

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

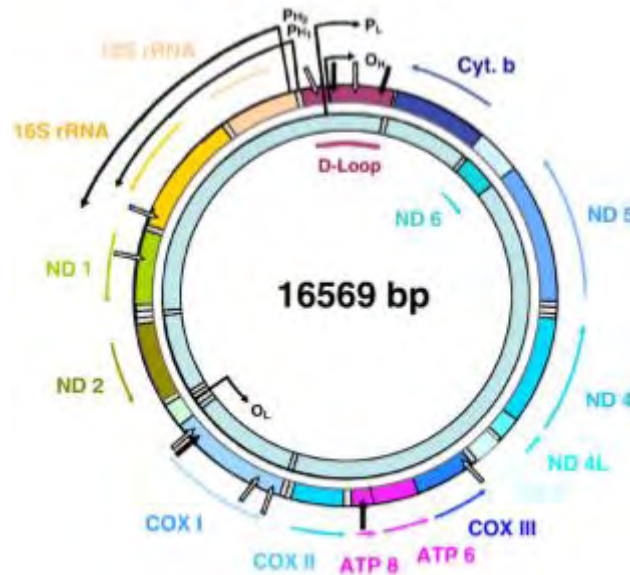
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΑΜΕΣΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΗΤΑ ΙΣΟΜΟΡΦΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΗ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ»

«ROLE OF MITOCHONDRIAL ESTROGEN RECEPTOR BETA IN MITOCHONDRIAL TRANSCRIPTIONAL REGULATION»



ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΑΧΙΛΛΕΑΣ ΓΕΩΡΓΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΔΡ. ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ ΨΑΡΡΑ

ΛΑΡΙΣΑ 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**, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.

Τριμελής επιτροπή:

**Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας ΤΒΒ, Π.Θ.

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

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

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ.....	9
1.1.1. ΔΟΜΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ.....	9
1.2. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ.....	10
1.3 . ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ.....	11
1.3.1. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΩΝ ERs.....	12
1.3.2. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ERs ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.....	13
1.3.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERs .....	13
1.3.4. ΠΡΟΣΔΕΤΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ERs.....	14
1.3.5. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ERs ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΕΤΗ.....	15
1.3.6. ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ Ers.....	15
1.3.7. ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ Ers.....	16
1.4 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Β (ERβ).....	18
1.5 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ERα-ERβ.....	19
1.6. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	20
1.6.1. ΕΙΣΟΔΟΣ ERβ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ.....	22
1.6.2. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ERβ.....	24
1.7. ERβ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	26
1.8. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....	28
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	29
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	30
3.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	30
3.2. ΥΛΙΚΑ.....	30
3.2.1 ΧΗΜΙΚΑ.....	30
3.2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	32
3.2.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	32
3.2.4. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ.....	33

3.2.5 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	33
3.3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ.....	34
3.4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ .....	34
3.4.1. ΞΕΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	34
3.4.2. ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	35
3.4.3. ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	36
3.4.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ PLATES 150x20 mm.....	37
3.4.5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	37
3.5. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ.....	38
3.5.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	38
3.5.2. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (SONICATION).....	39
3.5.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA.....	40
3.5.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA.....	41
3.5.5. ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ (ChIP).....	42
3.5.6. ΣΧΕΔΙΑΣΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ PCR ΚΑΙ REAL-TIME PCR.....	45
3.5.7 PCR ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΔΙΜΕΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ....	45
3.5.8. REAL TIME PCR (qPCR).....	46
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	48
4.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ N2a STABLE.....	48
4.2. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΔΙΜΕΡΩΝ.....	49
4.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΜΕΤΑ ΤΗ ΛΥΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ.....	50
4.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥ mtERβ ΣΤΙΣ ΠΙΘΑΝΕΣ ERE ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR.....	52
4.5. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥ mtERβ ΣΤΙΣ ΠΙΘΑΝΕΣ ERE ΚΑΙ CRE ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ REAL TIME-PCR.....	53
4.6. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥ mtERβ ΣΤΙΣ ΠΙΘΑΝΕΣ ERE ΚΑΙ CRE ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR.....	54
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	56
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59

### *Ευχαριστίες*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας κυρία Άννα-Μαρία Ψαρρά, Επίκουρος Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την τιμή που μου έκανε να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής της ομάδας. Επίσης θα ήθελα να της εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου για την πολύτιμη βοήθεια της, τις συμβουλές που μου πρόσφερε, τις γνώσεις που μου μετέδωσε σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, το ενδιαφέρον της καθώς και για την καθημερινή έμπρακτη στήριξή της.

Φυσικά, δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της επιτροπής της διπλωματικής μου εργασίας, τον κύριο Λεωνίδα Δημήτριο, Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και την κυρία Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορα Βιοχημείας-Μεταβολισμού του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτωρ Βύρων Γοργογιέτα για την υπομονή και τη βοήθεια που μου παρείχε από την πρώτη μέρα της ερευνητικής μου μελέτης, τη στήριξη και την προθυμία του να λύσει οποιαδήποτε απορία μου καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την άψογη συνεργασία.

Τέλος, τα λόγια δεν φτάνουν για να περιγράψουν πόσο ευγνώμων είμαι στην οικογένεια μου για την αδιάκοπη ηθική στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια, βοήθοντας με τον τρόπο τους να ολοκληρώσω έναν από τους μεγαλύτερους στόχους της ζωής μου, μέχρι τον επόμενο.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, που αποτελούν κύρια τάξη των πυρηνικών υποδοχέων. Πρόκειται για μεταγραφικούς παράγοντες που εντοπίζονται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα αλλά και σε άλλες υποκυτταρικές περιοχές και ενεργοποιούνται μετά από την σύνδεσή τους με τον κατάλληλο προσδέτη. Εντοπίζονται σε δύο κύριους υπότυπους: στον υποδοχέα οιστρογόνων α (Estrogen Receptor alpha, ERα, NR3A1) και στον υποδοχέα οιστρογόνων β (Estrogen Receptor beta, ERβ, NR3A2) με διαφορετικό εντοπισμό σε επίπεδο ιστών, αλλά και με διαφορετική επίδραση σε επίπεδο κυττάρου. Όπως φανερώνει και το όνομα τους, οι προσδέτες τους είναι τα οιστρογόνα με το πιο δραστικό από αυτά να είναι η 17 β-οιστραδιόλη (E2).

Μετά και την ανακάλυψη του υποδοχέα οιστρογόνων β (ERβ) το 1996, το ενδιαφέρον όλο και περισσότερων ερευνητών επικεντρώνεται στις δράσεις του ERβ, ιδιαίτερα μάλιστα αυτών στο μιτοχόνδριο, έπειτα από μελέτες που έδειξαν παρουσία του στα οργανίδια αυτά. Τα μιτοχόνδρια, είναι ζωτικά οργανίδια για την παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο, καθώς και για την επιβίωσή του. Παρέχουν περισσότερο από το 90% της απαιτούμενης ενέργειας ενώ παράλληλα εμπλέκονται σε πολλά βήματα του ενδιάμεσου μεταβολισμού, στην παραγωγή της ουρίας, στη βιοσύνθεση της αίμης, καθώς και στη β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια αποτελούν κομβικά σημεία ελέγχου στην απόκριση του κυττάρου σε καταστάσεις στρες, ρυθμίζοντας μεταξύ άλλων το οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, την κυτταρική διαφοροποίηση και τη γήρανση. Απόδειξη του ιδιαίτερα σημαντικού ρόλου τους για το κύτταρο είναι ότι φέρουν το δικό τους γονιδίωμα που κωδικοποιεί ένα σύνολο πρωτεϊνών που εντοπίζονται στο εσωτερικό τους. Η δραστηριότητά τους βασίζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό στην εύρυθμη συνεργασία τους με τον πυρήνα, για τη σύνθεση και είσοδο των απαραίτητων μορίων που φέρουν ρόλους-κλειδιά για την ομαλή έκβαση των μεταβολικών και μη μονοπατιών που πραγματοποιούνται μερικώς ή κατ' εξοχήν στα μιτοχόνδρια.

Πρόσφατες λοιπόν έρευνες υποστηρίζουν ότι ο ERβ εισέρχεται στα μιτοχόνδρια, υποδεικνύοντας ότι διαδραματίζει ένα πιθανό ρυθμιστικό ρόλο στη λειτουργία τους, όσον αφορά την παραγωγή ενέργειας, την έκφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματός, τη βιογένεσή τους καθώς και την εμπλοκή του σε άλλες μιτοχονδριακές λειτουργίες. Πιο συγκεκριμένα για τον ERβ, είναι γνωστό πως μέσω της γενωμικής δράσης του στον πυρήνα επηρεάζει τα επίπεδα μεταγραφής ρυθμιστών της σύνθεσης των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων με μιτοχονδριακή δράση ή τα επίπεδα μεταγραφής των κωδικοποιούμενων από τον πυρήνα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Εκτός αυτών, αρκετές μελέτες δείχνουν πως ο ERβ ασκεί και πιο άμεσες επιδράσεις στα μιτοχόνδρια, μέσω της εισόδου του σε αυτά, οι οποίες επικεντρώνονται στην κυτταρική επιβίωση, σε καταστάσεις στρες, στο ρυθμό μεταγραφής των μιτοχονδριακών γονιδίων και στην παραγωγή ενέργειας.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία ο στόχος ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας σύνδεσης του ERβ σε ειδικές πιθανές ορμονοεξαρτώμενες θέσεις του μιτοχονδριακού DNA, γνωστές και ως στοιχεία απόκρισης οιστρογόνων (EREs).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έμμεσης σύνδεσης του ERβ σε ειδικές αλληλουχίες μιτοχονδριακού DNA-στοιχεία απόκρισης για τον μεταγραφικό παράγοντα CREB (CREs). Η συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές Neuro-2a, που υπερεκφράζουν τον ERβ με μιτοχονδριακή στόχευση, σε χιμαιρικό αναγνωστικό πλαίσιο με το γονίδιο αναφοράς GFP, ενώ κατασκευάστηκαν και κύτταρα control, μόνο με το γονίδιο του GFP, από το συνάδελφο κ. Βύρωνα Γοργογιέτα κατά τη διάρκεια της διδακτορικής του διατριβής. Προκειμένου να επιτευχθεί ο παραπάνω στόχος πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των κυττάρων, συλλογή τους και στη συνέχεια ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων τόσο για την πρωτεΐνη GFP όσο και για τον ERβ. Το επόμενο βήμα ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης των προαναφερθέντων αλληλουχιών μιτοχονδριακού DNA στο ανοσοκατακρημισθέν σύμπλοκο, άρα και της άμεσης ή έμμεσης σύνδεσης του υποδοχέα σε αυτές. Στο στάδιο αυτό χρησιμοποιήθηκαν εξειδικευμένοι εκκινητές για εκάστοτε περιοχή DNA και η ενίσχυση των τμημάτων αυτών μέσω της τεχνικής Real Time PCR (qPCR). Συγκεκριμένα διερευνήθηκε η πιθανή άμεση ή έμμεση σύνδεση του ERβ σε μιτοχονδριακά EREs που εντοπίζονται στην περιοχή D-loop, και στα γονίδια COX1, 12s rRNA, καθώς και σε CRE αλληλουχίες της D-loop περιοχής του μιτοχονδριακού DNA. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν την ύπαρξη των ERE D-loop στο ανοσοκατακρημισθέν σύμπλοκο, υποδηλώνοντας άμεση αλληλεπίδραση του ERβ στο μιτοχονδριακό DNA και άρα άμεσης ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής από το μιτοχονδριακό υποδοχέα ERβ. Επιπλέον, η παρουσία των CRE I-III και CRE III στο ανοσοκατακρημισθέν σύμπλοκο υποδηλώνει πιθανή αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τον παράγοντα CREB και ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής μέσω της δημιουργίας ενός πρωτεϊνικού συμπλοκου όπου συμμετέχουν και οι δύο παράγοντες.

## ABSTRACT

Estrogen receptors (ERs) belong to the family of steroid hormone receptors, which are the main class of large superfamily of nuclear receptors. These are transcription factors located in the nucleus, cytoplasm and other cellular compartments and are activated upon binding to their ligands, the estrogen hormones, the most active of which is 17 beta-estradiol (E2). Estrogen 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.

Since the discovery of the estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) in 1996, the interest of more and more researchers is centered on the elucidation of the biological role of ER $\beta$ , and especially on that on mitochondria organnells, where ER $\beta$  has also been demonstrated to be located. 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. Evidence of their particularly important role for the cell is that they carry their own genome encoding a set of proteins which in total are located in them. Their activity is based largely on their proper co-operation with the nucleus, for the synthesis and entry of the necessary molecules that carry key roles for the smooth outcome of the number of metabolic and non-pathways that occur partially or primarily in mitochondria.

Recent research suggests that ER $\beta$  enters mitochondria, indicating that it plays a potential regulatory role in their function in terms of energy production, mitochondrial genomic expression, biogenesis and involvement in other mitochondrial functions. More specifically for ER $\beta$ , it is known that through the genomic action at the nucleus, affects the transcription of mitochondrial nuclear-encoded transcription factors or the transcription of the core encoded proteins involved in oxidative phosphorylation. In addition, several studies show that ER $\beta$  exerts more direct effects on mitochondria through its entry into them. Thus, mitochondrial ER $\beta$ , is proposed to affect cell survival, stress conditions, mitochondrial gene transcription rates, and energy production.

The aim of this diploma thesis was to investigate whether mitochondrial ER $\beta$  can potentially bind to putative specific hormone-responsive elements (EREs) of the mitochondrial DNA. In addition, indirect binding of ER $\beta$  to specific mitochondrial DNA response elements for CREB transcription factor (CREs) was explored. This study was performed in Neuro-2a cell lines stably overexpressing mitochondrial targeted ER $\beta$  in a chimeric reading frame with the reference gene GFP, while control cells, stably overexpressing the mitochondrial targeted GFP were manufactured by Mr. Vyronas Gorgogietas during his doctoral thesis. In order to achieve the above goal, cells were cultured, harvested and subjected to chromatin immunoprecipitation (ChIP) using specific antibodies either for the GFP or the ER $\beta$  protein. The next step was to investigate the existence of the aforementioned mitochondrial DNA sequences in the precipitated complex, thus the direct or indirect binding of the receptor to them. At this stage, specific DNA primer primers were used and the amplification of these portions via Real Time PCR (qPCR) was performed. In particular, the possible binding of ER $\beta$  to mitochondrial EREs located in the D-loop region, and COX1, 12s rRNA genes, as well as CRE sequences of the D-loop region of mitochondrial DNA, was investigated. Our results show the presence of the D-loop-ERE in the immunoprecipitated complex suggesting a direct interaction of ER $\beta$



with the mitochondrial DNA in the regulatory D-loop-ERE domain and thus potential direct involvement of ERβ in the regulation of mitochondrial transcription. In addition, the presence of CRE I-III and CRE III in the immunoprecipitated complex suggests a potential interaction of the receptor with the CREB transcription factor and regulation of the mitochondrial transcription by creating a protein complex involving both agents.

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

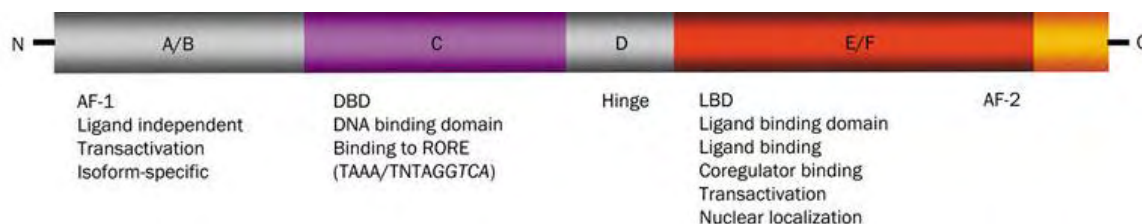
### **1.1. ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ**

Οι πυρηνικοί υποδοχείς (Nuclear Receptors NRs) είναι μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ενεργοποιούνται από στεροειδείς ορμόνες, όπως τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη και διάφορα άλλα λιποδιαλυτά μόρια στα οποία συμπεριλαμβάνονται το ρετινοϊκό οξύ, οι οξυστερόλες και οι θυροειδικές ορμόνες. Μόλις ενεργοποιηθούν οι πυρηνικοί υποδοχείς, αμέσως ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων τα οποία ελέγχουν ένα μεγάλο εύρος βιολογικών διαδικασιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη, ο μεταβολισμός και η αναπαραγωγή. Εντοπίζονται ως μονομερή, ομοδιμερή ή ετεροδιμερή και αναγνωρίζουν αλληλουχίες στο DNA που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης ορμονών (HREs). Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις υπομάδες βασιζόμενοι στην τρόπο δράσης τους. Ο τύπος I περιλαμβάνει υποδοχείς όπως ο υποδοχέας ανδρογόνων, οιστρογόνων και προγεστερόνης οι οποίοι είναι αγκυροβολημένοι στο κυτταρόπλασμα με πρωτεΐνες συνοδούς (Heat Shock Proteins HSP). Η σύνδεση του προσδέτη απελευθερώνει τον υποδοχέα από την πρωτεΐνη συνοδό, επιτρέποντάς του να ομοδιμεριστεί και να εισέλθει στον πυρήνα. Από τη στιγμή που βρίσκεται στον πυρήνα, το σύμπλοκο συνδέτη-υποδοχέα συνδέεται με μεταγραφικούς παράγοντες που διευκολύνουν τη δέσμευση και την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων. Ο τύπος II περιλαμβάνει υποδοχείς όπως αυτός των θυροειδικών ορμονών και του ρετινοϊκού οξέος, οι οποίοι ανήκουν στον πυρήνα, είναι συνδεδεμένοι στα ειδικά στοιχεία απόκρισης στο DNA, ακόμα και απουσία του προσδέτη. Γενικά σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος X (RXR) και απουσία του προσδέτη ασκούν δραστικές κατασταλτικές λειτουργίες μέσω αλληλεπίδρασης με συμπλέγματα NCoR και SMRT που σχετίζονται με τις απακετυλάσες των ιστονών. Αντίθετα, η σύνδεση του προσδέτη έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων καθώς στρατολογούνται παράγοντες που ευνοούν το ξετύλιγμα των ιστονών και κατά επέκταση τη μεταγραφή. Οι πυρηνικοί υποδοχείς της ομάδας III είναι παρόμοιοι με αυτούς της ομάδας I στο ότι συνδέονται στο DNA ως ομοδιμερή, ωστόσο αυτοί της ομάδας III συνδέονται σε HREs ευθέων επαναλήψεων. Τέλος, οι υποδοχείς της IV ομάδας συνδέονται ως μονομερή σε half site HREs. Επίσης, καλό είναι να αναφερθεί πως οι υποδοχείς της ομάδας III και IV χαρακτηρίζονται ως «ορφανοί» διότι δεν έχουν ταυτοποιηθεί ενδογενείς προσδέτες (Richard Sever, Christopher K. Glass, 2013).

#### **1.1.1 ΔΟΜΗ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ**

Οι πυρηνικοί υποδοχείς μοιράζονται μια κοινή δομή, η οποία περιλαμβάνει μία εξαιρετικά μεταβλητή αμινοτελική περιοχή που περιέχει αρκετές διακεκριμένες περιοχές trans-ενεργοποίησης (επικράτεια A / B που επίσης αναφέρεται ως AF1 για τη λειτουργία ενεργοποίησης), μια κεντρική υψηλά συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD) που περιλαμβάνει την περιοχή P-box, ένα μικρό μοτίβο με

νουκλεοτιδική αλληλουχία “AGGTCA” υπεύθυνο για την εξειδικευμένη πρόσδεση στο DNA. Από αναλύσεις τρισδιάστατων δομών σε πολλούς πυρηνικούς υποδοχείς φαίνεται πως η περιοχή πρόσδεσης στο DNA περιλαμβάνει δύο δακτύλους ψευδαργύρου -Zn fingers- (τομέας C). Ακολουθεί μια βραχεία περιοχή υπεύθυνη για τον πυρηνικό εντοπισμό (περιοχή D) και μια αρκετά μεγάλη και συντηρημένη περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (περιοχή E ή LBD) η οποία μάλιστα συμμετέχει στον ολιγοδιμερισμό του υποδοχέα και περιλαμβάνει την περιοχή ενεργοποίησης AF-2 που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του LBD. Σε ορισμένους υποδοχείς εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό τους άκρο, μια επιπλέον επικράτεια γνωστή ως F, της οποίας ο ρόλος δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί. (Sever et al, 2013).



### Εικόνα 1

Δομική και λειτουργική οργάνωση των επικρατειών των πυρηνικών υποδοχέων όπου παρουσιάζονται: η περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης AF-1, η περιοχή σύνδεσης στο DNA (DBD, επικράτεια C), η βραχεία περιοχή D που περιλαμβάνει μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού NLS. Ακολουθεί η περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (LBD, επικράτεια E) και τέλος η επικράτεια F όπου μέχρι στιγμής δεν έχει εξακριβωθεί ο ρόλος της (Yan Zhang et al, 2015).

## 1.2 ΣΤΕΡΟΕΙΔΕΙΣ ΟΡΜΟΝΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ

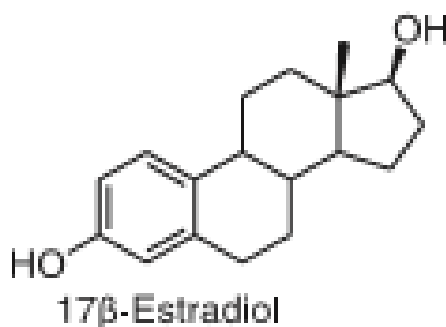
Οι στεροειδείς ορμόνες (SHs) είναι λιπόφιλα μόρια που προέρχονται από τη χοληστερόλη και συντίθενται στο φλοιό των επινεφριδίων (γλυκοκορτικοειδή, μεταλλοκορτικοειδή, ανδρογόνα), τους όρχεις (ανδρογόνα, οιστρογόνα), τις ωοθήκες και τον πλακούντα (οιστρογόνα, προγεστερόνες) (M. Beato et al. 2000). Οι στεροειδείς ορμόνες βοηθούν στον έλεγχο του μεταβολισμού, της φλεγμονής, των λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος, της ισορροπίας άλατος και νερού, στην ανάπτυξη των σεξουαλικών χαρακτηριστικών και στην ανθεκτικότητα έναντι των ασθενειών και των τραυματισμών. Παρ’ όλα αυτά, όλες οι στεροειδείς ορμόνες και ιδιαίτερα οι φυλετικές μπορούν να εμπλέκονται στην ανάπτυξη ασθενειών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα τα οποία διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου του μαστού και του προστάτη αντίστοιχα. Οι SHs φτάνουν στα κύτταρα στόχους μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, όπου είναι συνδεδεμένες με πρωτεΐνες μεταφορείς και εξαιτίας της λιπόφιλης φύσης τους διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη με απλή διάχυση. Στα κύτταρα στόχους, οι στεροειδείς ορμόνες συνδέονται στους υποδοχείς τους που ονομάζονται υποδοχείς στεροειδών ορμονών (Gurta et al, 2013).

Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών (SHRs) ανήκουν στην ευρύτερη υπερκοινογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Πρόκειται για μεταγραφικούς παράγοντες που εντοπίζονται στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα ενώ υπάρχουν και μορφές αυτών που είναι συνδεδεμένοι με την κυτταρική μεμβράνη. Στην ανενεργή τους κατάσταση είναι συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς (chaperones) όπως οι πρωτεΐνες

θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins HSP). Η σύνδεση με τον προσδέτη έχει σαν αποτέλεσμα την αποδέσμευση του υποδοχέα από τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ, οδηγώντας τον σε ομοδιμερισμό και την μεταφορά του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί δεσμεύεται σε ειδικές αλληλουχίες στο DNA γνωστές ως στοιχεία απόκρισης ορμονών (HREs) στις περιοχές του υποκινητή των γονιδίων στόχων και προκαλείται αναδιαμόρφωση της χρωματίνης με τελικό αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων στόχων. Επίσης, είτε μέσω της αλληλεπίδρασής τους με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, είτε μέσω διασταυρούμενης επικοινωνίας τους με άλλα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών μπορούν οδηγήσουν στην ενεργοποίηση πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων και στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (M. Beato et al. 2000, Gupta et al., 2013).

### 1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ

Τα οιστρογόνα διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην ανάπτυξη και διατήρηση της κανονικής σεξουαλικής και αναπαραγωγικής λειτουργίας. Επιπλέον, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες ασκούν μια τεράστια ποικιλία βιολογικών επιδράσεων στο καρδιαγγειακό, μυοσκελετικό, ανοσοποιητικό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Το πιο ισχυρό οιστρογόνο που παράγεται στον οργανισμό είναι 17β –οιστραδιόλη. Η κυτταρική σηματοδότηση των οιστρογόνων διαμεσολαβείται μέσω των υποδοχέων οιστρογόνων (Estrogen Receptors ERs) που υπάρχουν σε δυο κύριες μορφές, τον ERα ή αλλιώς NR3A1 (Nuclear Receptor Subfamily 3, group A, member 1) και τον ERβ ή αλλιώς NR3A2 (Nuclear Receptor Subfamily 3, group A, member 2) που αμφότεροι ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Μελέτες έχουν δείξει πως οι ERs εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό στην ανάπτυξη ή την πρόοδο πολυάριθμων ασθενειών όπως: ο καρκίνος του μαστού, των ωοθηκών, του προστάτη, αρκετές νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οστεοπόρωση αλλά και καρδιαγγειακές παθήσεις (Heldring, et al., 2007).



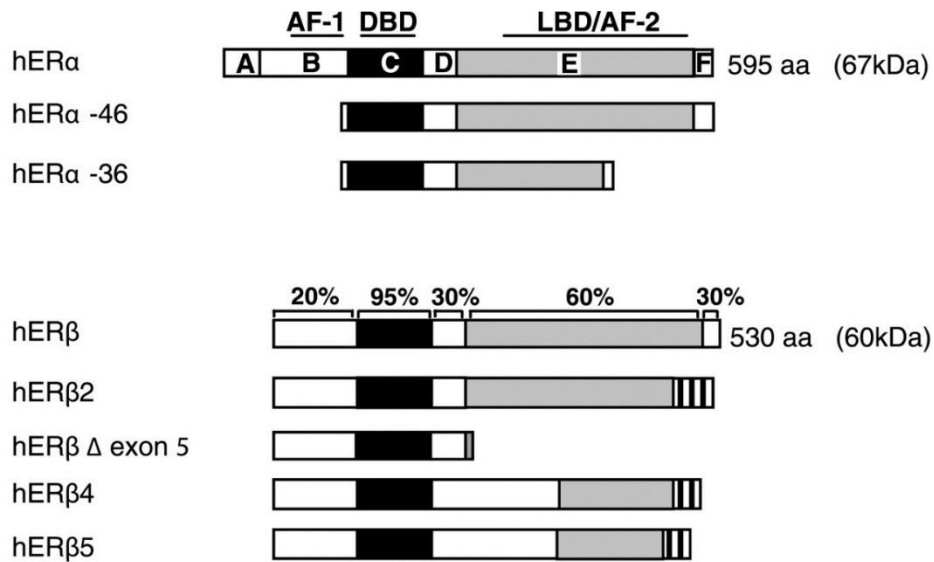
#### Εικόνα 2

Μοριακή δομή του πιο ισχυρού ενδογενούς οιστρογόνου, 17β-οιστραδιόλη (Heldring, et al., 2007).

### 1.3.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΣΟΜΟΡΦΕΣ ΤΩΝ ERs

Οι ERα και ERβ είναι προϊόντα διαφορετικών γονιδίων και συγκεκριμένα των ESR1 και ESR2 αντίστοιχα, ενώ βρίσκονται και σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Πιο αναλυτικά το γονίδιο ESR1 χαρτογραφήθηκε στο γενετικό τόπο 6q25.1 και κωδικοποιεί για τον υποδοχέα ERα, μια πρωτεΐνη 595 αμινοξέων με μοριακό βάρος 67kDa. Το γονίδιο ESR2 εδράζεται στο γενετικό τόπο 14q23.2 και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 530 αμινοξέων με μοριακό βάρος 60 kDa. Παρ' όλο που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια οι υποδοχείς οιστρογόνων παρουσιάζουν εξελικτικά διατηρημένες δομικές και λειτουργικές περιοχές και αμφότεροι αποτελούνται από : μια κεντρική και υψηλά συντηρημένη περιοχή σύνδεσης στο DNA (DBD) η οποία παρουσιάζει 97% ομολογία μεταξύ των υποδοχέων, μια επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (LBD) της οποίας το ποσοστό ομολογίας είναι 60%, δύο περιοχές με δυνατότητα trans-ενεργοποίησης AF-1 (ιδιοστατικά ενεργή) και AF-2 (εξαρτώμενη απ τον προσδέτη) οι οποίες βρίσκονται στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο αντίστοιχα. Καλό είναι να αναφερθεί πως και οι δύο αλληλουχίες AF στρατολογούν μια σειρά από συν-ρυθμιστικές πρωτεΐνες στο συνδεδεμένο με το DNA υποδοχέα. Το αμινοτελικό άκρο δεν είναι συντηρημένο –μόλις 20% ποσοστό ομολογίας-εμφανίζοντας τις περισσότερες διαφορές τόσο σε αλληλουχία όσο και σε μήκος.

Είναι γνωστό ότι παρατηρούνται προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος για τις δυο μορφές των ERs αλλά παραμένει άγνωστο αν αυτά κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες. Τα περισσότερα εναλλακτικά μετάγραφα του ERα διαφέρουν στην 5' UTR και όχι στην κωδική περιοχή. Επιπλέον, έχουν απομονωθεί μικρότερες σε μήκος ισομορφές του ERα, στις οποίες απουσιάζει το εξόνιο 1 και κατ' επέκταση η αμινοτελική AF-1 επικράτεια. Αυτές οι ισομορφές δεν έχουν μέχρι στιγμής ταυτοποιηθεί σε ιστούς, αλλά έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον αγρίου τύπου ERα και να καταστέλλουν τη μεταγραφική ενεργότητα της AF-1 επικράτειάς του (Nina Heldring et al., 2007). Σε αντίθεση με τον ERα, αρκετά εναλλακτικά μετάγραφα του ERβ εκφράζονται σε διάφορους ιστούς. Έχουν περιγραφεί αρκετές εναλλακτικές ισομορφές του υποδοχέα και μερικοί από αυτούς εκφράζονται ως πρωτεΐνες σε ιστούς. Ωστόσο, ο πλήρης χαρακτηρισμός της λειτουργικότητάς τους δεν έχει επιτευχθεί μέχρι στιγμής, αλλά αρκετά πειράματα αποδεικνύουν ότι οι ισομορφές του ERβ μπορούν να ρυθμίσουν τη σηματοδότηση των οιστρογόνων και κατ' επέκταση την έκφραση των γονιδίων στόχων.



**Εικόνα 3**

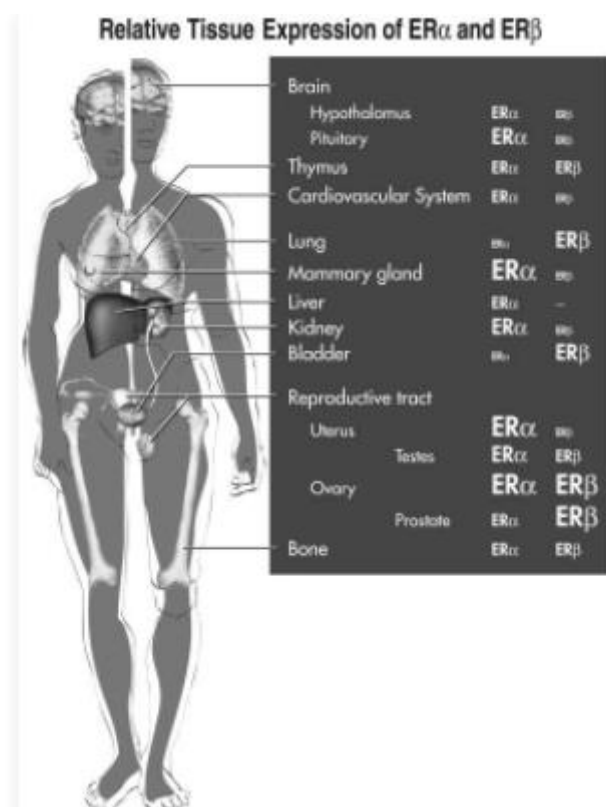
Σχηματική αναπαράσταση των περιγραφόμενων ισομορφών υποδοχέα οιστρογόνου (ER). Στην παραπάνω εικόνα διακρίνονται οι χαρακτηριστικές δομές με τα αντίστοιχα ποσοστά ομολογίας των εκάστοτε επικρατειών μεταξύ των υποδοχέων ERα και ERβ καθώς και τα προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Τα σημεία με τις κάθετες γραμμές στα μετάνγραφα 2, 4 & 5 του ERβ απεικονίζουν τις διαφορές αυτών στο καρβοξυτελικό τους άκρο (Heldring et al., 2007).

### 1.3.2. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ERs ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Οι υποδοχείς οιστρογόνων ERα και ERβ εκφράζονται σε πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του ενδοθηλίου, του επιθηλίου, των μυών, των οστών, των αιματοποιητικών κυττάρων, των νευρικών και των γλοιακών, αν και κάθε υποδοχέας εμφανίζει ένα ξεχωριστό πρότυπο ιστοειδικής κατανομής σε όλο το σώμα. Ο ERα εκφράζεται κυρίως στα όργανα των γονάδων (μήτρα, ωοθήκες, προστάτη, όρχεις και μαστό), αλλά υπάρχει επίσης σε χαμηλότερα επίπεδα σε ιστούς όπως οστά, ήπαρ, νεφρό, λιπώδη ιστό και εγκέφαλο. Ο ERβ παρουσιάζει ένα πιο περιορισμένο μοτίβο έκφρασης και ανιχνεύεται κυρίως στις ωοθήκες, τον προστάτη, τους όρχεις, τον σπλήνα, τον πνεύμονα, τον υποθάλαμο και τον θύμο αδένα. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως στον εγκέφαλο, οι υποδοχείς ERα και ERβ είναι ευρέως κατανεμημένοι και εκφράζονται τόσο σε νευρικούς όσο και σε μη νευρικούς τύπους κυττάρων. Ο ERα είναι ο πιο άφθονος υποτύπος στον υποθάλαμο και την αμυγδαλή, βασικές περιοχές που εμπλέκονται στο νευροενδοκρινικό σύστημα και βοηθά στη ρύθμιση του αυτόνομου νευρικού συστήματος και των συναισθηματικών αντιδράσεων. Τα επίπεδα του ERβ είναι υψηλότερα στον ιππόκαμπο, τον εγκεφαλικό φλοιό και χαμηλότερα στον υποθάλαμο (Jie Cui et al., 2013).

Αυτή λοιπόν η διαφορά στην κατανομή των ERα και ERβ, έχει ως αποτέλεσμα διακριτές βιολογικές λειτουργίες για τους ERs κάτι που ενισχύεται από τους

διαφορετικούς φαινοτύπους που παρατηρούνται σε knockout ποντίκια για τον κάθε έναν από τους δύο ERs ξεχωριστά (Hall et al., 2001). Πιο αναλυτικά, σε knockout ποντίκια για τον ERα, τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά ήταν στείρα, ενώ στα knockout ποντίκια για τον ERβ, η γονιμότητα των θηλυκών ήταν σχετικά μειωμένη, ενώ των αρσενικών φυσιολογική. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν έναν πιο σημαντικό ρόλο του ERα στην ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος απ' ό τι του ERβ (Lee et al., 2012). Τέλος, από μελέτες φαίνεται πως η συνύπαρξη των ERα και ERβ στα κύτταρα ενός ιστού έχει σαν αποτέλεσμα ο ERβ να ανταγωνίζεται την εξαρτώμενη από τον ERα μεταγραφή. Ωστόσο, δεν θα πρέπει να θεωρείται απόλυτο αυτό το φαινόμενο καθώς μπορεί να υπάρξει και συνεργασία μεταξύ των δυο υποδοχέων (Heldring et al., 2007, M. Bottner et al., 2014).



**Εικόνα 4**

Ιστοειδική κατανομή των υποδοχέων οιστρογόνων ERα και ERβ στο ανθρώπινο σώμα (Mueller et al., 2005).

### 1.3.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ERs

Στη σηματοδότηση διαμέσου οιστρογόνων, σύμφωνα με αναδυόμενες ενδείξεις, φαίνεται να συμμετέχουν διάφορα διακριτά μονοπάτια μέσω των οποίων τα οιστρογόνα και οι υποδοχείς τους (ERs) μπορούν να ρυθμίζουν πολλές βιολογικές διεργασίες. Στα μονοπάτια αυτά συγκαταλέγονται: 1) ο κλασικός μηχανισμός ενεργοποίησης των ERs, που εξαρτάται από τον προσδέτη, 2) ο μηχανισμός

ενεργοποίησης των υποδοχέων οιστρογόνων που είναι ανεξάρτητος από τον προσδέτη, 3) η γενωμική δράση των ERs ανεξάρτητα από την παρουσία EREs στους υποκινητές των γονιδίων στόχων, 4) η μη γενωμική δράση των οιστρογόνων.

#### **1.3.4 ΠΡΟΣΔΕΤΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ERs**

Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, απουσία της ορμόνης οι υποδοχείς οιστρογόνου (ERs) βρίσκονται στην ανενεργή τους μορφή συνδεδεμένοι με την πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90 (HSP90). Η Hsp90 ρυθμίζει διάφορες διεργασίες στα ευκαρυωτικά κύτταρα ενώ έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει την αποικοδόμηση των μη δεσμευμένων ERs και να εμποδίζει τους αδραντοποιημένους ERs να δεσμεύονται με τον προσδέτη. Παρουσία της ορμόνης οι ERs φωσφορυλιώνονται, σχηματίζουν ομο ή ετερο-διμερή και μετά μεταφέρονται στον πυρήνα. Εκεί οι ERs ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων μέσω σύνδεσης με τα ειδικά στοιχεία απόκρισης οιστρογόνων στο DNA (EREs). Η δέσμευση των ERs με τα EREs προάγει την κάμψη του DNA, επιτρέποντας έτσι την αλληλεπίδραση με τη μεταγραφική μηχανή και τις συν-ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Αυτές οι συν-ρυθμιστικές πρωτεΐνες περιλαμβάνουν συνενεργοποιητές, συγκαταστολείς, ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών και πολλούς άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Lee et al., 2012). Συνεπώς γίνεται αντιληπτό ότι η απόκριση του οργάνου στόχου στη δράση των οιστρογόνων εξαρτάται αφενός από τους ρυθμιστικούς παράγοντες και αφετέρου από τα χαρακτηριστικά των υποκινητών των γονιδίων που ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα (Heldring et al., 2007).

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

Εκτός από την ενεργοποίηση των ERs με τη μεσολάβηση ορμονών, είναι τώρα ευρέως αποδεκτό ότι η λειτουργία τους μπορεί να ρυθμίζεται από εξωκυτταρικά σήματα απουσία της E2. Αυτά τα ευρήματα επικεντρώνονται πρωτίστως στην ικανότητα πεπτιδίων να έχουν δράση αυξητικών παραγόντων όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1). Σε αυτή την περίπτωση η ενεργοποίηση επέρχεται από κινάσες οι οποίες συμμετέχουν στον καταράκτη αντιδράσεων που ενεργοποιούν οι αυξητικοί παράγοντες. Αυτές με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τους ERs, οι οποίοι ενεργοποιούνται, διμερίζονται και συνδέονται στο DNA (EREs) των γονιδίων που πρόκειται να ρυθμίσουν, χωρίς την παρουσία της E2. Παρ' ολο που ο μηχανισμός έχει περιγραφεί ο βιολογικός ρόλος αυτών των διεργασιών δεν είναι ακόμη σαφής. Είναι πιθανό ότι το ξεχωριστό αυτό μονοπάτι επιτρέπει την ενεργοποίηση των ERs παρουσία χαμηλών επίπεδων E2, όπως συμβαίνει στα αρσενικά. Εναλλακτικά, αυτό το φαινόμενο ίσως να χρησιμεύει ως μηχανισμός ενίσχυσης των μονοπατιών των αυξητικών παραγόντων κι έτσι να εντείνουν τη διαδικασία της μίτωσης σε ιστούς που εκφράζουν ERs (Hall et al., 2001, Heldring et al., 2007).

#### **1.3.6 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ERs**

Οι μηχανισμοί σηματοδότησης των ERs που συζητήθηκαν μέχρι τώρα παρέχουν μια εξήγηση για τη ρύθμιση των γονιδίων τα οποία φέρουν αλληλουχίες EREs στον υποκινητή τους. Ωστόσο, μελέτες αναφέρουν την επαγωγή γονιδίων μέσω του

συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα (E2-ER) στις οποίες δεν ήταν εμφανής καμία αλληλουχία που μοιάζει με EREs. Έτσι, οδηγήθηκαν στην ανακάλυψη ότι μπορεί πράγματι να πραγματοποιηθεί γονιδιακή ρύθμιση απουσία άμεσης σύνδεσης στο DNA. Αυτός ο μηχανισμός αναφέρεται γενικά ως "μεταγραφική διασταυρούμενη επικοινωνία" (transcriptional cross-talk) και περιλαμβάνει αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πιο συγκεκριμένα του υποδοχέα οιστρογόνων ER με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μετά την ενεργοποίηση από τον προσδέτη (Hall et al., 2001). Ο SP-1 είναι ο κυρίαρχος μεσολαβητής της έμμεσης σύνδεσης του ER στο DNA με έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων να επάγεται από την E2 μέσω αυτού του μηχανισμού, συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL). Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες με τους οποίους αλληλεπιδρά ο ER είναι ο CREB (ATF-2/cAMP response element binding protein) για το γονίδιο της κυκλίνης D1 και ο AP-1 (Activation Protein 1), που αποτελείται από διμερή της πρωτεΐνης Jun και από ετεροδιμερή των πρωτεϊνών Jun/Fos (Marino et al., 2006). Τα γονίδια που υπόκεινται σε τέτοια ρύθμιση μπορεί είτε να ενεργοποιούνται, όπως συμβαίνει με το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον IGF-1 (Insulin Like Growth Factor-1) είτε να καταστέλλονται, όπως συμβαίνει με το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ακετυλοτρανσφεράση της χολίνης (Björnström et al., 2005). Για τη μεταγραφική ρύθμιση μέσω αυτού του μονοπατιού φαίνεται να απαιτείται τη συμμετοχή και των δύο επικρατειών AF των ERs, οι οποίες συνεισφέρουν στην προσέλευση 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 (Hall et al., 2001).

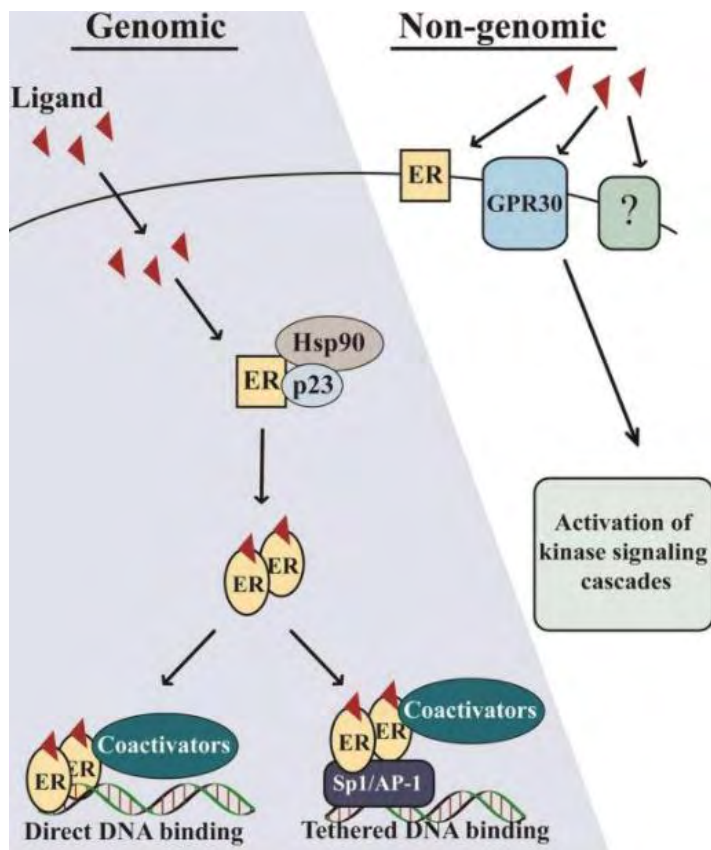
### 1.3.7. ΜΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ERs

Η γενωμική δράση των στεροειδών ορμονών εμφανίζεται μετά από χρονική διάρκεια τουλάχιστον 2 ωρών μετά την διέγερση με E2 και εξηγεί ορισμένες ορμονικές λειτουργίες σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί και ταχείες βιολογικές επιδράσεις της E2 στα οστά, στο μαστό, στο αγγειακό και στο νευρικό σύστημα υποδεικνύοντας ότι τα οιστρογόνα μπορούν επίσης να προκαλέσουν μη γενωμικά αποτελέσματα. Διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης ενεργοποιούνται κατά την δέσμευση E2 στους ERs. Αυτά τα γεγονότα άμεσης απόκρισης μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κύριους καταρράκτες σηματοδότησης: α) Φωσφολιπάση C (PLC)/ Πρωτεϊνική Κινάση C (PKCs), β) το μονοπάτι των Ras/Raf/MAPK, γ) PI3K/AKT και δ) cAMP/ Πρωτεϊνική Κινάση A (PKA) και είναι παρόντα σε πολλά και διαφορετικά μονοπάτια σηματοδότησης (Marino et al., 2006).

