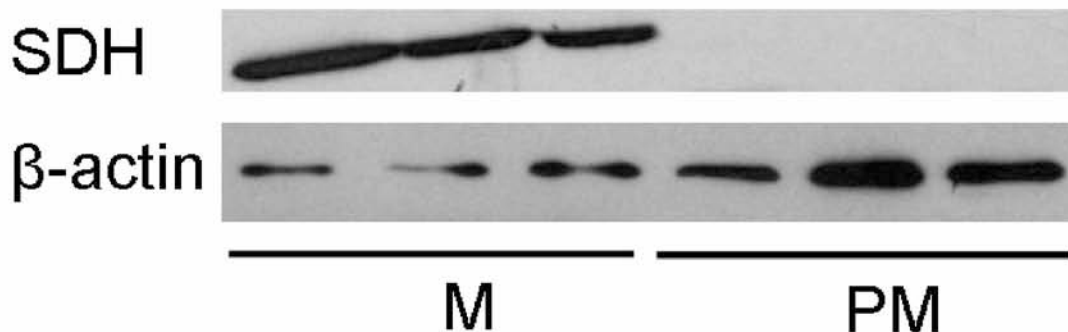
Εικόνα 8. Απεικόνιση του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης μετά από έκθεση της πηκτής σε ακτινοβολία UV. Στο δεξί τμήμα της εικόνας αναγράφονται τα δείγματα που φορτώθηκαν σε κάθε πηγαδάκι καθώς και ο αριθμός των αποικιών των κυττάρων.

Το προϊόν της PCR του μυκοπλάσματος έχει μέγεθος περίπου 434-468 bp. Παρατηρούμε ότι, τα προϊόντα των PCR των δειγμάτων N<sub>2</sub>A mtGFP C19, N<sub>2</sub>A mtGFPERβ C34 και N<sub>2</sub>A mtGFPERβ C38 δεν παρουσιάζουν ζώνη DNA στο μέγεθος των βάσεων, που παρουσιάζει το θετικό control. Επιπλέον, βλέπουμε πως όλες οι κυτταρικές σειρές εμφανίζουν προϊόν στην αντίδραση ενίσχυσης της ακτίνης, συνεπώς η διαδικασία απομόνωσης DNA ολοκληρώθηκε σωστά και το αποτέλεσμα της PCR για το μυκόπλασμα μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστο.

#### **4.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ N<sub>2</sub>A mtGFP C16 ΚΑΙ 19 ΚΑΙ N<sub>2</sub>A mtGFPERβ C34 ΚΑΙ 38 ΚΥΤΤΑΡΑ.**

Στα πλαίσια της τρίτης επανάληψης για τον έλεγχο και την επαλήθευση των μορίων που έχουν βρεθεί από προηγούμενα πειράματα στο εργαστήριό μας, ότι αλληλεπιδρούν με την μιτοχονδριακή μορφή του ERβ και επηρεάζουν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, εφαρμόσαμε αρχικά τη μέθοδο της διαφορικής φυγοκέντρησης για την απομόνωση εμπλουτισμένου κλάσματος μιτοχονδρίων και την κατά το δυνατόν απομόνωσή του από τα διαλυτά συστατικά των κυττάρων, όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη υποενότητα. Για την απομόνωση 2,2 mg και 5,25 mg mg εμπλουτισμένου μιτοχονδριακού κλάσματος από N<sub>2</sub>A mtGFP και N<sub>2</sub>A mtGFPGR κύτταρα, αντίστοιχα, χρειάστηκε να αναπτυχθούν κύτταρα σε 18 και 28 τρυβλία διαμέτρου 15 cm αντίστοιχα, σε συνολικό χρόνο ανάπτυξης αυτών 3 μηνών.