Ο προσδέτης ενεργοποιεί έναν υποδοχέα, πιθανώς συνδεδεμένο με την πλασματική μεμβράνη. Είτε πρόκειται για έναν κλασικό ER, για μια ισομορφή του ER, είτε για έναν διακριτό υποδοχέα, ή εναλλακτικά, ένα σήμα ενεργοποιεί έναν κλασικό ER που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Μετά από αυτό το μάλλον ασαφές συμβάν, οι καταρράκτες σηματοδότησης ξεκινούν μέσω δεύτερων αγγελιοφόρων (SM) που επηρεάζουν τους διαύλους ιόντων ή αυξάνουν τα επίπεδα μονοξειδίου του αζώτου



(NO) στο κυτταρόπλασμα και αυτό τελικά οδηγεί σε γρήγορη φυσιολογική απόκριση χωρίς να εμπλέκεται η γονιδιακή ρύθμιση (Hall et al., 2001).



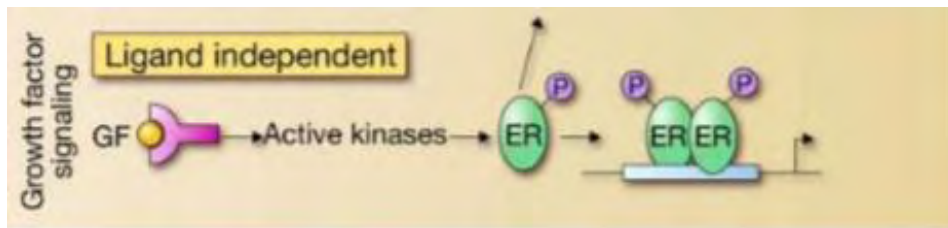
**Εικόνα 5**

Απεικόνιση της γενωμικής και μη γενωμικής δράσης των ERs. Στη γενωμική δράση διακρίνουμε:

A) Κλασικός τρόπος σηματοδότησης προσδετοεξαρτόμενος: Οι ERs συνδέονται με τον προσδέτη τους, διμερίζονται και ενεργοποιούνται, προσδένονται ειδικά στα EREs, στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων.

B) Μηχανισμός σηματοδότησης-ανεξάρτητος από την πρόσδεση στα EREs: Οι υποδοχείς που έχουν ενεργοποιηθεί από τον προσδέτη τους, αλληλεπιδρούν με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Sp1/AP-1), σχηματίζοντας σύμπλοκα που μεσολαβούν στην μεταγραφή γονιδίων, των οποίων οι υποκινητές δεν φέρουν EREs.

Στη μη γενωμική δράση ισχύει ότι οι ERs που εντοπίζονται κοντά ή πάνω στην κυτταρική μεμβράνη μπορούν να προκαλέσουν γρήγορη απόκριση ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια όπως PI3K/Akt και PKC/MAPK και μέσω δευτέρων αγγελιοφόρων (SM) επηρεάζουν κανάλια ιόντων, αυξάνουν τα επίπεδα μονοξειδίου του αζώτου (NO) στο κυτταρόπλασμα και οδηγούν σε ταχεία φυσιολογική απόκριση (Shanle et al., 2011).



**Εικόνα 6**

Απεικόνιση γενωμικής δράσης: Η 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 (Heldring et al., 2007).

#### 1.4 ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ Β (ERβ)

Η ανακάλυψη ενός δεύτερου υποδοχέα οιστρογόνων (ER), που ονομάζεται ERβ (NR3A2) το 1996, έχει επαναπροσδιορίσει τις γνώσεις μας σχετικά με τους μηχανισμούς που διέπουν την κυτταρική σηματοδότηση από τα οιστρογόνα και έχει ευρείες συνέπειες για την κατανόηση της ρύθμισης των ιστών που ανταποκρίνονται σε αυτά. Ο ERβ κωδικοποιείται από το γονίδιο ESR2 το οποίο εδράζεται στο γενετικό τόπο 14q23.2, είναι πια πρωτεΐνη 530 αμινοξέων και έχει μοριακό βάρος ~61.2kDa (Zhao et al., 2008). Ο υποδοχέας παράγεται από 8 εξόνια, ενώ έχουν βρεθεί αρκετές ισομορφές λόγω εναλλακτικού ματίσματος που ενδέχεται να διαφέρουν σε κάποια από τα εξόνια και κατ' επέκταση σε κάποιες λειτουργικές περιοχές (Heldring et al., 2007). Ο ERβ είναι μέλος της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και έχει κοινά δομικά χαρακτηριστικά με τα άλλα μέλη αυτής της οικογένειας, συμπεριλαμβανομένων πέντε διακριτών περιοχών. Επειδή, οι περιοχές αυτές έχουν περιγραφεί και παραπάνω θα εστιάσουμε την προσοχή μας στις διαφορές που παρουσιάζει με τον ERα.

Αρχικά η πρώτη διαφορά εντοπίζεται στη συγγένεια σύνδεσης για τα EREs. Παρ' ολο που ERα και ERβ παρουσιάζουν σχεδόν ταυτόσημες επικράτειες σύνδεσης στο DNA (DBD) παρατηρείται πως ο ERβ έχει μικρότερη συγγένεια σύνδεσης στα EREs. Όταν δεσμεύεται σε διαφορετικές αλληλουχίες EREs, ο ERβ υφίσταται μεταβολές στη διαμόρφωση με αποτέλεσμα να προσελκύει διαφορετικές συν-ρυθμιστικές πρωτεΐνες έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα να εντοπίζονται διαφορές στη μεταγραφική δραστηριότητα μεταξύ των υποδοχέων οιστρογόνων. Μια ενδιαφέρουσα διαφορά μεταξύ των ERα και ERβ παρατηρείται στην λειτουργία της ιδιοστατικά ενεργής AF-1

περιοχής ενεργοποίησης της μεταγραφής. 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 (Deroo et al., 2010). Τέλος, μια ακόμη διαφορά εντοπίζεται στην επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη (LBD). Στον ERβ, η κοιλότητα σύνδεσης του προσδέτη είναι σημαντικά μικρότερη (~ 20%) από εκείνη του ERα εξηγώντας πιθανώς την εκλεκτική συγγένεια των υποδοχέων για τους προσδέτες τους (Zhao et al., 2008).

Ο ERβ έχει παρόμοιο μηχανισμό δράσης με τον ERα, ωστόσο έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με πολλά 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 (Deroo et al., 2010).

## **1.5 ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ERα-ERβ**

Αν και ο ERα είναι ο κυρίαρχος ER που εκφράζεται σε όγκους του μαστού, η πλειονότητα αυτών εκφράζει επίσης και τον ERβ. Επιπλέον, αμφότεροι (ERα-ERβ) εκφράζονται στα οστά. Αυτή η συν-έκφραση προκαλεί το ερώτημα κατά πόσο ο ERβ μεταβάλλει την ERα εξαρτώμενη έκφραση γονιδίων. Γενικά τα επίπεδα του ERβ μειώνονται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης πολλών τύπων όγκων. Αντιθέτως, ο ERα πιστεύεται ότι προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με συνέπεια την ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου. Ο προσδιορισμός των μηχανισμών με τους οποίους ο ERβ μπορεί να λειτουργήσει ως καταστολέας της εξέλιξης του όγκου -που επάγεται από τη δράση του ERα- είναι επί του παρόντος πολύ ενεργός τομέας έρευνας. Από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης έχει παρατηρηθεί ότι ο ERβ ανταγωνίζεται σε δραστικότητα τον ERα, όσο αφορά τη σύνδεσή τους σε υποκινητές που επάγονται από την οιστραδιόλη (E2-responsive promoters).

Πρόσφατες έρευνες έκφρασης όπου χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού και οστεοσαρκώματος, τροποποιημένες ώστε να εκφράζουν έναν ή και τους δύο ERs, καταδεικνύουν ότι ο ERβ μπορεί να ρυθμίσει τη δραστικότητα του ERα. Ο ERα και ο ERβ, επίσης, ρυθμίζουν την έκφραση διαφορετικών ομάδων γονιδίων σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου μαστού. Μελέτες σε κύτταρα MCF-7, τα οποία εκφράζουν ενδογενώς ERα, έδειξαν ότι η έκφραση του ERβ ενισχύει και αναστέλλει τη ρύθμιση που ασκεί ο ERα και απουσία οιστραδιόλης (E2) ο ERβ επίσης ενεργοποιεί ή καταστέλλει την έκφραση γονιδίων, τα οποία ρυθμίζονται από τον ERα παρουσία οιστραδιόλης (E2). Επιπροσθέτως, ο ERβ ρυθμίζει μια μοναδική ομάδα γονιδίων που δεν ρυθμίζονται από τον ERα. Όταν συνεκφράζονται και οι δύο ERs, ο

ERα περιορίζει την κατοχή της περιοχής πρόσδεσης του ERβ, και αντίστροφα (Deroo et al., 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 (Chen et al., 2009). Έκτοτε, ακολούθησαν πολλές μελέτες για τον έλεγχο της μιτοχονδριακής επίδρασης του ERβ.

## 1.6. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Τα μιτοχόνδρια είναι ζωτικής σημασίας οργανίδια, συμμετέχοντας σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Παρέχουν περισσότερο από το 90% των ενεργειακών απαιτήσεων του κυττάρου μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην αναπνευστική αλυσίδα. Τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε πολλά στάδια του μεταβολισμού όπως: η παραγωγή ουρίας, η βιοσύνθεση της αίμης και στην β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, είναι βασικά συστατικά της απόκρισης στο οξειδωτικό στρες, μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, την κυτταρική διαφοροποίηση και τη γήρανση. Οι διαταραχές των μιτοχονδριακών λειτουργιών έχουν συσχετιστεί αιτιολογικά με νευρομυϊκές εκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson, η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση και ο καρκίνος (A. M. Psarra, C. Sekeris, 2008).

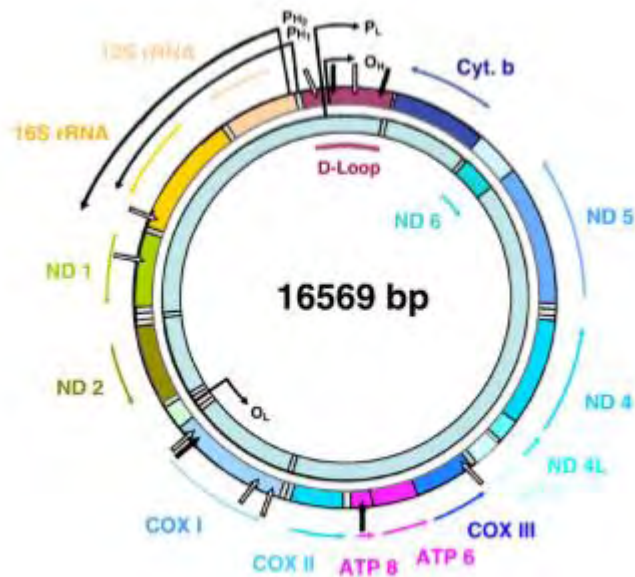
Οι μιτοχονδριακές λειτουργίες εκτελούνται σε συνεννόηση με άλλα κυτταρικά διαμερίσματα και ρυθμίζονται από διάφορα εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά σήματα. Αρκετοί πυρηνικοί υποδοχείς και άλλοι παράγοντες πυρηνικής μεταγραφής, όπως ο NF-κB, AP-1, CREB και p53, που εμπλέκονται σε διεργασίες μεταβολισμού και ανάπτυξης, έχουν ανιχνευθεί στα μιτοχόνδρια. Με την εντόπισή τους στα μιτοχόνδρια εγείρεται το ερώτημα σχετικά με το ρόλο αυτών των ρυθμιστικών μορίων στο «νέο» τους περιβάλλον. Πειραματικά στοιχεία υποστηρίζουν τη δράση αυτών των παραγόντων στη μιτοχονδριακή μεταγραφή, την ενεργειακή απόδοση και την απόπτωση, επεκτείνοντας το γνωστό ρόλο τους εκτός του πυρήνα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μεταγραφικός παράγοντας CREB ο οποίος είναι παρών σε όλους τους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και ασκεί τις δράσεις του μέσω αναγνώρισης ειδικών αλληλουχιών στο DNA (στοιχεία απόκρισης για τον CREB, CREs). Η φωσφορυλίωση του CREB από την εξαρτώμενη από το cAMP πρωτεϊνική κινάση (πρωτεϊνική κινάση A, PKA), καθώς και από κινάσες εξαρτώμενες από  $Ca^{2+}$ , ως απάντηση σε διαφορετικά κυτταρικά σήματα, προάγει τη μεταγραφή των CRE-ρυθμιζόμενων γονιδίων (Domenico De Rasmio et al., 2009). Σύμφωνα με μελέτες, έχει ανιχνευθεί η παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα CREB στο εσωτερικό του μιτοχονδριακού διαμερίσματος, με τη χρήση αντισωμάτων για τη φωσφορυλιωμένη και μη φωσφορυλιωμένη μορφή του (Lee et al., 2005, Ryu et al., 2005). Επιπλέον, έχει δειχθεί πως η σύνδεση του CREB με CRE αλληλουχίες στη D-loop του μιτοχονδριακού DNA, αυξάνει τα επίπεδα μεταγραφής των μιτοχονδριακών γονιδίων ND2, ND5 και ND6 του συμπλέγματος I της αναπνευστικής αλυσίδας (Lee et al., 2005). Ακόμα, διαταραχή της δραστηριότητας CREB στα μιτοχόνδρια

φαίνεται να μειώνει την έκφραση της ND5 υπομονάδας του συμπλέγματος I της αναπνευστικής αλυσίδας και αυξάνει την ευαισθησία στο 3-νιτροπροπιονικό οξύ (3-NP), μια μιτοχονδριακή τοξίνη που επάγει κλινικό και παθολογικό φαινότυπο παρόμοιο με τη νόσο Huntington. Τέλος, από μελέτες σε ποντίκια mtCREB<sup>-/-</sup> βρέθηκε ατροφία σε νευρώνες του ραβδωτού σώματος. Τα δεδομένα αυτά, υποστηρίζουν την υπόθεση για έναν νευροπροστατευτικό ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα CREB (Lee et al., 2005).

Για την πλήρη λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων απαιτείται η συνεργασία τους με άλλα κυτταρικά οργανίδια και κατά κύριο λόγο με τον πυρήνα. Η παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) είναι μια διαδικασία, στην οποία τα απαραίτητα ένζυμα κωδικοποιούνται τόσο από τον πυρήνα όσο και από τα μιτοχόνδρια, με τελικό σκοπό το σχηματισμό ενεργών αναπνευστικών συμπλόκων. Γενικά τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικοί αισθητήρες για τις ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου. Εάν, οι ανάγκες του για ενέργεια δεν είναι μεγάλες, η αναπνευστική αλυσίδα αυξάνει την παραγωγή ATP μέσω αλλοστερικής ενεργοποίησης της OXPHOS από μεταβολίτες, όπως το ADP. Όταν οι απαιτήσεις για ενέργεια είναι υψηλές τότε, το κύτταρο αποκρίνεται μέσω αύξησης της βιοσύνθεσης της OXPHOS, ή σε εξαιρετικές περιπτώσεις μέσω βιογένεσης των μιτοχονδρίων, που περιλαμβάνει την αύξηση της μεταγραφής πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (A. M. Psarra, C. Sekeris, 2008).

Τα μιτοχόνδρια των θηλαστικών διαθέτουν το δικό τους γενετικό σύστημα, το οποίο υφίσταται μοναδικό τρόπο κυτταροπλασματικής κληρονομικότητας. Κάθε οργανίδιο έχει πολλαπλά αντίγραφα ενός δίκλωνου κυκλικού μορίου DNA. Στον άνθρωπο έχει μέγεθος ~16,6 Kb το οποίο κωδικοποιεί mRNAs για 13 βασικές υπομονάδες MRC, 2 rRNAs (12S και 16S) και 22 tRNA που χρειάζονται για τη σύνθεση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών (Chen et al., 2009). Οι δύο κλώνοι του DNA έχουν ασύμμετρη κατανομή των πουρινών και πυριμιδινών, δημιουργώντας μια βαριά (H) και μια ελαφριά (L) αλυσίδα. Η ελαφριά (L) αλυσίδα μεταγράφεται από έναν κυρίαρχο εποκινητή (PL), ενώ η βαριά (H) αλυσίδα μεταγράφεται από δύο γειτονικούς εκκινητές (PH1 και PH2) που εντοπίζονται στην περιοχή ελέγχου που περιλαμβάνει ένα βρόχο μετατόπισης (D-loop). Στο D-loop έχουν βρεθεί 4 θέσεις που θεωρούνται EREs στο μιτοχόνδριο (mtEREs) και μελέτες έχουν δείξει την πρόσδεση ERs και άλλων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών στις θέσεις αυτές (Chen et al, 2009). Η μεταγραφή που ξεκινά από τους υποκινητές PH2 & PL δίνει πολυκιστρονικά μόρια mRNA που έχουν σχεδόν το μήκος ολόκληρου του mtDNA, ενώ από τον PH1 τα μόρια mRNA έχουν πιο μικρό μήκος (A. M. Psarra, C. Sekeris, 2008).



**Εικόνα 7**

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών έχει μέγεθος 16569 bp χωρίς ιντρόνια και έχει τη δυνατότητα να κωδικοποιεί μερικές από τις πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη λειτουργικότητά του. Τα mRNA κωδικοποιούν τρεις υπομονάδες οξειδάσης κυτοχρώματος (I, II και III, COX I, COX II, COX III), επτά από τη ρεδουκτάση NADH του συνενζύμου Q (ND 1-6 και ND4L), ένα από το κυτόχρωμα b (Cyt-b), δύο για τη συνθάση ATP (ATP 6, 8), δύο ριβοσωμικά RNA (12S και 16S rRNA) και 22 tRNAs. Αρκετές νευροεκφυλιστικές ασθένειες, π.χ. Ασθένεια Alzheimer, νόσος Parkinson και της χορείας του Χάντιγκτον, φαίνεται να σχετίζεται αιτιολογικά με μιτοχονδριακά ελαττώματα (A. M. Psarra, C. Sekeris, 2008).

### 1.6.1. ΕΙΣΟΔΟΣ ΕΡΒ ΣΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Η μιτοχονδριακή δραστηριότητα εξαρτάται από την εισαγωγή και τη συναρμολόγηση πρωτεϊνών. Οι περισσότερες μιτοχονδριακές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται πυρηνικά, συντίθενται στο κυτταρόπλασμα (προπρωτεΐνες) και στη συνέχεια κατευθύνονται προς υποδοχείς στην εξωτερική επιφάνεια των μιτοχονδρίων. Η είσοδός τους πραγματοποιείται μέσω μιας αλληλουχίας οδηγού που εντοπίζεται στα 20-50 αμινοξικά κατάλοιπα του αμινοτελικού άκρου των πρωτεϊνών, ενώ έχουν βρεθεί και πρωτεΐνες που φέρουν αυτό το σήμα σε εσωτερικές αλληλουχίες ή πρωτεΐνες χωρίς αυτό το σήμα αναγνωρίζονται μέσω αναγνωριστικών ακολουθιών των Hsps (Simpkins et al, 2008).

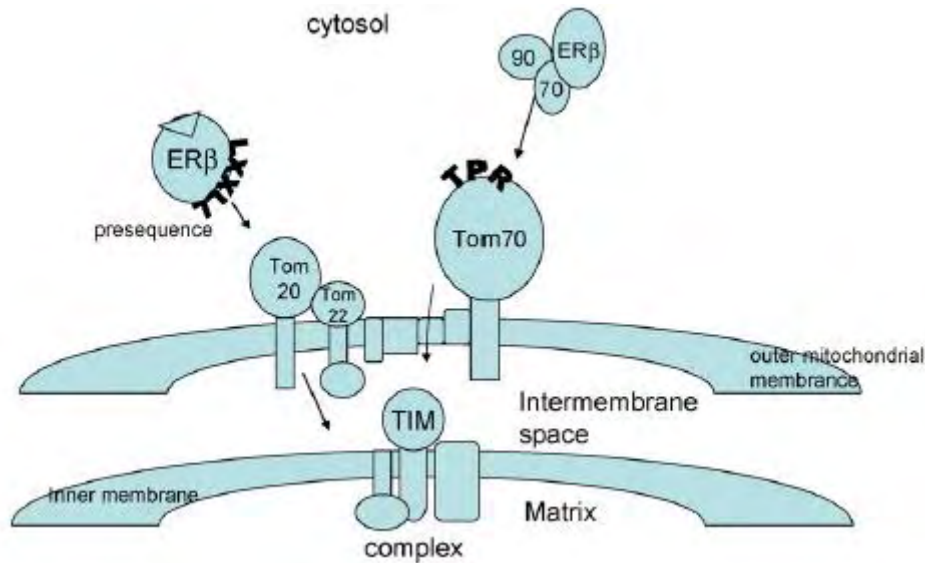
Οι πιο γνωστές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες εισέρχονται μέσω του συμπλόκου της μετατοπάσης (translocase) της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (TOM). Το σύμπλεγμα Tom αναγνωρίζει αλληλουχίες με trans και cis περιοχές σύνδεσης (αλληλουχία οδηγός) και μεταφέρει τις πρωτεΐνες μέσα στο μιτοχόνδριο. Αποτελείται από τουλάχιστον 7 υπομονάδες που περιλαμβάνουν υποδοχείς εισόδου Tom20, Tom70, Tom22, το πρωτεϊνικό κανάλι Tom40 και τη μικρή Tom6-7. Οι Tom20 και Tom70 είναι οι κύριοι υποδοχείς με τα υπόλοιπα μέλη να είναι συστατικά του πόρου της μετατόπισης. Η Tom20 συνδέεται με προ-αλληλουχίες (presequences) προπρωτεϊνών (preproteins), ενώ από την άλλη μεριά η Tom70 συνδέεται σε

εσωτερικές αλληλουχίες μεμβρανικών πρωτεϊνών. Μόλις διασχίσουν την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, οι πρωτεΐνες είτε υφίστανται διαλογή και κατάλληλη αναδίπλωση είτε μεταφέρονται στο σύμπλοκο της τρανσλοκάσης της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, γνωστό ως σύμπλοκο TIM για είσοδο στη μήτρα. Οι υποδοχείς Tom20 και Tom22 φαίνεται να αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο μοτίβο στην αλληλουχία-οδηγό των πρωτεϊνών που είναι ως εξής: φΧΧφφ, όπου φ είναι κάποιο υδρόφοβο αμινοξύ κατά προτίμηση η λευκίνη (L), ενώ Χ είναι ένα οποιοδήποτε αμινοξύ. Από την άλλη μεριά, ο υποδοχέας Tom70 θεωρείται υπεύθυνος για την είσοδο πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο που δεν φέρουν αλληλουχία-οδηγό. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν πρωτεΐνες που κατά την είσοδο και έλευση τους από τις δύο μιτοχονδριακές μεμβράνες πρέπει να αποκτήσουν συγκεκριμένη διαμόρφωση ή ακόμα και να χάσουν την αναδίπλωσή τους, έτσι ώστε να επιτευχθεί η μεταφορά. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μεταφορά αυτών των πρωτεϊνών βρίσκονται συζευγμένες με Hsps όπως η Hsp70 και Hsp90 που βοηθούν στη σωστή αναδίπλωση, στη ρύθμιση της αποικοδόμησής τους, αλλά και στη μεταφορά τους σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Άρα, σε περιπτώσεις τέτοιων πρωτεϊνών, η μεταφορά λαμβάνει χώρα μέσω αλληλεπίδρασης των Hsps οι οποίες μεταφέρουν τις πρωτεΐνες στην Tom70 μέσω συγκεκριμένων τετραπυκτικών επαναλήψεων (tetraatricopeptide repeats TPR).