Προκειμένου να εξακριβωθεί ότι η μέθοδος της κλασμάτωσης που χρησιμοποιείται είναι αποτελεσματική ως προς την απομόνωση εμπλουτισμένων κλασμάτων σε μιτοχονδριακές πρωτεΐνες είχε προηγηθεί ανοσοαποτύπωση κατά Western, με χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH) η οποία συνιστά πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων και ένζυμο του κύκλου του Krebs σε νευρική κυτταρική σειρά SH5YA και τα αποτελέσματα φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 9. Έλεγχος αποτελεσματικότητας της απομόνωσης μιτοχονδρίων με τη μέθοδο της διαφορικής φυγοκέντρησης. Ο έλεγχος επιτεύχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH) και της ακτίνης σε απομονωμένα υποκυτταρικά κλάσματα από νευρικά κύτταρα SH5YA. Όπως φαίνεται στο αριστερό τμήμα της εικόνας στο μιτοχονδριακό κλάσμα (MITO) που έχει προκύψει από την κλασμάτωση βλέπουμε εμφάνιση σήματος της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDH) η οποία συνιστά πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων και ένζυμο του κύκλου του Krebs, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι έχει γίνει απομόνωση εμπλουτισμένων κλασμάτων με μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Στο δεξί τμήμα της εικόνας στο PM (Post-Mito) που έχει προκύψει από την κλασμάτωση και αποτελείται από κυτταροπλασματικά συστατικά του κυττάρου, μικροσωμάτια και θραύσματα της πλασματικής μεμβράνης, δεν βλέπουμε σήμα της SDH γεγονός που υποδεικνύει πως δεν υπάρχουν μιτοχόνδρια. Η ακτίνη που εντοπίζεται στον κυτταροσκελετό εμφανίζεται σε αυξημένα επίπεδα στο PM, ενώ σε χαμηλότερα επίπεδα στο M, όπως και αναμενόταν. Η ύπαρξη μικρού ποσοστού ακτίνης στα μιτοχόνδρια οφείλεται αφενός στο ότι δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας υποστηρίζουν μία λειτουργική σχέση της ακτίνης με οργανίδια του κυττάρου, όπως τα μιτοχόνδρια και αφετέρου στο ότι δεν είχε πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός εκπλύσεων για την απομάκρυνση της ακτίνης από το μιτοχονδριακό κλάσμα, οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν ρήξη της μιτοχονδριακής μεμβράνης και μείωση του αριθμού ακέραιων λειτουργικών μιτοχονδρίων, γεγονός που θα ήταν εις βάρος της δοκιμασίας IP.

Έπειτα, ο προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης στα μιτοχονδριακά κλάσματα επιτεύχθηκε με εφαρμογή της μεθόδου Bradford μετά από λύση των μιτοχονδρίων σε ήπιο υποτοτονικό διάλυμα λύσης παρουσία μη ανιοντικού απορρυπαντικού και χρήση υπερήχων όπως περιγράφεται στην παράγραφο προετοιμασίας του μιτοχονδριακού εκχυλίσματος.

Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτά του προσδιορισμού:

Αποτελέσματα φωτομέτρησης στα 595 nm:

Control κύτταρα: 0,105

Κύτταρα με ERβ: 0,161

-Με τη χρήση της εξίσωσης  $y = 0,0345x + 0,010$  μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε εξεταζόμενο δείγμα (σε mg/ml).

Επομένως, για  $y = 0,105$  έχουμε:  $0,105 = 0,0345x + 0,010 \leftrightarrow 0,105 - 0,010 = 0,0345x \leftrightarrow 0,095 = 0,0345x \rightarrow x = 2,75 \text{ mg/ml}$

Και για  $y = 0,161$  έχουμε:  $0,161 = 0,0345x + 0,010 \leftrightarrow 0,161 - 0,010 = 0,0345x \leftrightarrow 0,151 = 0,0345x \rightarrow x = 4,376 \text{ mg/ml}$

#### **4.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΠΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΜΟΡΦΗ ΤΟΥ ERβ.**

Με σκοπό την απομόνωση και στην συνέχεια τον χαρακτηρισμό των μορίων που αλληλεπιδρούν με τον ERβ στο μιτοχονδριακό περιβάλλον εφαρμόστηκε η μέθοδος ανοσοκατακρήμνισης, όπως περιγράφεται αναλυτικά σε προηγούμενη υποενότητα. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: goat IgG για Control και για ERβ, αντίσωμα έναντι του GFP για την κατακρήμνιση της χιμαιρικής πρωτεΐνης τόσο για τα Control κύτταρα mtGFP όσο και για τα κύτταρα με ERβ (mtGFPERβ), αντίσωμα MCA έναντι του ERβ.

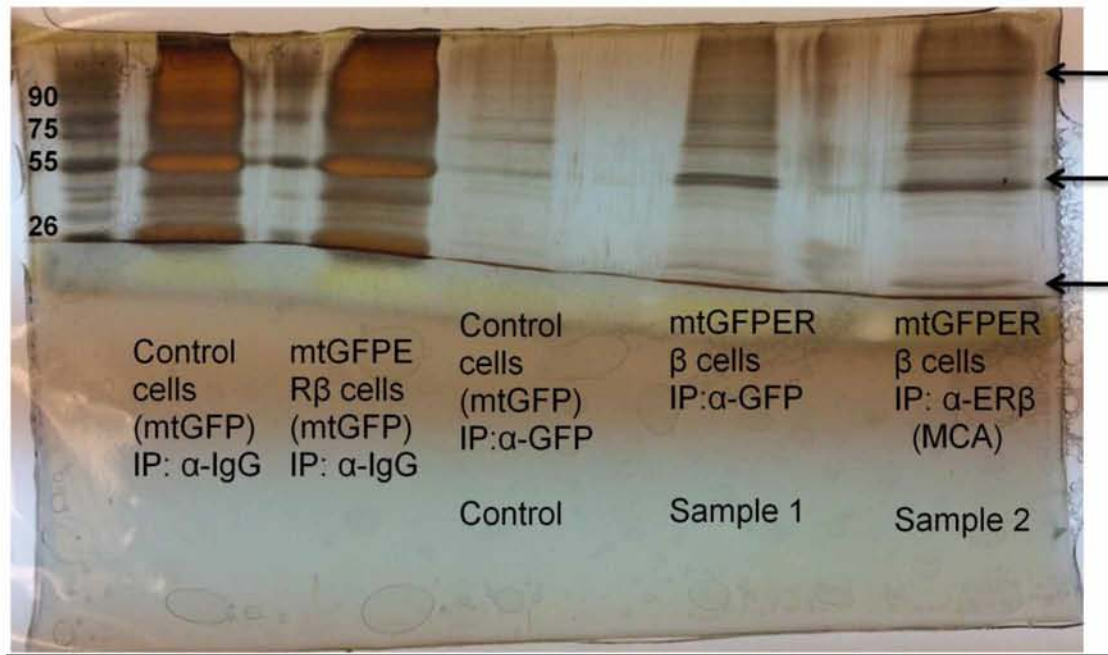
Κατά την εφαρμογή της μεθόδου ανοσοκατακρήμνισης χωρίσαμε σε δύο eppendorfs τα control μιτοχονδριακά εκχυλίσματα 800μl, ( $2,75 \text{ mg/ml} \times 0,8 \text{ ml} = 2,2 \text{ mg}$ ) ένα για το κάθε αντίσωμα: IgG, GFP, από 400μl, συνεπώς σε κάθε eppendorf είχαμε 1,1 mg πρωτεΐνης.

Από το μιτοχονδριακό εκχύλισμα των κυττάρων ERβ είχαμε 1200 μl, ( $4,376 \text{ mg/ml} \times 1,2 \text{ ml} = 5,25 \text{ mg}$ ) χωρίσαμε σε τρία eppendorfs από 400μl, ένα για το κάθε αντίσωμα: IgG, GFP, MCA, συνεπώς σε κάθε eppendorf είχαμε 1,75 mg πρωτεΐνης.