Σύμφωνα με τα παραπάνω ο ERβ εισέρχεται στο μιτοχόνδριο με τρεις διαφορετικούς τρόπους:

1. Οι Tom20 και Tom22 αλληλεπιδρούν με το χαρακτηριστικό μοτίβο οδηγό στο αμινοτελικό άκρο LXXLL, όπου L η Λευκίνη, όταν συνδεθεί με τον προσδέτη.
2. Η Tom70 αλληλεπιδρά με την Hsp70 μέσω μιας εσωτερικής ακολουθίας, απουσία του προσδέτη.
3. Η Tom70 αλληλεπιδρά με τις Hsp70 και Hsp90 με τις οποίες ο ERβ βρίσκεται σε σύμπλοκο στην ανενεργή του μορφή, μέσω του μοτίβου TPR.

Αφού περάσει λοιπόν, ο ERβ διαμέσου της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, κατευθύνεται στο σύμπλοκο TIM μέσω του οποίου εισέρχεται στη μήτρα του μιτοχονδρίου (Simpkins et al. 2008).



**Εικόνα 8**

Σχηματική αναπαράσταση της εισόδου του ERβ στο μιτοχόνδριο μέσω του συμπλόκου TOM. Το σύμπλοκο αυτό έχει τη δυνατότητα να μεταφέρει πρωτεΐνες στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων μέσω των υποδοχέων Tom20/Tom22 ή μέσω του Tom70. Οι Tom20/Tom22 αναγνωρίζουν το χαρακτηριστικό μοτίβο LXXLL στον ενεργοποιημένο ERβ κι έπειτα τον μεταφέρουν στο σύμπλοκο TIM της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Εναλλακτικά, ο μη ενεργοποιημένος ERβ μεταφέρεται μέσω αλληλεπίδρασης των Hsp70/Hsp90 με τις οποίες βρίσκεται σε σύμπλοκο με τη βοήθεια του μοτίβου TPR του υποδοχέα Tom70. (Simpkins et al, 2008)

### 1.6.2. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ERβ

Όλο και περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι τα μιτοχόνδρια είναι σημαντικοί στόχοι για τις δράσεις των οιστρογόνων. Η μιτοχονδριακή κατανομή του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα έχει ερευνηθεί σε διάφορους τύπους ιστών και κυττάρων συμπεριλαμβανομένης της μήτρας, ωοθήκης, καθώς και σε πρωτεύοντες νευρώνες αρουραίων. Συγκεντρωτικά λοιπόν, αυτές οι μελέτες προτείνουν πως η βήτα ισομορφή του υποδοχέα οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια (mtERβ) μπορεί να επηρεάσει άμεσα τις επιπτώσεις των οιστρογόνων στα συγκεκριμένα οργανίδια (Liao et al, 2015). Μελέτες έχουν δείξει πως ο mtERβ αυξάνει την έκφραση των υπομονάδων I, II και III της οξειδάσης του κυτοχρώματος C, που κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γένωμα, ενώ συμβάλλει στην αύξηση της αναπνευστικής ικανότητας, αύξηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας και παράλληλα αναστέλλει την απόπτωση (A. M. Psarra, C. Sekeris, 2008).

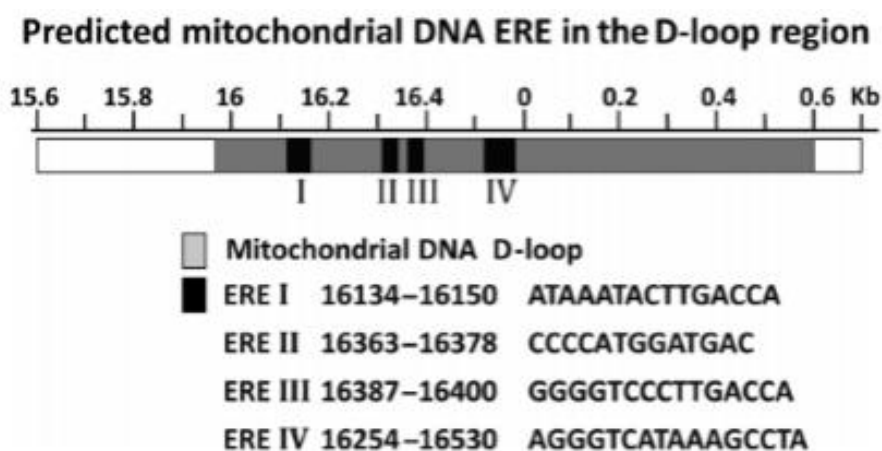
Εκτός από την ικανότητά του να ρυθμίζει την έκφραση μιτοχονδριακών γονιδίων, ο mtERβ έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται σε δραστηριότητες επιβίωσης κυττάρων μέσω αντι-αποπτωτικών διαδικασιών. Η δράση του εντοπίζεται στην αλληλεπίδραση με την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Bad, οπότε αυτή πλέον δεν μπορεί να εμποδίσει τη δράση της αντι-αποπτωτικής Bcl-2. Αποτέλεσμα είναι η καταστολή της Bax και άρα η παρεμπόδιση της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, μπορεί να αλληλεπιδράσει 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), που ενεργοποιούν τη μιτοχονδριακή βιογένεση (Liao et al. 2015).

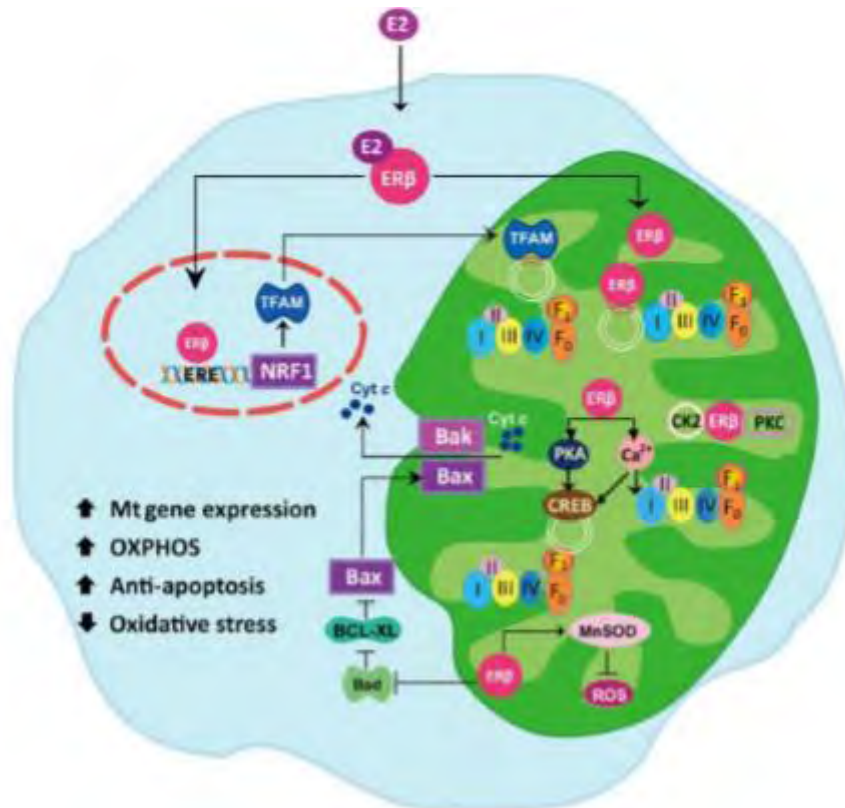
Όσον αφορά το ρόλο του ERβ στο οξειδωτικό στρες, έχει βρεθεί πως ενεργοποιεί τη μιτοχονδριακή μαγγανική δισμουτάση του σουπεροξειδίου (MnSOD), η οποία καταλύει τη διάσπαση των ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου (M. Klinge, 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι από επιστημονικές μελέτες ο ERβ έχει βρεθεί στον εγκέφαλο ποντικού να αλληλεπιδρά με τη μιτοχονδριακή κινάση της καζεΐνης 2 (CK2) καθώς και με την φωσφοκινάση C (PKC), οι οποίες συμβάλλουν τόσο στη βιογένεση της μιτοχονδριακής μετατοπάσης (translocase) της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (TOM) όσο και στη ρύθμιση μιτοχονδριακών καναλιών καλίου που είναι ευαίσθητα στο ATP (Liao et al. 2015).

Τέλος, μια πολύ ενδιαφέρουσα ιδιότητα που παρουσιάζει η βήτα ισομορφή του υποδοχέα οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια είναι η σύνδεσή του σε στοιχεία απόκρισης οιστρογόνων (estrogen response elements, EREs), τα οποία εντοπίζονται στην περιοχή της D-loop του μιτοχονδριακού DNA. Εναλλακτικά, μπορεί να ασκήσει τις δράσεις του μέσω της πρωτεΐνης CREB (cAMP-response element binding protein), η οποία συνδέεται επίσης στην περιοχή της D-loop του μιτοχονδριακού DNA. Οι αλληλεπιδράσεις του ERβ και του μιτοχονδριακού DNA υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα μπορούν να τροποποιήσουν τη μεταγραφή των μιτοχονδριακών γονιδίων καθώς και τα κυτταρικά ενεργειακά επίπεδα. (Liao et al. 2015)



**Εικόνα 9**

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



**Εικόνα 10**

Οι πιθανές επιδράσεις του μιτοχονδριακού ERβ. Ο mtERβ ρυθμίζει τα OXPHOS μέσω άμεσης πρόσδεσης στα mtEREs στη D-loop ή ενεργοποιώντας το ενδομιτοχονδριακό μονοπάτι σηματοδότησης εξαρτώμενο από το ασβέστιο και τη φωσφορυλίωση του CREB ή έμμεσα μέσω δράσης στον πυρήνα όπου επηρεάζει τη μεταγραφή του TFAM. Επίσης παρεμποδίζει τη δράση της Bad οπότε καταστέλλονται οι αλληλεπιδράσεις με την Bcl-XL, οδηγώντας σε αντι-αποπτωτικά αποτελέσματα. Ακόμη, διεγείρει τη δραστικότητα της MnSOD οδηγώντας στη μείωση των ελευθέρων ριζών στο μιτοχόνδριο. (Liao et al, 2015).

### 1.7. ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΒΗΤΑ (ERβ) ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Τα οιστρογόνα έχει αποδειχθεί πως διεγείρουν την οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS), αναστέλλουν την απόπτωση και ασκούν επίδραση στην προαγωγή της ανάπτυξης μέσω της ενεργοποίησης των υποδοχέων τους. Οι υποδοχείς οιστρογόνων ταξινομούνται στον υποδοχέα οιστρογόνων α (ERα) και τον υποδοχέα οιστρογόνων β (ERβ) και εμφανίζουν διαφορετικό μοτίβο έκφρασης στους διάφορους ιστούς. Συνεπώς συμπαιρνόμαστε πως η δράση τους ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τη μορφή του όγκου διαφέρει (Liao et al., 2015).

Ο ERα φαίνεται να είναι το κύριο μόριο 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. Επιπλέον είναι η κυρίαρχη μορφή του υποδοχέα που εμπλέκεται σε καρκίνους του μαστού, καθώς φαίνεται να προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Από την άλλη μεριά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμπλοκή του ERβ σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπου μπορεί να έχει είτε επαγωγική είτε προστατευτική δράση, ανάλογα με τον ιστό που εντοπίζεται ο καρκίνος (B. J. Deroo et al., 2006).

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια και είχαν ως στόχο τη στοχευμένη διάσπαση του ERβ, προτείνουν πιθανούς ρόλους για τη δράση του υποδοχέα σε πολλούς ιστούς και όργανα, συμπεριλαμβανομένων των ωοθηκών, της μήτρας, του μαστικού αδένου, του εγκεφάλου, του ανοσοποιητικού συστήματος και του κοιλιακού προστάτη (Zhao et al., 2008). Πιο αναλυτικά :

### ***Καρκίνος του μαστού***

Τα οιστρογόνα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μαστικών αδένων και έχουν συνδεθεί για αυτό το λόγο με την πρόωξη του καρκίνου του μαστού. Γενικά ο ERβ πιστεύεται ότι έχει προστατευτικό ρόλο κατά της ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού. Το γεγονός αυτό ενισχύεται καθώς ο υποδοχέας δεν εκφράζεται σε μια πλειοψηφία όγκων του μαστού, καθώς ο υποκινητής του είναι μεθυλιωμένος. Δεδομένου ότι η μεθυλίωση υποκινητών παρατηρείται συχνά στον καρκίνο, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι ο ERβ είναι ένα πιθανό ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Ωστόσο, η παραπάνω παρατήρηση δεν είναι ευρέως αποδεκτή, καθώς άλλες μελέτες δείχνουν πως ο ERβ προωθεί την ανάπτυξη στον καρκίνο του μαστού καθώς τα επίπεδα έκφρασής του είναι παρόμοια με αυτά του ERα (Zhao et al., 2008). Επομένως γίνεται αντιληπτό πως απαιτούνται περισσότερα πειράματα προκειμένου να διευκρινιστεί ο ακριβής ρόλος του ERβ στη συγκεκριμένη περίπτωση καρκίνου.

### ***Καρκίνος του προστάτη***

Τα οιστρογόνα συμμετέχουν στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση του προστάτη καθώς και στην παθογένεση του καρκίνου σε αυτόν. Σύμφωνα με μελέτες σε ποντίκια χωρίς τον υποδοχέα οιστρογόνων β (βERKO mice), εμφανίζουν σημάδια υπερπλασίας του προστάτη με τη γήρανση. Από την ίδια μελέτη βρέθηκε ότι τα περισσότερα επιθηλιακά κύτταρα εκφράζουν το αντιγόνο πολλαπλασιασμού Kί-67 και τον αντιαποπτωτικό παράγοντα BCL-II στους προστάτες από ποντικούς βERKO. Επομένως κατέληξαν στο συμπέρασμα πως ο ERβ έχει αντιπολλαπλασιαστικό ρόλο (Zhao et al., 2008).

### ***Καρκίνος του παχέος εντέρου***

Ο ERβ είναι ο κυρίαρχος υποδοχέας στο επιθήλιο του παχέος εντέρου, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι επιδράσεις των οιστρογόνων διαμεσολαβούνται από αυτόν. Από μελέτες φαίνεται να εμφανίζεται σε χαμηλότερα επίπεδα κάτι που οδηγεί στην υπόθεση ότι ίσως να έχει προστατευτική δράση στην καρκινογένεση του συγκεκριμένου ιστού. Η άποψη αυτή ενισχύεται και από πειράματα σε βERKO ποντικούς, όπου στο παχύ έντερο τους, ο ρυθμός με τον οποίο τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται είναι πολύ μεγαλύτερος σε σύγκριση με τον ρυθμό που πολλαπλασιάζονται αυτά στους ποντικούς αγρίου τύπου (Zhao et al., 2008).

## **Καρκίνος των ωοθηκών**

Ο καρκίνος των ωοθηκών είναι μια ασθένεια με υψηλή θνησιμότητα, κυρίως λόγω της έλλειψης αποτελεσματικών μεθόδων έγκαιρης διάγνωσης και των καθυστερημένων συμπτωμάτων που εμφανίζουν οι ασθενείς. Πολλές αναφορές κάνουν λόγο για απώλεια της έκφρασης του ERβ σε επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς. Επιπλέον, πρόσφατα μια άλλη έρευνα έδειξε ότι η υπερέκφραση του ERβ στα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών ασκεί αντικαρκινικές επιδράσεις.

Καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως τα αποτελέσματα για τη δράση του ERβ είναι ακόμη διφορούμενα και διαφοροποιούνται από ιστό σε ιστό. Είναι πιθανόν ο ERβ να ασκεί την καρκινογενετική του δράση επεμβαίνοντας στη μιτοχονδριακή λειτουργία προκειμένου να επιτευχθεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η επιβίωση (Liao et al., 2015).

### **1.8. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ**

Τα οιστρογόνα είναι στεροειδείς ορμόνες που διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Ωστόσο, συμμετέχουν και σε άλλα συστήματα, συμπεριλαμβανομένου του περιφερικού και κεντρικού νευρικού συστήματος. Τα οιστρογόνα ασκούν τις δράσεις τους μέσω των ERα και ERβ. Έρευνα που βασίστηκε σε θεραπεία με οιστρογόνα σε νεογνούς αρουραίους απέδειξε, πως έχουν την ικανότητα αυξάνουν το σχηματισμό συνάψεων (Heldring et al., 2007).

Οι επιδράσεις των οιστρογόνων στην ανάπτυξη των νευρώνων διαμεσολαβούνται μέσω της ρύθμισης των ενδογενών νευροτροφικών παραγόντων. Πιο αναλυτικά, τα οιστρογόνα ρυθμίζουν: τον νευρικό αυξητικό παράγοντα (NGF) και τους υποδοχείς του σε χολινεργικούς νευρώνες, τον TGF-β στον υποθάλαμο, υποδοχείς NGF στους αισθητήριους νευρώνες και τέλος τον ινσουλινομορφο αυξητικό παράγοντα και τον υποδοχέα του στον υποθάλαμο (Heldring et al., 2007). Αμφότεροι οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERα-ERβ) εμφανίζουν νευροπροστατευτική δράση σε νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η νόσος του Alzheimer (AD) και του Parkinson (PD) (Simpkins et al. 2008).

Προτάσεις για πιθανούς μηχανισμούς μέσω των οποίων τα οιστρογόνα θα μπορούσαν να ασκήσουν θετικές επιδράσεις στον εγκέφαλο, περιλαμβάνουν την πρόληψη σχηματισμού πλακών β-αμυλοειδούς και τη ρύθμιση της απόπτωσης. Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν δείξει πως τα οιστρογόνα μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 σε νευρώνες του ιππόκαμπου και του φλοιού (Heldring et al., 2007).

Ένας ακόμη πιθανός μηχανισμός μέσω των οποίων τα οιστρογόνα φαίνεται να δρουν νευροπροστατευτικά είναι η ενεργοποίηση του MAPK/PI3/PKB. Έχει αποδειχτεί ότι οι υποδοχείς οιστρογόνων, ενεργοποιημένοι από την οιστραδιόλη, θέτουν σε λειτουργία το μονοπάτι MAPK/PI3-K/Akt και έτσι προστατεύουν τους νευρώνες του ιππόκαμπου από την γλουταμινεργική υπερενεργοποίηση, ένα φαινόμενο γνωστό ως διεγερόμενη τοξικότητα, το οποίο οδηγεί σε υψηλό φορτίο ασβεστίου εντός των νευρώνων, και εν συνεχεία σε απόπτωση. Τέλος 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 (Chen et al., 2009).

Όπως ήταν λογικό, υπήρξε άμεσο ενδιαφέρον και πραγματοποιήθηκαν πειράματα πειράματα για τον έλεγχο της εμπλοκής των ERs στην νευροπροστατευτική δράση των οιστρογόνων. Στοιχεία που υποστηρίζουν μια νευροπροστατευτική δράση για τον ERα, τα οποία έχουν προέλθει από πειράματα σε knock-out ποντίκια για τον συγκεκριμένο υποδοχέα (ERα), αποδεικνύουν ότι η δράση των οιστρογόνων χάνεται στα ποντίκια που έχουν υποστεί ωθηκτομή. Σε αντίθεση, σε knock-out ποντίκια για τον ERβ που είχαν αφαιρεθεί οι ωθήκες, η νευροπροστατευτική δράση των οιστρογόνων δεν φαινόταν διαφορετική σε σχέση με τα αγρίου τύπου ποντίκια που είχαν αφαιρεθεί οι ωθήκες. Έτσι, υποδηλώνεται ένας από τους προστατευτικούς μηχανισμούς των οιστρογόνων στον εγκέφαλο ο οποίος περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ERα (Chen et al., 2009).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Όλο και περισσότερες έρευνες τα τελευταία χρόνια αποδεικνύουν την μετακίνηση του υποδοχέα οιστρογόνων β (ERβ) στα μιτοχόνδρια τύπων κυττάρων, υποδεικνύοντας έναν πιθανό ρυθμιστικό του ρόλο στη λειτουργία του συγκεκριμένου υποκυτταρικού οργανιδίου, όσον αφορά την παραγωγή ενέργειας, την έκφραση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, τη βιογένεσή του καθώς και την εμπλοκή του σε άλλες μιτοχονδριακές λειτουργίες.

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η κατανόηση του μηχανισμού ρύθμισης της μιτοχονδριακής μεταγραφής από τον μιτοχονδριακό υποδοχέα ERβ και ειδικότερα η διερεύνηση της δυνατότητας σύνδεσης του ERβ, τόσο σε στοιχεία απόκρισης ορμονών (EREs) του μιτοχονδριακού DNA, όσο και η δυνατότητα άμεσης ή έμμεσης αλληλεπίδρασης του με τα στοιχεία CRE, στοχεύοντας στη διερεύνηση της πιθανής αλληλεπίδρασης-συνομιλίας του μιτοχονδριακού ERβ με τον μεταγραφικό παράγοντα CREB στο μιτοχονδριακό περιβάλλον, αποσκοπώντας στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου, κατασκευάστηκαν από το συνάδελφο Βύρωνα Γοργογιέτα στα πλαίσια της διδακτορικής του διατριβής, σταθερά διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές Neuro-2a (N2a), που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα οιστρογόνων βήτα με μιτοχονδριακή στόχευση. Η εισαγωγή του στα κύτταρα έγινε σε χιμαιρικό αναγνώστικο πλαίσιο με το γονίδιο αναφοράς GFP, για τον ευκολότερο εντοπισμό του, ενώ κατασκευάστηκαν και κύτταρα control (μάρτυρες), που υπερεκφράζουν μόνιμα το γονίδιο GFP με μιτοχονδριακή στόχευση. Αφού πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια και συλλογή του επιθυμητού αριθμού κυττάρων ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) με εξειδικευμένα αντισώματα έναντι του ERβ και της πρωτεΐνης GFP. Μετά την απομόμωση του συμπλόκου ERβ-αλληλεπιδρώντων μορίων διερευνήθηκε η πιθανή σύνδεση του ERβ σε μιτοχονδριακά EREs που εντοπίζονται στην περιοχή D-loop, και στα γονίδια COX1, 12s rRNA, καθώς και σε CRE αλληλουχίες της D-loop περιοχής του μιτοχονδριακού DNA, με την εφαρμογή της τεχνικής Real Time PCR (qPCR) και τη χρήση ειδικών εκκινήτων.