Η ποσότητα πρωτεΐνης τόσο των control κυττάρων όσο και των κυττάρων με ERβ είναι ικανοποιητική για την διεξαγωγή αξιόπιστης IP.

Τα απομονωμένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα μετά το πέρας της ανοσοκατακρήμνισης ηλεκτροφορήθηκαν σε 10% SDS πηκτή ηλεκτροφόρησης και στην συνέχεια ακολούθησε χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο, με ειδικά τροποποιημένο πρωτόκολλο συμβατό με την περαιτέρω ανάλυση και χαρακτηρισμό των ανοσοκατακρημνισθέντων πρωτεϊνών με εφαρμογή της μεθόδου φασματοσκοπίας μάζας. Το αποτέλεσμα της χρώσης απεικονίζεται παρακάτω:





Εικόνα 10. Χρώση με νιτρικό άργυρο των πρωτεϊνών των συμπλόκων ανοσοκατακρήμνισης μετά την ηλεκτροφόρησή τους.

Οι ζώνες που φαίνονται στην πηκτή αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες που ανοσοκατακρημνίστηκαν ως σύμπλοκα με τα τον ERβ και τα αντισώματα καθώς επίσης και στις βαριές κι ελαφριές αλυσίδες των αντισωμάτων. Οι βαριές αλυσίδες εντοπίζονται περίπου στα 55 kD, οι ελαφριές περίπου στα 26 kD, ενώ στα 90 kD πιθανολογούμε ότι είναι ο ERβ (χιμαιρική πρωτεΐνη).

Οι στήλες με τα Control κύτταρα με αντίσωμα IgG και mtGFPERβ με αντίσωμα IgG φαίνεται να έχουν πολλές προσμίξεις, γεγονός που οφείλεται πιθανότητα στην παλαιότητα του αντισώματος normal goat IgG που χρησιμοποιήθηκε. Για το λόγο αυτό ως αξιόπιστο control στη φασματομετρία μάζας και στην περαιτέρω πρωτεομική ανάλυση θα λάβουμε την τρίτη στήλη με τα Control κύτταρα με αντίσωμα έναντι GFP.

Η πηκτή στάλθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ" για πρωτεομική ανάλυση μέσω φασματομετρίας μάζας και τα αποτελέσματα αναμένονται.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των προηγούμενων δύο επαναλήψεων που διεξήχθησαν από την συνάδελφο Τζιόρτζιου Μαρία και έπειτα από την επεξεργασία τους με τη χρήση του προγράμματος DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis, τα μόρια που ανοσοκατακρημνίστηκαν, κατηγοριοποιήθηκαν στα εξής μεταβολικά μονοπάτια: οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, κύκλου κιτρικού οξέος, γλυκόλυσης, μεταβολισμού λιπαρών οξέων, βιοσύνθεσης οιστρογόνων, μόρια-ρυθμιστές της δράσης των υποδοχέων οιστρογόνων, αλλά και σε μονοπάτια που δεν χαρακτηρίζονται ως μεταβολικά, όπως η απόπτωση ή η αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες που λειτουργούν ως συνοδές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην μετακίνηση και μεταφορά μορίων στο μιτοχόνδριο.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs) ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και είναι υποδοχείς στεροειδών ορμονών με δράση μεταγραφικών παραγόντων. Μέσω της προσδετοεξαρτόμενης ενεργοποίησής τους επηρεάζουν πολλές φυσιολογικές διεργασίες στα θηλαστικά, με κυριότερες την αύξηση, την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των αρσενικών και θηλυκών δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, τη συμπεριφορά και στα δύο φύλα, την αναπαραγωγή, την ανάπτυξη των οργάνων, την φυσιολογία του καρδιαγγειακού συστήματος και τη διαμόρφωση των οστών. Προσδέτες των υποδοχέων οιστρογόνων είναι τα οιστρογόνα, με το πιο δραστικό οιστρογόνο που παράγεται στον οργανισμό να είναι η 17 β-οιστραδιόλη (E<sub>2</sub>). (J. R. Rettberg et al, 2013) Εντοπίζονται σε δύο κύριους υπότυπους: στον υποδοχέα οιστρογόνων α (Estrogen Receptor alpha, ERα, NR3A1) και στον υποδοχέα οιστρογόνων β (Estrogen Receptor beta, ERβ, NR3A2) που ανήκουν στους μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων (N. Heldring et al., 2007) και παρουσιάζουν ένα διαφορετικό μοτίβο κατανομής στους ιστούς, αλλά και διαφορετικά αποτελέσματα στην κυτταρική λειτουργία έπειτα από την ενεργοποίησή τους. (M. Bottner et al, 2014)

Όλο και περισσότεροι ερευνητές τα τελευταία χρόνια δείχνουν μεγάλο ενδιαφέρον στις δράσεις του ERβ στο μιτοχόνδριο, έπειτα από μελέτες που έδειξαν την παρουσία του στα οργανίδια αυτά. Τα μιτοχόνδρια είναι πολύ σημαντικά κυτταρικά οργανίδια καθώς είναι υπεύθυνα για την επιβίωσή του κυττάρου εφόσον παράγουν περισσότερο από το 90% της απαιτούμενης ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, εμπλέκονται σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή της ουρίας, στη βιοσύνθεση της αίμης, καθώς και στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Όπως έχει δηχθεί τα μιτοχόνδρια αποτελούν συστατικά-κλειδιά στην απόκριση του κυττάρου σε καταστάσεις στρες καθώς κατέχουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, στην κυτταρική διαφοροποίηση και τη γήρανση. (A. M. Psarra, C. Sekeris, 2008) Τα μιτοχόνδρια μπορούν να συνθέσουν ένα μικρό μέρος των συστατικών που χρειάζονται για τις λειτουργίες τους. Για το λόγο αυτό επικοινωνούν με το υπόλοιπο κύτταρο και εισάγουν πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση κωδικοποιείται από τον πυρηνικό DNA. Η έκφραση των πρωτεϊνών αυτών, όπως είναι μερικοί μεταγραφικοί παράγοντες και πυρηνικοί συνενεργοποιητές, ρυθμίζουν τη βιογένεση των μιτοχονδρίων πιθανόν μέσω συνεργασίας πυρήνα – μιτοχονδρίων. (J. W. Simpkins et al. 2008)

Τα περισσότερα γονίδια που ρυθμίζονται από τον ERβ είναι μιτοχονδριακές δομικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση καθώς έχει βρεθεί ότι τα οιστρογόνα αυξάνουν την έκφραση των υπομονάδων I, II και III της οξειδάσης του κυτοχρώματος C, που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Επιπλέον, ο ERβ μπορεί να αυξήσει την αναπνευστική ικανότητα, να αυξήσει την αντιοξειδωτική δραστηριότητα καθώς και να αναστείλει την απόπτωση (A. M. Psarra, C. Sekeris, 2008, T.-L. Liao et al. 2015)

Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμπλοκή ή μη του ERβ σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπου μπορεί να έχει επαγωγική ή προστατευτική δράση, ανάλογα με τον ιστό που εντοπίζεται ο καρκίνος. (B. J. Deroo et al. 2006) Σύμφωνα με έρευνες ο ERβ ασκεί τόσο αντι-πολλαπλασιαστικές όσο και πολλαπλασιαστικές επιδράσεις, έχοντας έναν πολύπλευρο ρόλο.