### **3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

#### **3.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ**

##### A. Στο χώρο των κυτταροκαλλιεργειών:

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

##### B. Στον εργαστηριακό χώρο:

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

#### **3.2 ΥΛΙΚΑ**

##### **3.2.1. ΧΗΜΙΚΑ**

##### ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΣ

- Αιθανόλη (Sigma).
- Βιοαιθανόλη (Kalochen).
- Πενικιλίνη-Στρεπταμυκίνη (Gibco).

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

### PCR

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

### ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

- Γλυκερόλη (AppliChem).
- Φορμαλδεΐδη (Punreac).
- Beads.
- DTT (Sigma).
- EDTA (Sigma).
- Glycine
- LiCl
- NaCl (Sigma).
- NaHCO<sub>3</sub>
- Na-deoxycholate (Sigma).
- NP-40 (Fluka).
- PBSx1 (Gibco).
- PMSF (AppliChem).
- Protease Inhibitors (Roche).
- SDS (Sigma).
- Tris (Serva).
- Triton X-100 (AppliChem).

### ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

- Αιθανόλη (Sigma).
- Chloroform (Sigma).
- EDTA (Sigma).
- Glycogen
- NaCl (Sigma).
- Protease K (Sigma).
- Phenol:chloroform:isoamylalcohol 25:24:1

- RNase A (Sigma).
- Tris (Serva).

### 3.2.2. 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.

### 3.2.3. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- **DTT 1M**

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

- **PMSF 200 mM**

Για τελικό όγκο 2 ml, διαλύονται 0,07 g PMSF 200 mM σε ισοπροπανόλη. Δημιουργία aliquots των 200 μl και φύλαξη στους – 20°C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης νουκλεοτιδίων (TAE) 50x**

Για τελικό όγκο 1L, διαλύουμε 242,2 g 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 τον επιθυμητό όγκο. Από αυτό μπορούν να προκύψουν διαλύματα με μικρότερη συγκέντρωση με την κατάλληλη αραίωση.

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

Για τελικό όγκο 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 (RT).

- **Loading Buffer**

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

- **SDS-Lysis Buffer**

Για τελικό όγκο 10 ml, προσθέτουμε: 100μl 10% SDS, 200μl EDTA 0,5M και 500μl Tris-HCl 1M, pH=8.0. Συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τα 10ml.

- **ChIP dilution Buffer**

Για τελικό όγκο 50ml, προσθέτουμε 500μl Triton X-100, 200μl EDTA 0,5M 1,5ml NaCl 5M και 1 ml Tris-HCl 1M, pH=8.0. Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O.



- **Low Salt Wash Buffer**

Για τελικό όγκο 25ml, προσθέτουμε: 25μl 10% SDS, 250μl Triton X-100, 100μl EDTA 0,5M, 500μl Tris-HCl 1M, pH=8.0 και 750μl από NaCl 5M. Συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O μέχρι τον τελικό όγκο.

- **High Salt Wash Buffer**

Σε τελικό όγκο 25ml, προσθέτουμε: 25μl 10%SDS, 250μl Triton X-100, 100μl 0,5M EDTA, 500μl Tris-HCl 1M, pH=8.0 και 2,5ml NaCl 5M. Στα 25ml τελικό όγκο φτάνουμε αφού συμπληρώσουμε με ddH<sub>2</sub>O.

- **LiCl Salt Wash Buffer**

Για τελικό όγκο 25ml, ζυγίζουμε 0,265g LiCl 0.25M, 0,25g 1% Na-deoxycholate και προσθέτουμε: 25μl NP-40, 50μl EDTA 0,5M και 250μl Tris-HCl 1M, pH=8.0. Τέλος συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O έως τον επιθυμητό όγκο.

- **TE Buffer**

Για τελικό όγκο 50ml, προσθέτουμε: 100μl EDTA 0,5M και 500μl Tris-HCl 1M, pH=8.0. Ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O.

- **Elution Buffer**

Για τελικό όγκο 10ml, προσθέτουμε: 100μl 10% SDS και ζυγίζουμε 0,084g NaHCO<sub>3</sub>. Συμπληρώνουμε με ddH<sub>2</sub>O τον υπόλοιπο όγκο.

### 3.2.4. ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Για ανοσοκατακρήμνιση:

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

### 3.2.5 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Σωληνάρια για φύλαξη κυττάρων σε βαθιά κατάψυξη (cryovials ή cryotubes) (Sarstedt).
- Φλάσκες για καλλιέργεια κυττάρων, επιφάνειας 25 cm<sup>2</sup> και 75 cm<sup>2</sup> (Sarstedt).
- Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι (falcons) των 15 ml και 50 ml (Sarstedt).
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorfs των 1.5 ml και 2.0 ml (Sarstedt).
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur (Kimble).
- Σιφώνια Serological Pipette των 2, 5, 10 & 25 ml (Sarstedt).
- Ρύγχοι-tips (0.2-10 μL, 20-200 μl και 100-1000 μl) (Sarstedt).
- Τρυβλία καλλιέργειας 150×20 mm.

### 3.3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Για τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν νευρικές κυτταρικές σειρές N2a (Neuro-2a) 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.

Όσον αφορά την κυτταρική σειρά Neuro-2a αυτή προέρχεται από τον οργανισμό *Mus musculus*, κοινώς το ποντίκι. Είναι νευροβλαστωματικά κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται παρουσία πλήρους θρεπτικού μέσου DMED 1g/L Glucose και χαρακτηρίζονται από αργό ρυθμό ανάπτυξης. Επιπλέον, εμφανίζουν τις εξής ιδιαιτερότητες:

- 1) Το μέγιστο ποσοστό που μπορούν να καλύψουν στην επιφάνεια της φλάσκας όπου αναπτύσσονται είναι περίπου 70%. Από αυτό το ποσοστό και πάνω τα κύτταρα έχουν την τάση να αποκολλώνται από την επιφάνεια προσκόλλησης και να επιπλέουν στο θρεπτικό μέσο, χωρίς να είναι νεκρά.
- 2) Αποκολλώνται με χαρακτηριστική ευκολία από την επιφάνεια καλλιέργειας δυσκολεύοντας τους χειρισμούς. Για το λόγο αυτό απαιτείται μεγάλη προσοχή και προπαντός απαλές κινήσεις έτσι ώστε να μην αναταράσσονται.

### 3.4. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

#### 3.4.1. ΞΕΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι κυτταρικές σειρές του εργαστηρίου μας είναι αποθηκευμένες σε βαθιά κατάψυξη είτε σε υγρό άζωτο όπου η θερμοκρασία είναι -120°C είτε σε θερμοκρασία -80°C. Η διαδικασία που ακολουθείται για το ξεπάγωμα των κυττάρων είναι κοινή και για τις δύο θερμοκρασίες φύλαξης.

Είναι σημαντικό να τονίσουμε πως πριν την έναρξη της διαδικασίας καλό είναι να έχουμε ετοιμάσει όλα όσα θα χρειαστούμε προκειμένου μόλις ξεπαγώσει το cryovial τα κύτταρα να τοποθετηθούν άμεσα στο θρεπτικό και να μείνουν όσο το δυνατόν λιγότερο σε επαφή με το τοξικό για αυτά DMSO. Το DMSO εμπεριέχεται στο cryovial κατά τη διαδικασία του παγώματος των κυττάρων. 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 διεργασία.

Αναλυτικότερα, αφού έχουμε ξεπαγώσει, βγάλει, και τοποθετήσει στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής (laminar flow hood) όλα τα θρεπτικά, τοποθετούμε -μια μικρή ποσότητα- 4 ml θρεπτικού υλικού DMEM 1g/L Glucose σε δοκιμαστικό σωλήνα falcon των 15ml, τον οποίο έχουμε από πριν τοποθετήσει στο hood με μερικώς

ανοιχτό το καπάκι. Επιπλέον, βγάζουμε μία νέα φλάσκα καλλιέργειας, ανοίγουμε ελαφρώς το καπάκι και την τοποθετούμε κάθετα στο hood. Στη συνέχεια εξάγεται το επιθυμητό cryovial από την κατάψυξη και τοποθετείται εντός του υδατόλουτρου. Τονίζεται πως οτιδήποτε εισέρχεται στο hood ψεκάζεται προσεκτικά με αιθανόλη 70% για να αποφευχθεί η περίπτωση μόλυνσης. Δεν αφήνουμε το cryovial μέσα στο υδατόλουτρο, αλλά το κρατάμε προσεκτικά χωρίς το νερό να έρχεται σε επαφή με το καπάκι.

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, εισέρχεται στο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής. Εκεί, τοποθετούμε άμεσα το vial σε στατώ και ανοίγουμε γρήγορα και κάθετα το καπάκι του, προσέχοντας να μην έρθει σε επαφή η αιθανόλη με τα κύτταρα. Κατόπιν με σιφώνιο των 2ml παίρνουμε το περιεχόμενο και το τοποθετούμε στον δοκιμαστικό σωλήνα με τα 4ml θρεπτικού. Το 15άρι falcon με το θρεπτικό και τα κύτταρα φυγοκεντρείται για 5 min σε 1000rpm και σε θερμοκρασία από 20°C και άνω (20-25°C). Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρησης γράφουμε τα στοιχεία των κυττάρων στη φλάσκα (όνομα κυτταρικής σειράς, ημερομηνία παγώματος και ξεπαγώματος, passage).

Μόλις ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απομακρύνεται με γυάλινη πιπέτα Pasteur και κατόπιν το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται καλά, σε 5ml θρεπτικού μέσου, DMEM 1g/L Glucose (low Glucose). Τέλος, το επαναδιαλυτοποιημένο περιεχόμενο λαμβάνεται με πιπέτα των 5 ή των 10ml και τοποθετείται στη φλάσκα. Εκεί, πραγματοποιείται ξανά ήπια επαναδιαλυτοποίηση και κλείνοντας τη φλάσκα, βγάζουμε οριζόντια από το hood, την τοποθετούμε στο μικροσκόπιο και εξετάζουμε τη μορφή των κυττάρων που μόλις ξεπαγώσαμε. Φυσιολογικά, τα νευρικά κύτταρα, πρέπει να είναι επιπλέοντα, πολλά, σχετικά μεγάλα, στρογγυλά, διαπερατά από το φως και χωρίς συσσωματώματα. Εφόσον η μορφολογία τους είναι η επιθυμητή, τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες 37°C και 5.0% CO<sub>2</sub> οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξή τους.

### **3.4.2. ΘΡΥΨΙΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Η θρυψινοποίηση είναι μια διαδικασία η οποία χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις κορεσμού (κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας κατά 80-90%), σε περιπτώσεις πολλών και μεγάλων συσσωματωμάτων (είναι ανεπιθύμητα) αλλά και πριν από τους περισσότερους χειρισμούς που απαιτείται η χρήση ή η μεταφορά κυττάρων. Η κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα πέρασμα γνωστό και ως passage. Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης λοιπόν, εκμεταλλευόμαστε την ικανότητα της θρυψίνης, ενός πρωτεολυτικού ενζύμου, να διασπά τις πεπτιδικές αλυσίδες κυρίως στο καρβοξυλικό άκρο των αμινοξέων λυσίνη ή αργινίνη των πρωτεϊνών που συγκρατούν τα κύτταρα της καλλιέργειας σε συνοχή μεταξύ τους αλλά και προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας.

Αρχικά, πραγματοποιείται ξεπάγωμα της θρυψίνης και του θρεπτικού υλικού στο υδατόλουτρο στους 37°C. Απομακρύνεται 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 γενικά ισχύει ότι 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) και παρατηρούμε στο μικροσκόπιο. Μετά τη θρυψινοποίηση, τα κύτταρα χάνουν τη χαρακτηριστική μορφολογία τους κι εμφανίζονται στρογγυλά. Ιδανικό είναι όλα τα κύτταρα, μεμονωμένα ή σε συσσωματώματα, να επιπλέουν. Σε περίπτωση που 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. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να προσέξουμε τον χρόνο έκθεσης των κυττάρων στη θρυψίνη, γιατί η παρατεταμένη πρωτεόλυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροτοξική δράση.

Εφόσον έχουμε την εικόνα που επιθυμούμε τότε, τοποθετούμε τη φλάσκα σε όρθια θέση στο hood με σκοπό να τερματιστεί η δράση της θρυψίνης. Για να πραγματοποιηθεί αυτό χρησιμοποιούμε τον τετραπλάσιο όγκο θρεπτικού από τον όγκο της θρυψίνης που χρησιμοποιήσαμε αρχικά. Έπειτα, όλο το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε falcon των 15ml και φυγοκεντρείται για 5min σε 1000rpm, με θερμοκρασία μεταξύ 20-25 °C. Αφού ολοκληρωθεί η φυγοκέντρηση, πραγματοποιείται απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται περαιτέρω ή επανατοποθετούνται στη φλάσκα ανάπτυξης, η οποία συμπληρώνεται μέχρι τα 5ml για T-25 και μέχρι τα 15ml για T-75 με θρεπτικό υλικό DMEM 1g/L Glucose.

### **3.4.3. ΠΑΓΩΜΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για την αποθήκευση κυττάρων για μελλοντικές μελέτες και νέα πειράματα. Επιπλέον, εξασφαλίζουμε ότι έχουμε αποθέματα καθαρών κυτταρικών σειρών ακόμα και αν συμβεί κάποιο ατύχημα ή μόλυνση. Η μόλυνση των κυττάρων, με χειρότερο εχθρό τους το μυκόπλασμα, μπορεί να συμβεί ακόμα και στα πιο καλά οργανωμένα εργαστήρια, ανεξάρτητα από τα μέτρα προστασίας ή την προσοχή του χειριστή. Έτσι αποφεύγουμε την αγορά νέας κυτταρικής σειράς η οποία κοστίζει αρκετά. Ακόμη καλό είναι να προσθέσουμε πως το πάγωμα είναι προτιμότερο να πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν το μέγιστο ρυθμό ανάπτυξής τους ή όταν καλύπτουν όλη την επιφάνεια της φλάσκας.

Τα κύτταρα στην κρυοσυντήρηση αποθηκεύονται σε ειδικά φιαλίδια γνωστά και ως cryovials συνολική χωρητικότητα 1 ml. Το διάλυμα που χρησιμοποιείται κατά το πάγωμα περιέχει FBS, αντί για πλήρες θρεπτικό. Το FBS μάλιστα αποτελεί το 90% του cryovial με το υπόλοιπο 10% να αποτελείται από DMSO. Το DMSO χρησιμοποιείται για την μείωση του σημείου πήξεως του μέσου, μειώνοντας σημαντικά το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου που μπορούν να οδηγήσουν σε 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 καθώς περιέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για τα κύτταρα.

Η διαδικασία του παγώματος ξεκινά με 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 ωστόσο αυτό εξαρτάται και 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 απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 2 ml FBS. Για το πάγωμα χρειαζόμαστε 0,9 ml FBS για κάθε φιαλίδιο. Τα εναπομείναντα 0,2 ml επιστρέφονται στη φλάσκα για ανακαλλιέργεια, όπου και συμπληρώνουμε με τον αντίστοιχο όγκο θρεπτικού ανάλογα με τη φλάσκα. Σημειώνουμε passage και η φλάσκα επιστρέφεται στον επωαστικό κλίβανο. Το επόμενο βήμα του παγώματος πρέπει να γίνει πολύ γρήγορα και προσεκτικά, λόγω της κυτταροτοξικότητας του DMSO. Προσθέτουμε λοιπόν 0,1 ml DMSO σε κάθε vial, χωρίς καθυστερήσεις και με συνεχόμενη ανάδευση, τα φιαλίδια αποθηκεύονται στην κατάψυξη.

#### **3.4.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ PLATES 150x20 mm**

Προκειμένου να γίνει συλλογή ενός ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων για την εκτέλεση του πειράματος, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των κυττάρων N2a mtGFP και N2a mtGFPERβ σε τρυβλία διαστάσεων 150x20mm. Κάθε φορά που τα κύτταρα κάλυπταν το 70-75 % της επιφάνειας στη φλάσκα T-75 πραγματοποιούσαμε θρυψινοποίηση με 2 ml θρυψίνης και σταματούσαμε την διαδικασία με 8 ml θρεπτικό DMEM 1g/mol Glucose. Στη συνέχεια, μέσα στη συσκευή καθέτου νηματικής ροής μεταφέραμε σε δύο plates (150x20mm) 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.

#### **3.4.5. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Εφόσον τα κύτταρα καλύψουν το 80% της επιφάνειας στα plates τότε πραγματοποιείται η συλλογή τους καθώς αν μείνουν παραπάνω ενδέχεται να αποκολληθούν από την επιφάνεια καλλιέργειας. Κατά τη διαδικασία της συλλογής των κυττάρων προσθέτουμε 200μl φορμαλδεΐδη σε κάθε ένα plate και για 10 λεπτά πραγματοποιείται επώαση σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C. Η φορμαλδεΐδη χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1% για την ομοιοπολική σύνδεση των πρωτεϊνών στις φυσικές τους θέσεις στο DNA (crosslink). Μετέπειτα αυτή η ιδιότητα που προσδίδει η φορμαλδεΐδη θα μας φανεί ιδιαίτερα χρήσιμη καθώς θα έχουμε στην κατοχή μας όσο το δυνατόν γίνεται καθαρότερο DNA. Αφού περάσουν 10 λεπτά τότε απομακρύνεται πολύ προσεκτικά το θρεπτικό με τη φορμαλδεΐδη και προσθέτουμε γλυκίνη διαλυμένη σε PBSx1 με τελικό όγκο 10ml. Η γλυκίνη προστίθεται σε τελική συγκέντρωση 125mM και έχει την ικανότητα να σταματάει τη σύνδεση των πρωτεϊνών στη φυσική τους θέση στο DNA (crosslink). Μόλις γίνει η προσθήκη της πραγματοποιείται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5 λεπτά. Μετά το πέρας και αυτής της επώασης απομακρύνεται πάρα πολύ προσεκτικά η γλυκίνη και πραγματοποιείται η συλλογή των κυττάρων με κρύο PBSx1. Γίνεται μια πλύση με το PBSx1 και με τη βοήθεια μιας ράβδου με πλαστική εύκαμπτη επιφάνεια στην άκρη (scraper) τα κύτταρα συλλέγονται σε falcon των 15ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 4 λεπτά σε 2000rpm και στους 4°C. Αφαιρείται το υπερκείμενο (PBSx1) όσο το δυνατόν καλύτερα γίνεται και το ίζημα (κύτταρα μας) αποθηκεύεται με το falcon στους -80°C. Σε καμία περίπτωση δεν αποθηκεύουμε τα

κύτταρα με το PBS ή με το θρεπτικό καθώς υπάρχει ο κίνδυνος της λύσης και του κυτταρικού θανάτου.

### 3.5. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ ΧΩΡΟΥ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

#### 3.5.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Για να ξεκινήσει η μελέτη μας για τη δράση του ERβ στη μιτοχονδριακή μεταγραφή θα πρέπει να βεβαιωθούμε για την καθαρότητα των κυττάρων μας. Αυτή ελέγχθηκε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης γνωστή και ως PCR. Είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως στη Μοριακή Βιολογία για να ενισχυθεί επιλεκτικά ένα αντίγραφο ενός τμήματος DNA σε αρκετές τάξεις μεγέθους, δημιουργώντας χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA χωρίς τη 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:

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

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος, προηγήθηκαν 3 διαδικασίες: η απομόνωση του DNA από δείγμα που λήφθηκε από κάθε κυτταροκαλλιέργεια με τη χρήση kit της Invitrogen, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση του γονιδίου του μυκοπλάσματος (αν υπάρχει) και ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Το πρωτόκολλο που ακολουθεί περιγράφει αναλυτικά τα αντιδραστήρια που απαιτούνται καθώς και τις ποσότητες που αυτά χρησιμοποιήθηκαν.

#### Πίνακας 1

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
10X PCR buffer minus Mg	10 µl	1X
10mM dNTPs mixture	2 µl	0.2 mM each
50mM MgCl <sub>2</sub>	3µl	1.5 mM
Primer mix (10mM each)	5 µl	0.5 µM each
Template DNA	1-20µl	-
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0.2-0.5µl	1.0-2.5 units
Autoclaved distilled water	Έως τα 100µl	-

Τα δείγματά μας περιλαμβάνουν ένα αρνητικό control (το οποίο στερούταν DNA), ένα θετικό control (το οποίο περιείχε DNA που προήλθε από μολυσμένη κυτταρική σειρά) και δείγματα DNA από τις κυτταρικές σειρές. Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούν 2 erppendorfs, όπου το ένα στο mix της αντίδρασης περιλαμβάνει εκκινητές για το μυκόπλασμα και το άλλο εκκινητές ακτίνης για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2**

<b>Μόριο</b>	<b>Αλληλουχία εκκινητών (R/F)</b>	<b>Εταιρεία</b>
Μυκόπλασμα	<b>R:CCRTGCACCAΥCTGTCWHHHBBGWAACTC</b> <b>F:GAAAGYGTGGGGAGCAAAYAGGATTAGATA</b>	Invitrogen
B-Ακτίνη	<b>R:CGTTCGTCCGCATGGAGTCCT</b> <b>F:GGAGCAATGATCTTGATCTT</b>	Invitrogen

Αφού λοιπόν έχουμε ετοιμάσει τις 2 αντιδράσεις επιλέγουμε το πρόγραμμα που θα ενισχύσει τα τμήματα που μας ενδιαφέρουν. Αυτό βασίζεται στο παρακάτω θερμοκτικό προφίλ:

- 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 αγαρόζη, με περιεκτικότητα σε αγαρόζη 1-2 % w/v κατά την δημιουργία της οποίας γίνεται προσθήκη της χρωστικής midori green ώστε να παρακολουθείται το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης. 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. Στη συνέχεια τα δείγματα φπρτώνονται στο gel αγαρόζης αφού πρώτα ομογενοποιηθούν με loading buffer 1x. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συμπληρώνεται με TAE<sub>x1</sub> και ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό στα 100-120V.

### **3.5.2. ΛΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (SONICATION)**

Αρχικά, γίνεται λύση του κυτταρικού ιζήματος με προσθήκη του SDS-Lysis buffer (παρουσία πάγου) ο όγκος του οποίου εξαρτάται από την ποσότητα του εκάστοτε ιζήματος (N2a mtGFP, N2a mtGFPERβ). Λόγω της μεγάλης ποσότητας ιζήματος προσθέσαμε 500μl σταδιακά (200+200+100μl) στα falcon που ήταν αποθηκευμένα τα κύτταρα μας. Ακολούθησε μικρή ανάδευση μετά την κάθε προσθήκη του SDS-Lysis buffer και συγκέντρωση των κυττάρων σε eppendorfs. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε τόσο για τα N2a mtGFP όσο και για τα N2a mtGFPERβ. Μόλις ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία τα κύτταρα επωάζονται για 20-25 λεπτά στο πάγο. Αφού περάσει το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ακολουθεί η διαδικασία της λύσης με χρήση υπερήχων.

Κατά τη διαδικασία του sonication, ουσιαστικά επιθυμούμε να επιτύχουμε όσο το δυνατόν καλύτερη λύση των κυττάρων. Ιδιαίτερα, μας ενδιαφέρει η θραύση του δίκλωνου DNA σε τμήματα που να κυμαίνονται κάτω των 700bp και κατά προτίμηση η πλειοψηφία να βρίσκεται στις 500bp. Για το λόγο αυτό επαναλαμβάνουμε 18

κύκλους όπου τα κύτταρα εκτίθενται για 10 δευτερόλεπτα στους υπερήχους που εκπέμπονται από την αντίστοιχη συσκευή. Οι κύκλοι απέχουν μεταξύ τους διάστημα ίσο με 45 δευτερόλεπτα. Στο σημείο αυτό, οφείλουμε να τονίσουμε πως επειδή η διαδικασία αυτή είναι βίαιη καθόλη τη διάρκεια της εκτιλύσσεται σε πάγο. Εφόσον ολοκληρωθούν οι δεδομένοι κύκλοι, τα δείγματα είναι πλέον έτοιμα για περαιτέρω επεξεργασία. Στην προκειμένη περίπτωση, γίνεται έλεγχος για το μέγεθος των τμημάτων του DNA.

### 3.5.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Για να ελέγξουμε τα τμήματα του DNA που έχουν προκύψει μετά τη διαδικασία του sonication, χρησιμοποιούμε ένα μικρό όγκο (10μl) από το κάθε eppendorf. Σε αυτά γίνεται προσθήκη 2μl NaCl 5M και παραμένουν στους 65°C-με τη βοήθεια του heatblock- για 3 ώρες. Αφού ολοκληρωθεί η τρίωρη παραμονή τους στους 65°C ακολουθεί η προσθήκη 4μl RNase A και 2μl Protease K. Τα ένζυμα αυτά προστίθενται για την αποικοδόμηση του RNA σε μικρότερα τμήματα και την πέψη πρωτεϊνών κατά προτίμηση μετά από υδρόφοβα αμινοξέα αντίστοιχα. Μόλις γίνει η προσθήκη των ενζύμων τα δείγματα μεταφέρονται και πάλι στο heatblock αυτή τη φορά όμως στους 45°C για 1 ώρα και 30 λεπτά. Στη συνέχεια μετά το πέρας της 1 ώρας και 30 λεπτών σε κάθε eppendorf προστέθηκαν 140μl ddH<sub>2</sub>O συνεπώς ο όγκος στο καθένα είναι 150μl.

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιείται με το πρωτόκολλο εξαγωγής φαινόλη-χλωροφόρμιο (Phenol/Chloroform). Αρχικά, γίνεται προσθήκη ίσου όγκου phenol:chloroform:isoamylalcohol δηλαδή 150μl. Παρατηρούμε μια χαρακτηριστική δημιουργία 2 φάσεων και ακολουθεί ήπια ανάδευση με το χέρι για 1 λεπτό. Έπειτα, λαμβάνει χώρα φυγοκέντρηση για 6 λεπτά σε 13.000rpm στους 24°C. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο με μεγάλη προσοχή μεταφέρεται σε νέο tube. Κάπου στη μέση μεταξύ των 2 φάσεων παρατηρούμε ένα μικρό στρώμα πρωτεϊνών τις οποίες και θέλουμε να αποφύγουμε. Συνεχίζουμε με την προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου (150μl) και παρόμοια με πριν γίνεται ήπια ανάδευση με το χέρι. Πραγματοποιείται η ίδια φυγοκέντρηση και ομοίως μεταφέρουμε το υπερκείμενο πάλι σε νέο tube. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται καθώς η εκχύλιση με χλωροφόρμιο απομακρύνει τα ίχνη φαινόλης. Εφόσον έχουμε τα νέα tubes με τα υπερκείμενα το επόμενο βήμα είναι η προσθήκη του 1/25 του συνολικού όγκου NaCl 5M. Στη δική μας περίπτωση χρησιμοποιήσαμε 6μl από NaCl 5M. Έπειτα ακολουθεί η προσθήκη 2 φορές τον όγκο που έχουμε από καθαρή αιθανόλη (312μl) και η αποθήκευση των δειγμάτων για 30 λεπτά στους -80°C, με το συγκεκριμένο βήμα να έχει ως στόχο την καθίζηση του DNA. Μόλις συμπληρωθεί η μισή ώρα ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C για 10 λεπτά και σε 13.000rpm. Αυτή τη φορά απομακρύνουμε το υπερκείμενο και χειριζόμαστε το ίζημα. Σε αυτό, προσθέτουμε 500μl αιθανόλης 70% - η οποία είναι κρύα- και ακολουθεί μια ήπια φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στους 4°C και σε 1600rpm. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκειμένου όσο το δυνατόν καλύτερα γίνεται και εξάτμιση της εναπομείνουσας αιθανόλης με τη βοήθεια του heatblock στους 45°C. Επιθυμούμε την πλήρη εξάτμισή της καθώς η παρουσία της θα μας δυσκολέψει στο χειρισμό κατά τη φόρτωση των δειγμάτων στο gel αγαρόζης για το τελικό στάδιο του ελέγχου των τμημάτων του DNA. Στον πάτο λοιπόν του κάθε eppendorf βρίσκεται το DNA που απομονώθηκε από την αρχική ποσότητα 10μl για τα κύτταρα N2a mtGFP και N2a mtGFPERβ.



#### 3.5.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και των πρωτεϊνών που βασίζεται στον διαχωρισμό φορτισμένων μορίων (π.χ. DNA) κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Τα φορτισμένα μόρια κινούνται μέσα στο υπόστρωμα και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους. Κατάλληλες τεχνικές επιτρέπουν την οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων με ειδικές χρώσεις, με παρατήρηση σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας ή με αυτοραδιογραφία.

Εμείς χρησιμοποιήσαμε την πιο συχνή μορφή που είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πηκτή αгарόζης. Τα πηκτώματα αгарόζης φέρουν ευμεγέθεις πόρους και είναι κατάλληλα για τον διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA και RNA. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάσαμε πηκτή με περιεκτικότητα αгарόζης 1%. Ζυγίσαμε 1 g αгарόζης σε μορφή σκόνης και το διαλύσαμε σε 100 ml TAE<sub>x1</sub> και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αгарόζη. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η προσθήκη της χρωστικής Midori green η οποία είναι απαραίτητη καθώς καθιστά ορατά τα μόρια του DNA. Το μίγμα τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο και προστίθενται εξαρτήματα που μοιάζουν με χτένες και δημιουργούν τα μικρά «πηγαδάκια» υποδοχής του δείγματος. Όταν κρυώσει η αгарόζη δημιουργεί ένα πήκτωμα, καθώς δεσμοί υδρογόνου συνδέουν τα μόρια της αгарόζης. Έπειτα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία περιέχει TAE<sub>x1</sub>. Το πήκτωμα εμβαπτίζεται στο λουτρό ηλεκτροφόρησης και ακολουθεί η τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής. Στα δείγματα έχει προστεθεί η κατάλληλη ποσότητα Loading Buffer ώστε να έχει τελική συγκέντρωση 1x. Στην προκειμένη περίπτωση προσθέσαμε 3μl από το loading buffer σε κάθε δείγμα. Στο σημείο αυτό καλό είναι να αναφερθεί πως σε μια από τις θέσεις προσθέσαμε και 4μl από τον δείκτη μοριακού βάρους Gene Ruler 1kb DNA ladder. Το επόμενο βήμα είναι η εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης στα 120V, η οποία ασκείται για το βέλτιστο χρόνο που απαιτείται για το διαχωρισμό των μορίων του DNA.

Μόλις τερματιστεί η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούμε την τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) όπου τα μόρια του DNA μετά την έκθεσή τους σε αυτή γίνονται ορατά. Αυτό οφείλεται στη δράση της midori green που παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA μέσω σχηματισμού δεσμών Van Der Waals και έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η απεικόνιση των τμημάτων του DNA ήταν η επιθυμητή καθώς η πλειοψηφία αυτών είχαν μέγεθος περί των 500bp και έτσι μας δώθηκε το πράσινο φως για την συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας. Τα τμήματα του DNA που υπέστησαν τη λύση με υπερήχους θέλουμε να κυμαίνονται μεταξύ 700-500bp. Μεγαλύτερα τμήματα θα έχουν σαν αποτέλεσμα την κατακρήμνιση τμημάτων DNA όπου ο ERβ δεν συνδέεται (μη-ειδικά) ενώ μικρότερα τμήματα δεν θα μπορούν να ενισχυθούν στο τελικό βήμα με τη μέθοδο της qPCR.

### 3.5.5. ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ (ChIP)

Η ανοσοκατακρήμνιση αποτελεί μία μορφή χρωματογραφίας συγγένειας. Σφαιρίδια από αгарόζη ή σεφαρόζη χρησιμοποιούνται ως στερεή φάση. Εμείς χρησιμοποιήσαμε σφαιρίδια αгарόζης πάνω στα οποία βρίσκονται ομοιοπολικά συνδεδεμένες πρωτεΐνες A ή G. Οι πρωτεΐνες αυτές προέρχονται από βακτήρια και έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν με μεγάλη συγγένεια την περιοχή Fc ορισμένων τύπων IgG ανοσοσφαιρινών. Έτσι, δημιουργούνται σύμπλοκα μεταξύ σφαιρίδιων-πρωτεϊνών A ή G με τα αντισώματα. Τα αντισώματα με τη σειρά τους δεσμεύουν επιλεκτικά το αντιγόνο που προορίζεται για κατακρήμνιση. Εκμεταλλευόμενοι αυτές τις ιδιότητες που προσφέρουν τα σφαιρίδια αλλά και τα αντισώματα, καταφέραμε να δημιουργήσουμε σύμπλοκα που αποτελούνται από σφαιρίδια-πρωτεΐνες A ή G με αντισώματα έναντι του ERβ και της πρωτεΐνης GFP για τα κύτταρα N2a mtGFPERβ και N2a mtGFP αντίστοιχα.

#### 1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Όπως αναφέραμε και παραπάνω, τα αποτελέσματα από την ηλεκτροφόρηση ήταν τα επιθυμητά τόσο για τα κύτταρα N2a mtGFPERβ όσο και για τα N2a mtGFP. Οπότε σε 2 νέα erpendorfs έγινε μεταφορά 60μl από τα control κύτταρα και 120μl από τα stable. Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 13000rpm για 10 λεπτά και στους 4°C. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο διαλύθηκε σε 9 όγκος chip buffer. Πιο αναλυτικά χρειάστηκαν 540μl για το erpendorf με τα control κύτταρα και 1080μl για το erpendorf με τα κύτταρα stable. Στο σημείο αυτό, να τονίσουμε πως κρατήσαμε το 1/10 της συνολικής ποσότητας από το εκάστοτε erpendorf ως input για την qPCR.

#### 2. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ BEADS.

Χρησιμοποιούμε erpendorf όπου πραγματοποιείται η ανάμειξη 125μl από τα beads A με 125μl από τα beads B. Αφού γίνει καλή ανάδευση για 1 λεπτό με το χέρι στη συνέχεια μοιράζουμε σε 4 νέα erpendorfs από 50μl (A+B). Τους δίνουμε χαρακτηριστικά ονόματα και στην παρούσα φάση χρησιμοποιούμε 2 από τα 5, τα οποία και πρέπει να καθαρίσουμε από αιθανόλη. Η αιθανόλη χρειάζεται στα beads προκειμένου αυτά να μην αφυδατώνονται, ωστόσο εμείς ενδιαφερόμαστε αποκλειστικά για τον ERβ και το DNA που είναι συνδεδεμένο με αυτόν. Έτσι σε αυτό το αρχικό στάδιο προσπαθούμε με τα beads να παγιδέσουμε οτιδήποτε άλλο κυτταρικό συστατικό (πρωτεΐνες, σπασμένες κυτταρικές μεμβράνες, λιπίδια κτλ). Έτσι ώστε αυτά να μην παρεμποδίσουν την πειραματική διαδικασία. Συνεπώς η αιθανόλη πρέπει να απομακρυνθεί προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σύνδεση με όσο το δυνατόν περισσότερα μη ειδικά κυτταρικά συστατικά.

Αρχικά πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των beads σε 2000rpm για 1 λεπτό και σε θερμοκρασία 4°C. Αφαιρούμε πολύ προσεκτικά το υπερκείμενο-που είναι η αιθανόλη- χωρίς να αναταράξουμε το ίζημα που βρίσκονται τα beads. Έπειτα, προσθέτουμε 500μl chip buffer, το οποίο περιέχει επίσης DTT, PMSF και protease inhibitors, και ακολουθεί ήπια ανάδευση. Λαμβάνει χώρα η ίδια φυγοκέντρηση και ομοίως με πριν απομακρύνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται για όσο το δυνατόν καλύτερη απομάκρυνση της αιθανόλης. Μόλις ολοκληρωθεί και η 2η απομάκρυνση του chip buffer τα beads είναι έτοιμα -και καθαρισμένα από αιθανόλη- για χρήση.

Με την απομάκρυνση για 2η φορά του chip buffer προσθέτουμε στο erpendorf για τα control κύτταρα το αντίστοιχο υπερκείμενο που προέκυψε από τους 9 όγκους (βλέπε προετοιμασία δειγμάτων) και ομοίως πράττουμε για τα stable κύτταρα. Αφήνουμε για 1 ώρα υπό κινούμενη ανάδευση σε ρόδα το υπερκείμενο των N2a mtGFPERβ και N2a mtGFP με τα beads στους 4°C.

### 3. ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ

Αφού ολοκληρωθεί η 1 ώρα τότε πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 2000rpm για 1 λεπτό στους 4°C. Συλλέγουμε με πολύ μεγάλη προσοχή το υπερκείμενο και απορρίπτουμε το ίζημα το οποίο φέρει τα beads μαζί με όλα τα υποκυτταρικά συστατικά που κατάφεραν να παγιδέψουν (μεμβράνες, αποδιαταγμένες πρωτεΐνες, λιπίδια κτλ). Στο υπερκείμενο βρίσκονται τα τμήματα του DNA που προέκυψαν από τους υπερήχους καθώς και τα τμήματα του DNA στο οποίο συνδέεται ο ERβ (EREs). Προκειμένου εμείς να κρατήσουμε μόνο τα τμήματα του DNA που συνδέεται ο ERβ, αφού πρώτα χωρίσουμε σε 3 νέα erpendorfs με 60μl το καθένα από το υπερκείμενο που συλλέξαμε για τα κύτταρα N2a mtGFP και N2a mtGFPERβ, προσθέτουμε ειδικά αντισώματα έναντι του ERβ και της πρωτεΐνης GFP. Στο σημείο αυτό να τονίσουμε ότι για να δεσμεύσουμε τον ERβ προσθέσαμε δύο αντισώματα. Το πρώτο αντίσωμα είναι έναντι της GFP -όπου στα control κύτταρα θα δεσμεύσει την GFP και μόνο- όπου στα stable θα δεσμεύσει τη χιμαιρική πρωτεΐνη GFP-ERβ. Επιπλέον, κάναμε χρήση και ενός δεύτερου αντισώματος έναντι του ERβ (MCA) το οποίο θα δεσμεύσει αποκλειστικά και μόνο τον ERβ. Αφού γίνει η προσθήκη των αντισωμάτων στα κατάλληλα erpendorfs τα δείγματα αφήνονται με το αντίσωμα υπό κινούμενη ανάδευση σε ρόδα στους 4°C overnight (16h και άνω).

### 4. BEADS-ΑΝΤΙΣΩΜΑ-ERβ

Την επόμενη μέρα λοιπόν πραγματοποιείται η προσθήκη, του συμπλόκου ERβ-αντίσωμα για τα stable και GFP-αντίσωμα για τα control, με beads με στόχο αυτή τη φορά τη σύνδεση beads-αντισώματος-ERβ για stable και beads-αντίσωμα-GFP για τα control κύτταρα. Αξίζει να υπενθυμίσουμε πως τα beads πριν χρησιμοποιηθούν πρέπει να καθαριστούν από αιθανόλη έτσι ώστε να αυξηθεί η απόδοση της σύνδεσης των beads με τα αντισώματα. Η διαδικασία προετοιμασίας τους έχει περιγραφεί παραπάνω. Για να πραγματοποιηθεί η σύνδεση των beads με τα αντισώματα και κατά επέκταση με ότι αυτά έχουν προσδέσει, αφήνονται για 2 ώρες υπο κινούμενη ανάδευση σε ρόδα στους 4°C. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στους 4°C σε 2000rpm. Αυτή τη φορά απορρίπτουμε πολύ προσεκτικά το υπερκείμενο ώστε να μην αναταράξουμε καθόλου το ίζημα που περιέχει το σύμπλοκο beads-αντίσωμα-πρωτεΐνη. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η ίδια φυγοκέντρηση κάθε φορά και απομακρύνουμε πάντα το υπερκείμενο. Αυτό που μας ενδιαφέρει είναι το ίζημα το οποίο υπόκεινται σε εκπλήσεις με 500μl από το κάθε buffer που ακολουθεί προκειμένου να απομακρυνθούν όσο το δυνατόν περισσότερα συστατικά που έχουν συνδεθεί μη ειδικά. Πιο αναλυτικά πραγματοποιείται:

- 1 έκπλυση με Low Salt Wash Buffer και 5 λεπτά υπο κινούμενη ανάδευση σε ρόδα στους 4°C.
- 1 έκπλυση με High Salt Wash Buffer και 5 λεπτά υπο κινούμενη ανάδευση σε ρόδα στους 4°C.
- 1 έκπλυση με LiCl Wash Buffer και 5 λεπτά υπο κινούμενη ανάδευση σε ρόδα στους 4°C.
- 2 εκπλύσεις με TE Buffer όπου ανάμεσα στην 1η με τη 2η πραγματοποιείται ανάδευση για 5 λεπτά σε ρόδα στους 4°C.

## 5. ΕΚΛΟΥΣΗ

Η διαδικασία της έκλουσης αποσκοπεί στην -όσο το δυνατόν- καλύτερη απομάκρυνση των συστατικών που έχουν συνδεθεί μη ειδικά στο σύμπλοκο beads-αντίσωμα-πρωτεΐνη. Στο στάδιο αυτό, χρησιμοποιούμε 250μl elution buffer σε κάθε erpendorf και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά υπό κινούμενη ανάδευση σε ρόδα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 2500rpm για 3 λεπτά σε 4°C. Αυτή τη φορά συλλέγουμε το υπερκείμενο καθώς το elution buffer έχει απομακρύνει ότι βρισκότανε συνδεδεμένο στα beads που είναι το σύμπλοκο αντίσωμα-ERβ και το DNA που αυτός είναι συνδεδεμένος. Επαναλαμβάνουμε άλλη μια φορά το παραπάνω βήμα με προσθήκη άλλων 250μl elution buffer. Συνεπώς έχουμε 500μl στα οποία περιέχονται αντίσωμα-ERβ και το DNA που ο υποδοχέας μας συνδέεται. Τα beads πια έχουν εκπληρώσει το στόχο τους και μπορούμε δεν τα χρειαζόμαστε περαιτέρω. Δεν θα μπορούσαμε να παραλείψουμε πως στο σημείο αυτό συμπληρώνουμε με elution buffer μέχρι τα 500μl στα 2 input (1 control και 1 ERβ ) που είχαμε κρατήσει νωρίτερα στην πειραματική διαδικασία. Έπειτα, προσθέτουμε 20μl NaCl 5M σε όλα τα erpendorfs που διαθέτουμε και με τη βοήθεια του heatblock παραμένουν overnight στους 65°C.

## 6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Την επόμενη μέρα στα δείγματά μας που βρίσκονται στο heatblock προσθέτουμε στο καθένα τις εξής ποσότητες από:

- 10μl EDTA 500mM
- 20μl Tris-HCl 1M, pH=6.5
- 4μl Proteinase K
- 2μl RNase A

Μετά την προσθήκη των παραπάνω αντιδραστηρίων, η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 55°C και τα δείγματα παραμένουν σε αυτή για 3 ώρες. Μόλις ολοκληρωθεί η τρίωρη επώαση ακολουθεί η απομόνωση του DNA με το πρωτόκολλο φαινόλης-χλωροφόρμιου που έχει περιγραφεί σε προηγούμενη υποενότητα (βλέπε απομόνωση DNA). Ωστόσο, θα πρέπει να τονίσουμε κάποιες διαφορές που πραγματοποιήθηκαν αυτή τη φορά και εντοπίζονται αρχικά στην προσθήκη 1μl Γλυκοκόγου πριν την προσθήκη του άλατος (NaCl). Το Γλυκογόνο είναι θετικά φορτισμένο μόριο και χρησιμοποιείται για να δεσμεύσει το αρνητικά φορτισμένο DNA. Η δεύτερη διαφορά είναι η προσθήκη του 1/10 του συνολικού όγκου στο erpendorf με 3M NaCl. Πέραν αυτών των διαφοροποιήσεων το πρωτόκολλο

παραμένει το ίδιο με τελικό αποτέλεσμα στον πάτο του κάθε eppendorf να βρίσκεται το DNA από το εκάστοτε δείγμα.

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

Οι εκκινητές έχουν σπουδαίο ρόλο στην πειραματική διαδικασία και για το λόγο αυτό θα πρέπει να σχεδιαστούν με μεγάλη προσοχή. Αρχικά μέσα από την ηλεκτρονική βάση δεδομένων PubMed του NCBI γίνεται η εύρεση της πλήρους αλληλουχίας του μιτοχονδριακού γονιδιώματος του οργανισμού *Mus musculus*. Από εκεί έχουμε τη δυνατότητα μέσω της επιλογής FASTA να επιλέξουμε και να δούμε την ακριβή αλληλουχία των γονιδίων στόχων που θα εξετάσουμε: 12s rRNA, D-loop και COX1. Ακόμη, να προσθέσουμε πως έγινε αναζήτηση και μελέτη για το σχεδιασμό εκκινητών και για δύο πιθανές αλληλουχίες στοιχείων απόκρισης του μεταγραφικού παράγοντα CRE. Έπειτα, με τη βοήθεια του προγράμματος Primer3 Version 0.4.0 που διατίθεται δωρεάν στο διαδίκτυο, γίνεται η σχεδίαση του ζεύγους των εκκινητών. Γίνεται λεπτομερής έλεγχος της θερμοκρασίας υβριδισμού ( $T_m$ ) των primers η οποία απέχει το πολύ  $1^\circ\text{C}$  και του μεγέθους του προϊόντος που προκύπτει. Το επόμενο βήμα είναι να εξακριβωθεί η μοναδικότητα και η ειδικότητα των αλληλουχιών. Έτσι, κάνουμε «nucleotide BLAST» (Blastn), με σκοπό τη διερεύνηση πιθανής συμπληρωματικότητας των αλληλουχιών που μας ενδιαφέρουν σε όλο το γονιδίωμα του υπό μελέτη οργανισμού (στην περίπτωση μας *Mus musculus*). Εφόσον οι αλληλουχίες των εκκινητών πληρούν τα απαραίτητα κριτήρια πρέπει να γίνει έλεγχος για το αν οι δύο αλληλουχίες του ζεύγους εκκινητών σχηματίζουν διμερή μεταξύ τους ή ομοδιμερή. Αυτός ο έλεγχος πραγματοποιείται μέσω του προγράμματος Multiple Primer Analyzer της εταιρίας ThermoFisher.