Κατά την παρούσα εργασία έγινε απομόνωση μορίων με τα οποία αλληλεπιδρά εντός του μιτοχονδρίου ο ERβ, χρησιμοποιώντας κύτταρα τα οποία εκφράζουν σταθερά τόσο την GFP όσο και την χιμαιρική GFPERβ πρωτεΐνη με μιτοχονδριακή στόχευση. Τα κύτταρα αυτά έχουν παρασκευαστεί στο εργαστήριο μας από τον υποψήφιο διδάκτορα Βύρωνα Γοργογιέτα. Το σύνολο των βιοχημικών δοκιμασιών που εφαρμόστηκαν αποσκοπούν στην επαλήθευση των αποτελεσμάτων που έχουν προκύψει από προηγούμενες εργασίες σε ότι αφορά τον χαρακτηρισμό αυτών των μορίων και με σκοπό τη διεύρυνση των γνώσεων μας σχετικά με τους πιθανούς ρόλους του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια και την ρύθμιση των βιοχημικών μονοπατιών στα οποία εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα. Για το λόγο αυτό έγινε κλασμάτωση κυττάρων control N<sub>2</sub>A mtGFP (18 plates) και N<sub>2</sub>A mtGFPERβ (28 plates) που υπερεκφράζουν σταθερά τη βήτα μορφή του υποδοχέα σε σύζευξη με τη GFP πρωτεΐνη με μιτοχονδριακή στόχευση, προκειμένου να απομονώσουμε τα μιτοχόνδρια. Στη συνέχεια ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση (IP) ώστε να κατακρημνίσουμε τα μόρια που αλληλεπιδρούν με τον ERβ στα μιτοχόνδρια. Στην ανοσοκατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα: normal goat IgG (μη ανοσοποιημένο ζώο) για τα μιτοχονδριακά κλάσματα από τα control N<sub>2</sub>A mtGFP και από τα N<sub>2</sub>A mtGFPERβ, αντισώματα έναντι της GFP πρωτεΐνης και για τα δύο κυτταρικά μιτοχονδριακά κλάσματα και αντίσωμα MCA έναντι του ERβ στο μικτοχονδριακό κλάσμα από N<sub>2</sub>A mtGFPERβ. Ύστερα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων και χρώση της πηκτής ακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο, η πηκτική στάλθηκε στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών επιστημών "Αλεξάντερ Φλέμινγκ" για φασματομετρία μάζας (MS) και πρωτεομική ανάλυση, με σκοπό τον χαρακτηρισμό των μορίων που συνκατακρημνίστηκαν με τον ERβ και άρα αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα. Τα αποτελέσματα αναμένονται για να επαληθεύσουμε τα ήδη υπάρχοντα από τις δύο προηγούμενες επαναλήψεις του πειράματος, σύμφωνα με τις οποίες ο ERβ μπορεί να αλληλεπιδρά με μόρια που συμμετέχουν σε σημαντικά μεταβολικά μονοπάτια, όπως στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, στον κύκλο του κιτρικού οξέος, στη γλυκόλυση ή τη γλυκονεογένεση, στο μεταβολισμό αμινοξέων και του πυροσταφυλικού. Τα μονοπάτια αυτά είναι αλληλένδετα και εξαρτώνται το ένα από το άλλο σε μεγάλο βαθμό. Συνεπώς, ο ERβ μέσω αλληλεπίδρασής του με μόρια αυτών των μονοπατιών φαίνεται να έχει τη δυνατότητα ρύθμισης της παραγωγής ATP στο κύτταρο σε πολλά σημεία, επιδρώντας είτε ενισχυτικά είτε ανασταλτικά, κάτι που επιβεβαιώνεται κι από τη βιβλιογραφία για τους ρόλους του ERβ εντός του μιτοχονδρίου (Liao et al, 2015, A. M. Psarra, C. Sekeris,2008). Επιπλέον ο ERβ φαίνεται να αλληλεπιδρά και με μόρια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση οιστρογόνων, μόρια-ρυθμιστές της δράσης και του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, αλλά και σε μονοπάτια που δεν χαρακτηρίζονται ως μεταβολικά, όπως η

απόπτωση ή η αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες που λειτουργούν ως συνοδές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην μετακίνηση και μεταφορά μορίων στο μιτοχόνδριο.