### 3.5.7 PCR ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΔΙΜΕΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Τα ζεύγη εκκινητών που σχεδιάσαμε πρέπει να πληρούν κάποια κριτήρια όπως: η θερμοκρασία υβριδοποίησης να μην απέχει πολύ μεταξύ τους, να εμφανίζουν πλήρη συμπληρωματικότητα με την αλληλουχία στόχο και καθόλου μεταξύ τους. Εάν οι εκκινητές εμφανίζουν συμπληρωματικότητα μεταξύ τους σε μεγάλο βαθμό τότε υβριδοποιούνται μεταξύ τους και σχηματίζουν διμερή. Τα διμερή εκκινητών προκαλούν μείωση της αποδοτικότητας στην τεχνική της PCR και qPCR. Για τον έλεγχο χρησιμοποιήσαμε 6 eppendorfs με το καθένα να περιέχει τις εξής ποσότητες:

**Πίνακας 3**

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
10x PCR buffer minus Mg	2,5μl	1X
10 mM dNTPs mixture	0,5μl	0.2 mM each
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,75μl	1.5 mM
Primer mix (10 μM each)	0,625μl (each F/R)	0.5 μM each
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	0,125μl	1.0-2.5 units
DNA	1μl	-
ddH <sub>2</sub> O	18,875μl	-

Στο σημείο αυτό να τονίσουμε πως σε κάθε erpendorf ελέγχουμε και διαφορετικό ζεύγος εκκινητών. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο σχηματισμού διμερών είναι:

**Πίνακας 4**

<b>Εκκινητές</b>	<b>Αλληλουχία εκκινητών</b>	<b>Εταιρεία</b>
β-ακτίνη	<b>R:</b> CGTTCGTCCGCATGGAGTCCT <b>F:</b> GGAGCAATGATCTTGATCTT	Invitrogen
12s rRNA	<b>R:</b> CGGTGTGTGCGTACTTCATT <b>F:</b> TCGATAAACCCCGCTCTACC	Thermo Fisher
mCOX1	<b>R:</b> GTCAGTTTCCAAAGCCTCAA <b>F:</b> TGAGCGGGAATAGTGGGTAC	Thermo Fisher
D-loop	<b>R:</b> CCAAATGGGGAAGGGGATAGT <b>F:</b> CTACTCCCCACCACCAGC	Thermo Fisher
CRE III	<b>R:</b> GTGATTGGGTTTTGCGGACT <b>F:</b> CAAGGCATGAAAGGACAGCA	Thermo Fisher
CRE I-III	<b>R:</b> GTGATTGGGTTTTGCGGACT <b>F:</b> CAGGGCCATCAAATGCGTTA	Thermo Fisher

Η αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ολοκληρώνεται σε 30 κύκλους βασίστηκε στο παρακάτω θερμικό προφίλ:

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

Μετά το τέλος της αντίδρασης, τα δείγματα επωάζονται για άλλα 10 λεπτά στους 72°C. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 1 % w/v και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

### **3.5.8. REAL TIME PCR (qPCR)**

Στην συμβατική PCR, το ενισχυμένο προϊόν DNA, ανιχνεύεται σε μια ανάλυση τελικού σημείου, συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Στην PCR σε πραγματικό χρόνο, η συσσώρευση του προϊόντος που ενισχύεται μετρείται καθώς η αντίδραση εξελίσσεται, σε πραγματικό χρόνο, με την ποσοτικοποίηση μετά από κάθε κύκλο. Η ανίχνευση προϊόντων PCR σε πραγματικό χρόνο γίνεται με την ενσωμάτωση ενός φθορίζοντος μορίου αναφοράς σε κάθε αντίδρασης που αποδίδει αυξημένο φθορισμό με μια αυξανόμενη ποσότητα DNA προϊόντος. Οι χημικές διεργασίες φθορισμού που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό περιλαμβάνουν χρωστικές που δεσμεύονται με το DNA και επισημασμένα με φθορισμό ειδικά ζεύγη εκκινητών ή ανιχνευτές. Ο μετρούμενος φθορισμός είναι ανάλογος προς τη συνολική

ποσότητα του προϊόντος που παράγεται ενώ η αλλαγή στον φθορισμό με την πάροδο του χρόνου χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ποσότητας του παραγόμενου προϊόντος σε κάθε κύκλο.

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

Πιο αναλυτικά παρασκευάσαμε 6 διαφορετικά master mix με τελικό όγκο 20μl όπου το κάθε ένα περιείχε διαφορετικά ζεύγη primers, αυτά που χρησιμοποιήθηκαν και για την PCR (ERE D-loop, ERE mCOX1, ERE 12s rRNA, CRE I-III, CRE III, Ακτίνη). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 5**

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

Το θερμικό προφίλ που ακολουθείται έχει ως εξής:

**Πίνακας 6**

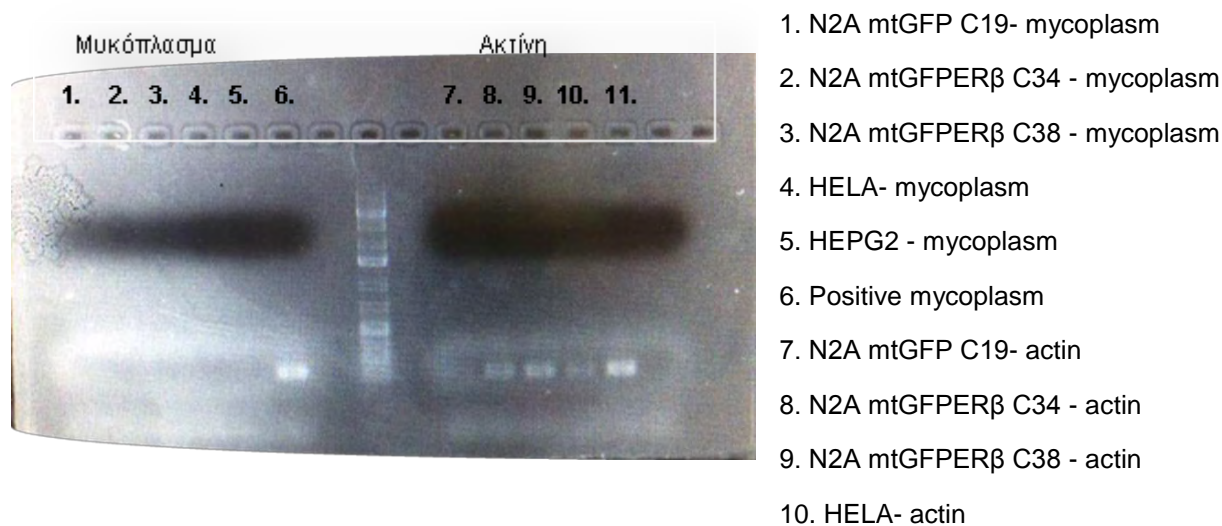
UDG Activation	1 κύκλος	2 min, 52°C
AmpliTaq Fast DNA Polymerase Activation	1 κύκλος	2 min, 95°C
Denature Anneal / Extend	40 κύκλοι	30 sec, 95°C 30 sec, 55°C 1 min, 72°C
Dissociation step	1 κύκλος	1 min, 95°C 30 sec, 55°C

Μελετήθηκαν τα επίπεδα των γονιδίων στόχων του μιτοχονδριακού ERβ και ακτίνης. Η τελευταία χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Με στόχο να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα και να έχουμε όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε duplicates. Για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινήτων στην αντίδραση συμπεριλήφθηκε αρνητικό control, NTC (No Template Control), δηλαδή αντίδραση που στερούνταν δείγματος DNA.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ N2a STABLE

Όπως έχουμε αναφέρει και παραπάνω είναι υψίστης σημασίας οι κυτταρικές σειρές N2A με τις οποίες δουλέψαμε να είναι καθαρές από μυκόπλασμα. Για τον έλεγχο, έγινε απομόνωση DNA μέσω χρήσης kit απομόνωσης (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. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτική αγαρόζης περιεκτικότητας 1,5 w/v%, με σκοπό τον ποιοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR. Μετά από έκθεση του gel σε ακτινοβολία UV ελήφθη η παρακάτω εικόνα:



#### Εικόνα 11

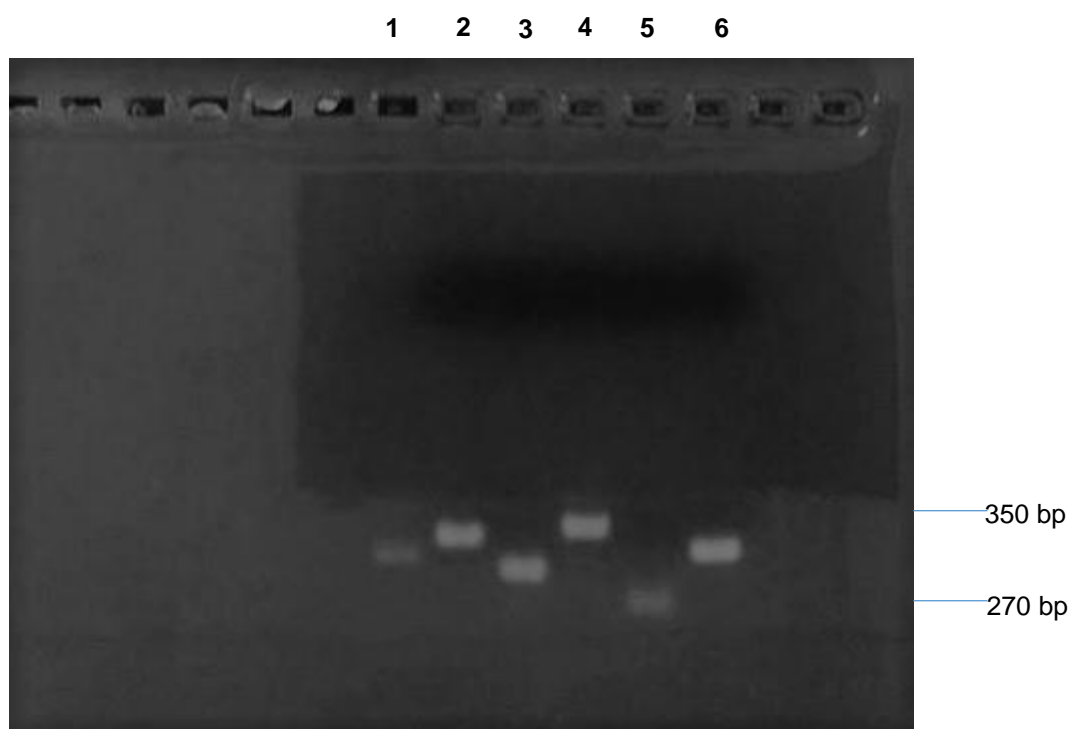
Απεικόνιση του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης μετά από έκθεση της πηκτής σε ακτινοβολία UV. Στο δεξί τμήμα της εικόνας απεικονίζονται τα δείγματα και η θέση που αυτά τοποθετήθηκαν.

Το προϊόν της PCR του μυκοπλάσματος έχει μέγεθος περίπου 434-468 bp. Παρατηρούμε ότι, τα προϊόντα των PCR των δειγμάτων N2A mtGFP C19, N2A mtGFPERβ C34 και N2A mtGFPERβ C38 δεν παρουσιάζουν ζώνη DNA στο μέγεθος αυτό όπως παρουσιάζει το θετικό control. Συνεπώς αυτό σημαίνει ότι οι κυτταρικές μας σειρές είναι καθαρές από μυκόπλασμα. Επιπλέον, παρατηρούμε 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. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΔΙΜΕΡΩΝ

Οι εκκινητές (Primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια 18-30 βάσεων που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να ενισχυθεί. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό οι εκκινητές να έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα προς την αλληλουχία στόχο, αλλά ελάχιστη έως καθόλου συμπληρωματικότητα μεταξύ τους. Ο υβριδισμός μεταξύ τους οδηγεί στο σχηματισμό διμερών εκκινητών (Primer dimers) που έχουν μέγεθος 30-50 bp και μειώνουν την αποτελεσματικότητα της PCR. Μικρότεροι εκκινητές οδηγούν σε μη ειδικό υβριδισμό, ενώ μεγαλύτεροι εκκινητές έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα, αλλά αυξάνεται η πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού. Κάτι παρόμοιο προκαλείται επίσης από την ύπαρξη η περιοχών συμπληρωματικότητας μέσα στον εκκινητή. Συνεπώς για να αποφύγουμε τις αρνητικές επιδράσεις που προκαλεί ο υβριδισμός μεταξύ των εκκινητών πραγματοποιήσαμε PCR και ελέγξαμε όλα τα ζεύγη primers που διαθέτουμε χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ολικό DNA. Τα ζεύγη εκκινητών σχεδιάστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Primer3 Version 0.4.0 που διατίθεται δωρεάν στο διαδίκτυο. Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1,5% w/v και τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης απεικονίζονται παρακάτω:



## Εικόνα 12

Έλεγχος αποτελεσματικότητας και εξειδίκευσης εκκινητών. Απεικόνιση του αποτελέσματος της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR μετά από έκθεση της πηκτής σε ακτινοβολία UV. Η σειρά με την οποία τοποθετήθηκαν τα ζεύγη των εκκινητών είναι:

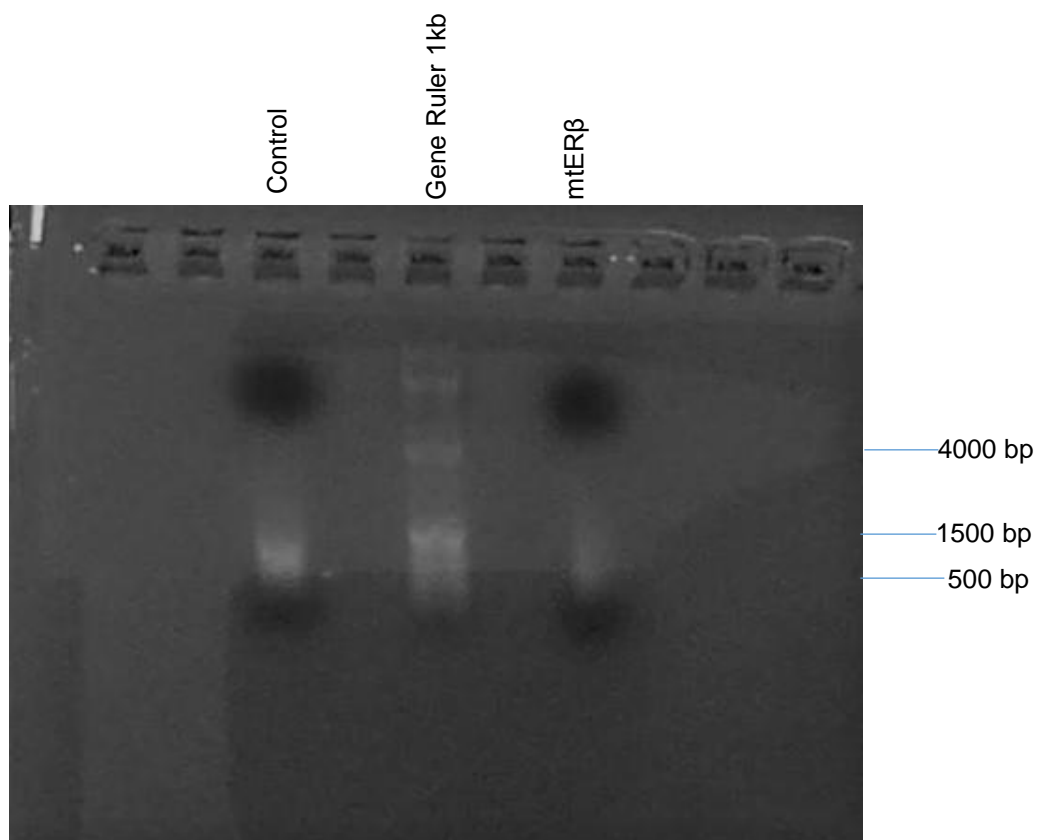
1. Ακτίνη, 2. ERE 12s rRNA, 3. ERE mCOX1, 4. ERE D-loop, 5. CRE III, 6. CRE I-III.

Παρατηρούμε πως καμία ζώνη στους εκκινητές δεν εμφανίζει διμερή συνεπώς θεωρούμε πως οι εκκινητές μας είναι αξιόπιστοι και δεν υπάρχει συμπληρωματικότητα μεταξύ τους.

### 4.3. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΘΡΑΥΣΗΣ DNA ΜΕΤΑ ΤΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΑΥΤΟΥ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ

Η λύση των κυττάρων με υπερήχους (sonication) έχει ως στόχο την κατάτμηση του DNA σε τμήματα των οποίων το μέγεθος να κυμαίνεται μεταξύ των 700 με 300 bp και κατά προτίμηση η πλειοψηφία να βρίσκεται κοντά στις 500 bp. Η διαδικασία του sonication περιλαμβάνει 18 κύκλους όπου τα κύτταρα εκτίθενται για 10 δευτερόλεπτα στους υπερήχους που εκπέμπονται από την αντίστοιχη συσκευή. Οι κύκλοι απέχουν μεταξύ τους διάστημα ίσο με 45 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από μια μικρή ποσότητα N2a mtGFP και N2a mtGFPERβ κυττάρων (10μl) με τη βοήθεια του πρωτοκόλλου φαινόλη-χλωροφόρμιο. Η διαδικασία έχει περιγραφεί αναλυτικά στην υποενότητα 3.5.3.

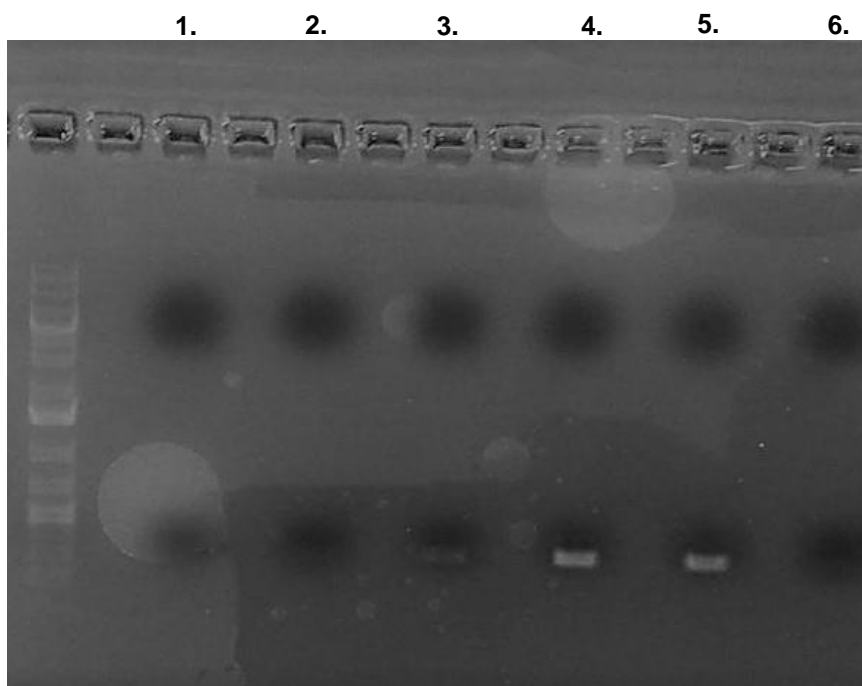
Αφού απομονώθηκε το DNA από τα κύτταρα ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης περιεκτικότητας 1% w/v με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα 120V. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης απεικονίζεται παρακάτω:



### Εικόνα 13

Με τη βοήθεια του Gene Ruler DNA ladder παρατηρούμε πως όλα τα τμήματα του DNA, τόσο στα κύτταρα control όσο και στα κύτταρα stable, είναι στο επιθυμητό μέγεθος. Είναι εμφανές πως η πλειοψηφία των τμημάτων είναι μεταξύ των 700 και 500bp. Συνεπώς έχουμε το πράσινο φως για το επόμενο βήμα της πειραματικής διαδικασίας.

#### 4.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥ mtERβ ΣΤΙΣ ΠΙΘΑΝΕΣ ΕΡΕ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR



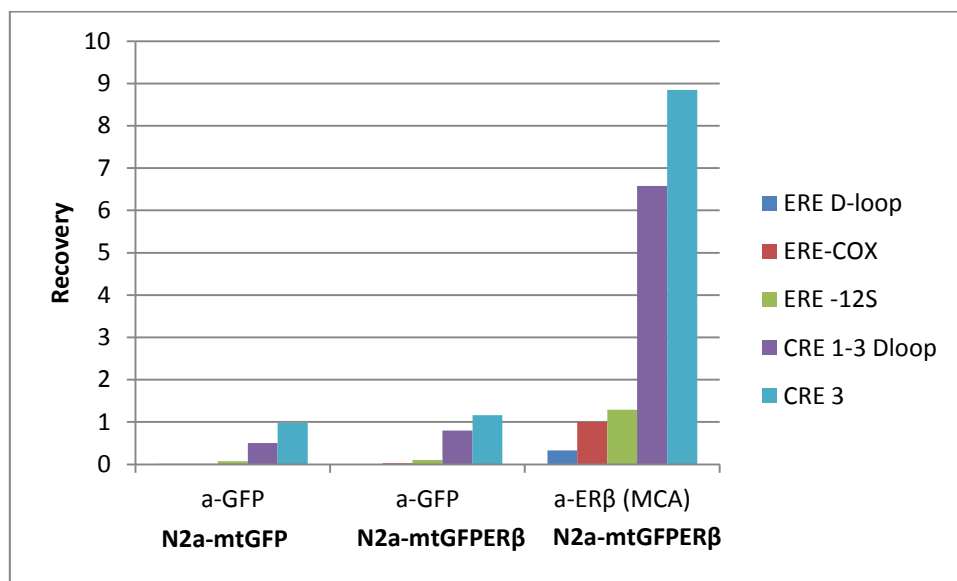
**Εικόνα 14**

Απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τη σύνδεση του mtERβ στα ERE της D-loop του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η σειρά με την οποία έχουν τοποθετηθεί τα δείγματά μας είναι:

1. GFP Control, 2. GFPERβ, 3. GFPERβ (MCA), 4. Input Control, 5. InputERβ, 6. Negative Control.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, μετά το πέρας της PCR λαμβάνουμε προϊόν στα αρχικά ολικά δείγματα που υποβλήθηκαν στην διαδικασία ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης διαδρομή 4 (mtGFPN2A, control κυτταρα) και διαδρομή 5 (mtGFPERβN2A, σταθερά διαμολυσμένα κύτταρα) όπως και αναμενόταν. Επίσης προϊόν PCR λαμβάνεται, σε σημαντικό ποσοστό και στο ανοσοκατακρημισθέν σύμπλοκο από κύτταρα mtGFPERβ με χρήση μονοκλωνικού αντίσωματος (MCA) έναντι του ERβ (διαδρομή 3) και σε μικρότερο ποσοστό στην διαδρομή 2 με αντίσωμα έναντι της GFP. Παρατηρούμε πως στη διαδρομή 1 (GFP Control) δεν λαμβάνουμε προϊόν, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση σύνδεσης του mtERβ στα ERE D-loop του μιτοχονδριακού DNA.