Τα περισσότερα μόρια που βρέθηκαν ότι αλληλεπιδρούν με τον ERβ και εντάσσονται στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αποτελούν μόρια που σχετίζονται με την παθογένεια νευροεκφυλιστικών νοσημάτων, όπως Parkinson, Alzheimer και Huntington, γεγονός που ίσως να συσχετίζει την δράση του ERβ με την εμφάνιση ή την προστασία από νευροεκφυλιστικά νοσήματα.

Περαιτέρω μελέτες ως προς την λειτουργία του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια ίσως να μπορέσουν να κατοχυρώσουν την εμπλοκή του και την επίδραση του στα βιολογικά μονοπάτια που αναφέρθηκαν καθώς επίσης και να μπορέσει να γίνει στόχος για την πρόληψη νευροεκφυλιστικών νοσημάτων.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. M. Robinson-Rechavi, H. Escriva Garcia, V. Laudet (2003), "The nuclear receptor superfamily", *Journal of Cell Science* 116, 585-586
2. A.-M. G. Psarra, C. E. Sekeris, (2008), "Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment", Elsevier B.V., 1783, 1–11
3. I. J. McEwan and A. M. Nardulli, (2009), Nuclear hormone receptor architecture - form and dynamics: The 2009 FASEB Summer Conference on Dynamic Structure of the Nuclear Hormone Receptors NRS
4. P. Germain, B. Staels, C. Dacquet, M. Spedding, V. Laudet (2006) Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors, *Pharmacological Reviews*, Vol. 58, No. 4, 685-704
5. R. Sever, C. Glass, (2013) *Signaling by Nuclear Receptors*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3;5:a016709
6. Y. Zhang, X.Y. Luo, D.H. Wu, Y. Xu, (2015) ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery, *Acta Pharmacol Review*.
7. J. M. Olefsky, (July 17, 2001), "Nuclear Receptor Minireview Series", *The journal of biological chemistry*, Vol. 276, No. 40, pp. 36863–36864
8. 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
9. M. Beato, J. Klug, (2000), "Steroid hormone receptors: An update", *Human reproduction update*, Vol. 6, No 3, pp. 225-236
10. J. R. Rettberg, J. Yag, R. Diaz Brinton (2013), "Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body", *Elsevier Frontiers in Neuroendocrinology*
11. N. Heldring, A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Strom, E. Treuter, M. Warner, J.-A. Gustafsson, (July 2007), "Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets", *The American Physiological Society*, vol 87, 905–931
12. N. Heldring, A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tugague, A. Ström, E. Treutter, M. Warner, J. Gustafsson, (2007) *Estrogen*

Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets, *Physiology Reviews*, 87: 905–931

13. K. A. Burns, Karina F. Rodriguez, S. C. Hewitt, K. S. Janardhan, S. L. Young, and K. S. Korach, (2012) Role of Estrogen Receptor Signaling Required for Endometriosis-Like Lesion Establishment in a Mouse Model, *Endocrinology*
14. M. Bottner, P. Thelen, H. Jarry, (January 2014) Estrogen receptor beta: Tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* Volume 139, Pages 245–251
15. J. M. Hall, J. F. Couse, K. S. Korach, (2001) The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 40, 36869–36872
16. B. J. Deroo, A. V. Buensuceso, (2010) Mini review: Estrogen Receptor  $\beta$ : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9):1703–1714
17. J.-Q. Chen, P. R. Cammarata, C. P. Baines, J. D. Yager, (2009) Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, 1540–1570
18. J. W. Simpkins, S.-H. Yang, S. N. Sarkar, V. Pearce, (2008), “Estrogen actions on mitochondria – Physiological and pathological implications”, *Molecular and Cellular Endocrinology* 290, 51–59
19. T.-L. Liao, C.-R. Tzeng, C.-L. Yu, Y.-P. Wang, S.-H. Kao, (2015), “Estrogen receptor –  $\beta$  in mitochondria: implications for mitochondrial bioenergetics and tumorigenesis”, *Annals of the New York Academy of sciences*, 1350, 52–60
20. C. M. Klinge, (2008) Estrogenic Control of Mitochondrial Function and Biogenesis, Vol. 105, No. 6, 1342-1351