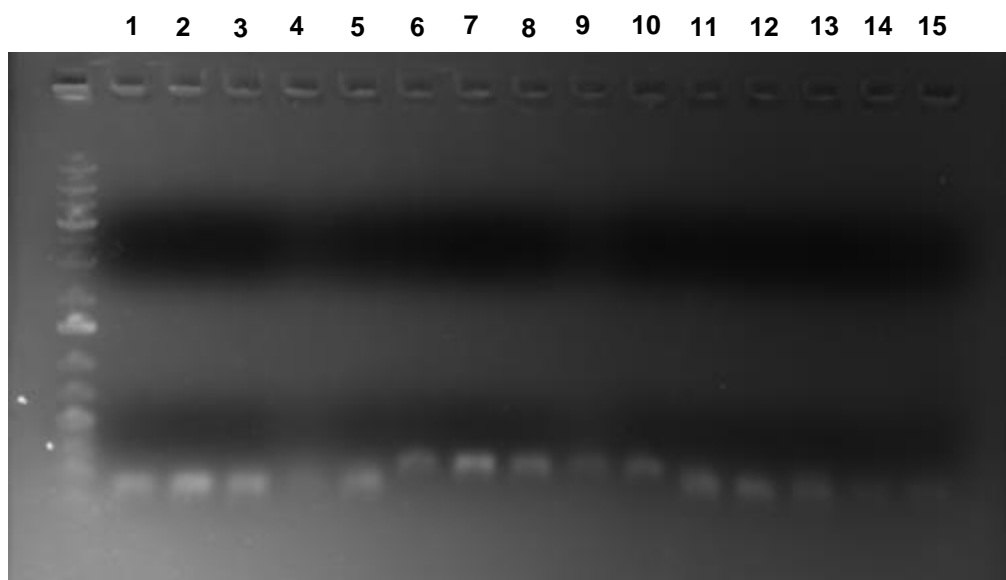
#### 4.5. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥ mtERβ ΣΤΙΣ ΠΙΘΑΝΕΣ ERE ΚΑΙ CRE ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ REAL TIME-PCR



**Εικόνα 15**

Σχηματική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της qPCR. Παρατηρούμε μια σημαντική, άμεση ή έμμεση σύνδεση του ERβ στα στοιχεία απόκρισης για τον μεταγραφικό παράγοντα CREB στην περιοχή της D-loop (CRE I και CRE I-III). Επιπλέον, φαίνεται σε μικρότερο βαθμό άμεση σύνδεση του ERβ στα EREs.

**4.6. ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΤΟΥ mtERβ ΣΤΙΣ ΠΙΘΑΝΕΣ ERE ΚΑΙ CRE ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΟΥ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR**



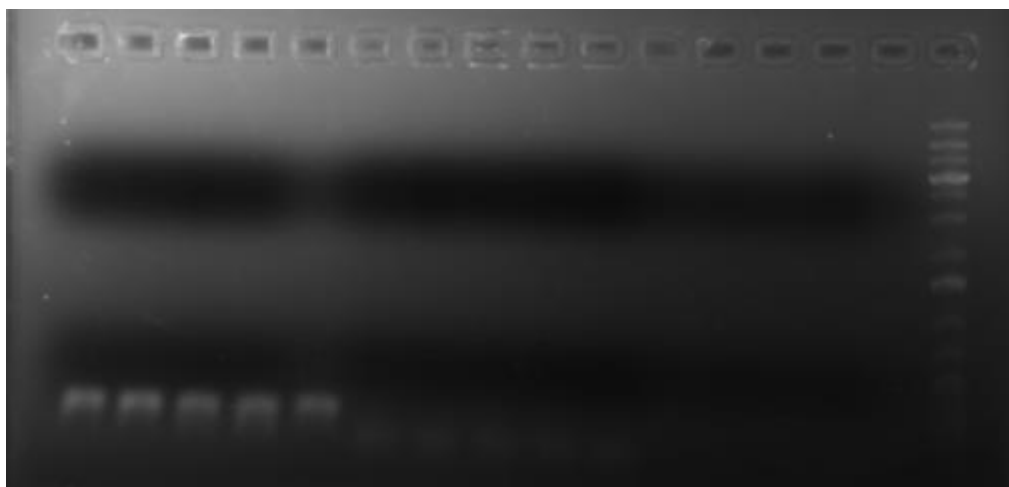
**Εικόνα 16**

Απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τη σύνδεση του mtERβ στα ERE της D-loop του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η σειρά με την οποία έχουν τοποθετηθεί τα δείγματά μας είναι:

**Πίνακας 7**

Αριθμός Δείγματος	Δείγμα	Αριθμός Δείγματος	Δείγμα	Αριθμός Δείγματος	Δείγμα
1	ERE mCOX1 Input ERβ	6	ERE 12s rRNA Input ERβ	11	Ακτίνη Input ERβ
2	ERE mCOX1 Input Control	7	ERE 12s rRNA Input Control	12	Ακτίνη Input Control
3	ERE mCOX1 mtGFPERβ (MCA)	8	ERE 12s rRNA mtGFPERβ (MCA)	13	Ακτίνη mtGFPERβ (MCA)
4	ERE mCOX1 mtGFPERB	9	ERE 12s rRNA mtGFPERB	14	Ακτίνη mtGFPERB
5	ERE mCOX1 mtGPF	10	ERE 12s rRNA mtGPF	15	Ακτίνη mtGPF

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



**Εικόνα 17**

Απεικόνιση των αποτελεσμάτων για τη σύνδεση του mtERβ στα ERE της D-loop του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Η σειρά με την οποία έχουν τοποθετηθεί τα δείγματά μας είναι:

**Πίνακας 8**

Αριθμός Δείγματος	Δείγμα	Αριθμός Δείγματος	Δείγμα	Αριθμός Δείγματος	Δείγμα
16	CREI-III Input ERβ	21	CRE III Input ERβ	26	Negative Control Input ERβ
17	CREI-III Input Control	22	CRE III Input Control	27	Negative Control Input Control
18	CREI-III mtGFPERβ (MCA)	23	CRE III mtGFPERβ (MCA)	28	Negative Control mtGFPERβ (MCA)
19	CREI-III mtGFPERB	24	CRE III mtGFPERB	29	Negative Control mtGFPERB
20	CREI-III mtGPF	25	CRE III mtGPF	30	Negative Control mtGPF

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα οιστρογόνα αποτελούν μία κατηγορία στεροειδών ορμονών και έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την αύξηση, την ανάπτυξη και τη φυσιολογία του ανθρώπινου αναπαραγωγικού συστήματος. Επίσης, εμπλέκονται στο νευρικό και καρδιαγγειακό σύστημα, ενώ παράλληλα συμμετέχουν στην ανάπτυξη των οργάνων, την διαμόρφωση των οστών και τη συμπεριφορά και στα δύο φύλα (Lee et al., 2012). Οι δράσεις των οιστρογόνων διαμεσολαβούνται από τους υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) που ανήκουν στην υπερικογενεία των πυρηνικών υποδοχέων (NR). Πιο συγκεκριμένα, διακρίνουμε δύο ισομορφές: τον υποδοχέα οιστρογόνων α (Estrogen Receptor alpha, ERα, NR3A1) και τον υποδοχέα οιστρογόνων β (Estrogen Receptor beta, ERβ, NR3A2). Αμφότεροι παρουσιάζουν δράσεις μεταγραφικών παραγόντων και ενεργοποιούνται από τα οιστρογόνα, με το πιο δραστικό οιστρογόνο που παράγεται στον οργανισμό να είναι η 17β-οιστραδιόλη (E2) (Heldring, et al., 2007). Ακόμα, παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο κατανομής στον οργανισμό και αυτή η διαφορά στην κατανομή των ERα και ERβ, έχει ως αποτέλεσμα διακριτές βιολογικές λειτουργίες για τους ERs κάτι που ενισχύεται από τους διαφορετικούς φαινοτύπους που παρατηρούνται σε knockout ποντίκια για τον κάθε έναν από τους δύο ERs ξεχωριστά (Hall et al., 2001). Οι ERs ασκούν τη δράση τους ως μεταγραφικοί παράγοντες με άμεση ή έμμεση σύνδεση τους στο DNA. Άμεσα συνδέονται σε ειδικές αλληλουχίες που αναγνωρίζουν και είναι γνωστές ως στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα (EREs), ενώ έμμεσα μπορεί να αλληλεπιδράσουν με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μετά την ενεργοποίηση από τον προσδέτη και να ελέγξουν την έκφραση γονιδίων στόχων αυτών των μεταγραφικών παραγόντων. Επίσης παρατηρούνται και γρήγορες μη γενωμικές δράσεις.

Μετά και την ανακάλυψη της βήτα ισομορφής του υποδοχέα οιστρογόνων (ERβ) μεγάλος αριθμός μελετών αφορούν την αποσαφήνιση της δράσης του. Επίσης, όλο και περισσότερα επιστημονικά δεδομένα-υποδεικνύουν την είσοδο και εντοπισμό του υποδοχέα στο μιτοχόνδριο. Επομένως, το επόμενο βήμα είναι η διερεύνηση του ρόλου του σε αυτό το «νέο» περιβάλλον. Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά οργανίδια που διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο για την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου. Παρέχουν περισσότερο από το 90% των ενεργειακών απαιτήσεων του κυττάρου μέσω οξειδωτικής φωσφορύλιωσης στην αναπνευστική αλυσίδα. Επιπλέον, εμπλέκονται σε πολλά στάδια του μεταβολισμού όπως: η παραγωγή ουρίας, η βιοσύνθεση της αίμης και στην β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Ακόμα, είναι βασικά συστατικά της απόκρισης στο οξειδωτικό στρες, μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου, την κυτταρική διαφοροποίηση και τη γήρανση. Οι διαταραχές των μιτοχονδριακών λειτουργιών έχουν συσχετιστεί αιτιολογικά με νευρομυϊκές εκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson, η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση και ο καρκίνος (A. M. Psarra, C. Sekeris, 2008). Οι μιτοχονδριακές λειτουργίες εκτελούνται σε ένα ενδοκυτταρικό πλαίσιο κατόπιν συνεννόησης/συνομιλίας με άλλα κυτταρικά διαμερίσματα και ρυθμίζονται από διάφορα εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά σήματα. Αρκετοί πυρηνικοί υποδοχείς και άλλοι παράγοντες πυρηνικής μεταγραφής, όπως ο NF-κB, AP-1, CREB και p53, που εμπλέκονται σε διεργασίες μεταβολισμού και ανάπτυξης, έχουν ανιχνευθεί στα μιτοχόνδρια. Επίσης στο μιτοχονδριακό DNA εντοπίζονται πιθανές ανταποκρινόμενες αλληλουχίες σε αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες υποδουκνείοντας την άμεση δράση τους στην ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής (A. M. Psarra, C. Sekeris, 2008). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο



μεταγραφικός παράγοντας CREB ο οποίος, μετά τη φωσφορυλίωσή του από την εξαρτώμενη από το cAMP πρωτεϊνική κινάση (πρωτεϊνική κινάση A, PKA), καθώς και από κινάσες εξαρτώμενες από  $Ca^{2+}$  προάγει τη μεταγραφή των CRE-ρυθμιζόμενων γονιδίων. Πιο συγκεκριμένα, οι δράσεις που ασκεί διαμεσολαβούνται μέσω της σύνδεσής του σε ειδικές αλληλουχίες στο DNA, γνωστές και ως στοιχεία απόκρισης για τον μεταγραφικό παράγοντα CREB (CREs). Σύμφωνα με μελέτες ο CREB έχει ανιχνευθεί στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων ενώ παράλληλα έχει δείχθει πως η σύνδεση του CREB με CRE αλληλουχίες στην περιοχή D-loop του μιτοχονδριακού DNA, αυξάνει τα επίπεδα μεταγραφής των μιτοχονδριακών γονιδίων ND2, ND5 και ND6 του συμπλέγματος I της αναπνευστικής αλυσίδας (Lee et al., 2005). Ακόμα, διαταραχή της δραστηριότητας CREB στα μιτοχόνδρια φαίνεται να συσχετίζεται με την εμφάνιση κλινικού και παθολογικού φαινοτύπου παρόμοιο με τη νόσο Huntington. Τέλος, από μελέτες σε ποντίκια mtCREB<sup>-/-</sup> βρέθηκε ατροφία σε νευρώνες του ραβδωτού σώματος. Τα δεδομένα αυτά, υποστηρίζουν την υπόθεση για έναν νευροπροστατευτικό ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα CREB (Lee et al., 2005).

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό πως οι δράσεις του ERβ στο μιτοχόνδριο μπορούν να περιλαμβάνουν τον έλεγχο της μεταγραφής μιτοχονδριακών γονιδίων με ή χωρίς τη συνεργασία του με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και συστατικά του πρωτεϊνικού συμπλόκου της μιτοχονδριακής μεταγραφής. Σε αυτό το πλαίσιο 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). Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος του ERβ σε περιπτώσεις καρκίνου όπου μπορεί να έχει επαγωγική ή προστατευτική δράση, ανάλογα με τον ιστό που εντοπίζεται ο καρκίνος (B.J.Deroo et al. 2006). Η δράση αυτή μπορεί να είναι είτε έμμεση, όπως περιγράφεται στην εισαγωγή, είτε άμεση με απ' ευθείας σύνδεση στο mtDNA.

Έτσι, ο ERβ πιθανόν να έχει πολύπλευρο ρόλο στο μιτοχόνδριο και να μπορεί να ρυθμίσει άμεσα τη μεταγραφή μιτοχονδριακών γονιδίων. Ο ακριβής μηχανισμός αυτής της δράσης είναι υπό διερεύνηση. Ως εκ τούτου, έγινε προσπάθεια από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας να αποδειχθεί η σύνδεση της βήτα ισομορφής του υποδοχέα οιστρογόνων σε φυσικές θέσεις σύνδεσης στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) γνωστές και ως στοιχεία απόκρισης οιστρογόνων (EREs) στα γονίδια της D-loop, COX1 και 12S rRNA. Επιπλέον, ελέγχθηκε η πιθανότητα άμεσης ή έμμεσης σύνδεσης του ERβ στα στοιχεία απόκρισης του μεταγραφικού παράγοντα CREB στην περιοχή της D-loop του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης μελέτης που έλαβε χώρα στα πλαίσια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν 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. Αφού καλλιεργήθηκαν και συλλέχθηκαν 5 τρυβλία διαμέτρου 15cm με κύτταρα N2a GFP που χρησιμοποιήθηκαν ως κύτταρα αναφοράς και 11 τρυβλία με κύτταρα N2a mtGFPERβ που υπερεκφράζουν τον ERβ, προχωρήσαμε στο επόμενο βήμα της πειραματικής διαδικασίας που ήταν η μονιμοποίηση των κυττάρων με χρήση φορμαλδευδης και η λύση του κυτταρικού ιζήματος. Αρχικά πραγματοποιήθηκε λύση παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα SDS και στη συνέχεια ολοκληρώθηκε η λύση

των κυττάρων και θραύση του DNA με χρήση υπερήχων. Κατά τη διαδικασία του sonication, ουσιαστικά επιθυμούμε τη θραύση του δίκλωνου DNA σε τμήματα που να κυμαίνονται κάτω των 700bp και κατά προτίμηση η πλειοψηφία να βρίσκεται στις 500bp. Για το λόγο αυτό επαναλαμβάνουμε 18 κύκλους όπου τα κύτταρα εκτίθενται για 10 δευτερόλεπτα στους υπερήχους που εκπέμπονται από την αντίστοιχη συσκευή. Οι κύκλοι απέχουν μεταξύ τους διάστημα ίσο με 45 δευτερόλεπτα. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος για το μέγεθος των τμημάτων που υπέστησαν τη λύση με υπερήχους και μόλις αποδείχθηκε ότι κυμαίνονται στα επιθυμητά πλαίσια, στη συνέχεια ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο για την ανασοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP). Στην ανασοκατακρήμνιση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα: έναντι του ERβ από επίμυ, MCA (SEROTEC) και έναντι της GFP (Roche). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση της ανασοκατακρημνισμένης χρωματίνης και των πιθανά ανασοκατακρημνισθέντων αλληλουχιών ενδιαφέροντος με τη διαδικασία τόσο PCR όσο και της Real Time PCR (qPCR) με διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Όσον αφορά τους εκκινητές: Αρχικά μέσα από την ηλεκτρονική βάση δεδομένων PubMed του NCBI γίνεται η εύρεση της πλήρους αλληλουχίας του μιτοχονδριακού γονιδιώματος του οργανισμού *Mus musculus*. Από εκεί έχουμε τη δυνατότητα μέσω της επιλογής FASTA να επιλέξουμε και να δούμε την ακριβή αλληλουχία των γονιδίων στόχων που θα εξετάσουμε: 12s rRNA, D-loop και COX1. Ακόμη, να προσθέσουμε πως έγινε αναζήτηση και μελέτη για το σχεδιασμό εκκινητών και για δύο πιθανές αλληλουχίες στοιχείων απόκρισης του μεταγραφικού παράγοντα CRE. Στη συνέχεια οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Primer3 Version 0.4.0. Εφόσον οι αλληλουχίες των εκκινητών βρέθηκε ότι πληρούν τα απαραίτητα κριτήρια έγινε έλεγχος για το αν οι δύο αλληλουχίες του ζεύγους εκκινητών σχημάτιαν διμερή μεταξύ τους ή ομοδιμερή. Αυτός ο έλεγχος πραγματοποιείται μέσω του προγράμματος Multiple Primer Analyzer της εταιρίας ThermoFisher. Τέλος, πραγματοποιήθηκε PCR και Real Time PCR για τον έλεγχο του εντοπισμού των υπο εξέταση ERE και CRE στο ανασοκατακρημνισθέν σύμπλοκο, υποδηλώνοντας την άμεση ή έμμεση αλληλεπίδραση του υποδοχέα οιστρογόνων ERβ με τα στοιχεία αυτά.

Τα αποτελέσματα τόσο από την PCR ανάλυση όσο και από την Real time PCR μας δείχνουν την ύπαρξη των ERE D-loop στο ανασοκατακρημνισθέν σύμπλοκο, πράγμα το οποίο υποδηλώνει άμεση αλληλεπίδραση ERβ στο μιτοχονδριακό DNA και άρα άμεσης ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής. Παράλληλα η παρουσία των αλληλουχιών CRE I-III και CRE III στο ανασοκατακρημνισθέν σύμπλοκο υποδηλώνει πιθανή αλληλεπίδραση του υποδοχέα με το μεταγραφικό παράγοντα CREB και ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής μέσω της περιοχής D-loop, καθώς και τη δημιουργία ενός πρωτεϊνικού συμπλοκου όπου συμμετέχουν και οι δύο παράγοντες.

Μελλοντικοί στόχοι είναι η επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων με επανάληψη της προαναφερθέντας διαδικασίας και ο χαρακτηρισμός της σύστασης του πρωτεϊνικού συμπλόκου στο ρυθμιστική περιοχή D-loop της μιτοχονδριακής μεταγραφής.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. R. Sever, C. Glass, (2013) Signaling by Nuclear Receptors, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3;5:a016709
2. Y. Zhang, X.Y. Luo, D.H. Wu, Y. Xu, (2015) ROR nuclear receptors: structures, related diseases, and drug discovery, *Acta Pharmacol Review*.
3. Gupta N, Mayer D, (2013) Interaction of JAK with steroid receptor function, *Landes Bioscience, JAK-STAT 2:4*, e24911
4. M. Beato, J. Klug, (2000), "Steroid hormone receptors: An update", *Human reproduction update*, Vol. 6, No 3, pp. 225-236
5. 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
6. Jie Cui, Yong Shen, and Rena Li, (2013) Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain, *Trends in Molecular Medicine*.
7. 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
8. Lee Hye-Rim , Kim Tae-Hee, Choi Kyung-Chul, (2012) Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , identified by estrogen receptor knockout mouse, *Laboratory Animal Research*, 28, 71-76
9. 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
10. Stefan O. Mueller, Kenneth S. Korach (2005) Mechanisms of Estrogen Receptor-Mediated Agonistic and Antagonistic Effects, *Endocrine Disruptors – Part I*, pp.545-545
11. Björnström L, Sjöberg M, (2005) Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes, *Molecular Endocrinology*, Vol. 19,833–842

12. Eric K. Shanle and Wei Xu, (2011) Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action, *Chemical Research in Toxicology*, pp 6–19
13. Chunyan Zhao, Karin Dahlman-Wright and Jan-Ake Gustafsson, (2008) Estrogen receptor  $\beta$ : an overview and update, *Nuclear Receptor Signaling*
14. B. J. Deroo, A. V. Buensuceso, (2010) Mini review: Estrogen Receptor  $\beta$ : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9):1703–1714
15. J.-Q. Chen, P. R. Cammarata, C. P. Baines, J. D. Yager, (2009) Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogenreceptors and physiological, pathological and pharmacological implications, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, 1540–1570
16. 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
17. 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
18. Deroo Bonnie J, Korach Kenneth S, (2006) Estrogen receptors and human disease, *The Journal of Clinical Investigation*, 116, 561-570
19. Simpkins James W., Yang Shao-Hua, Sarkar Saumyendra N., Pearce Virginia, (2008) Estrogen actions on mitochondria—Physiological and pathological implications, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 290, 51-59
20. C. M. Klinge, (2008) Estrogenic Control of Mitochondrial Function and Biogenesis, Vol. 105, No. 6, 1342-1351
21. Lee J, Kim CH, Simon DK, Aminova LR, Andreyev AY, Kushnareva YE, Murphy AN, Lonze BE, Kim KS, Ginty DD *et al.* (2005) Mitochondrial cyclic AMP response element-binding protein (CREB) mediates mitochondrial gene expression and neuronal survival. *J Biol Chem* **280**, 40398–40401.
22. Ryu H, Lee J, Impey S, Ratan RR & Ferrante RJ(2005) Antioxidants modulate mitochondrial PKA and increase CREB binding to D-loop DNA of the mitochondrial genome in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 13915–13920.
23. Domenico De Rasmio, Anna Signorile, Emilio Roca, Sergio Papa, (2009) cAMP response element-binding protein (CREB) is imported into mitochondria and promotes protein synthesis. *FEBS Journal*, 276: 4325–4333. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07133.x