



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ  
ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ»**

**ΑΓΓΕΛΙΚΗ-ΜΑΡΙΑ Π. ΒΛΑΪΚΟΥ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017**









**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗ  
ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ»**

**ΑΓΓΕΛΙΚΗ-ΜΑΡΙΑ Π. ΒΛΑΪΚΟΥ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017**



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».





**Ημερομηνία αίτησης της κ. Βλάικου Αγγελικής-Μαρίας:**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 714<sup>α</sup>/7-6-2011**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα

Σύρρου Μαρίκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Κωνσταντή Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Πατρινός Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακογονιδιοματικής του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 3-10-2011**

*«Γενετική και Επιγενετική ανταπόκριση ανθρωπίνων κυττάρων σε εξωγενείς παράγοντες»*

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 794<sup>ο</sup>/31-1-2017**

<b>Κωνσταντή Μαρία</b>	Καθηγήτρια Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Λαμπρόπουλος Αλέξανδρος</b>	Καθηγητής Γενικής Βιολογίας-Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.
<b>Μαυρέας Βενετσάνος</b>	Καθηγητής Ψυχιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Σύρρου Μαρίκα</b>	Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Μιχαηλίδης Θεολόγος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Πατρινός Γεώργιος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακογονιδιοματικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών.
<b>Σκαπινάκης Πέτρος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Ψυχιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 2-2-2017

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Μηνάς Πασχόπουλος**

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Η Γραμματέας του Τμήματος  
  
**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**  




*Στους γονείς μου,  
Παναγιώτη και Ευαγγελή*



## Πρόλογος

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα 2011-2017, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κας Μαρίκας Σύρρου.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί χωρίς την ουσιαστική συμμετοχή, βοήθεια και υποστήριξη των καθηγητών και άλλων συνεργατών, της οικογένειας και των φίλων μου. Για το λόγο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθιά:

-Τον Καθηγητή, κ. **Σπυρίδωνα Γεωργάτο**, Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιολογίας που με δέχτηκε στο εργαστήριο, θέτοντας στη διάθεσή μου την υλικοτεχνική υποδομή του Εργαστηρίου Βιολογίας.

-Την Καθηγήτρια Βιολογίας και Ιατρικής Γενετικής, κα. **Μαρίκα Σύρρου**, επιβλέπουσά μου, για την ανάθεση του θέματος της Διδακτορικής μου Διατριβής. Θέλω να της εκφράσω την εκτίμηση, την ευγνωμοσύνη και την αγάπη μου γιατί με δέχτηκε με ενθουσιασμό και πίστεψε σε μένα. Θα ήθελα ακόμα να την ευχαριστήσω για τη συνεχή υποστήριξή της, τις συμβουλές της, καθώς και τη συμπαράστασή της στις δυσκολίες που αντιμετώπισα.

-Την Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, κα. **Μαρία Κωνσταντή**, εφόσον συνέβαλε ουσιαστικά στην εκπόνηση αυτής της Διδακτορικής Διατριβής. Η βοήθειά της ήταν πολύτιμη, καθώς αφιέρωσε σε μένα χρόνο μεταδίδοντάς μου την εμπειρία και τις γνώσεις της που αποτέλεσαν βάση για όσα έκανα στη συνέχεια. Η ενασχόλησή μου με τα πειραματόζωα σε σχέση με τη λειτουργία του εγκεφάλου δεν θα ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί χωρίς τη συμβολή της.

-Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακογονιδιοματικής, κ. **Γεώργιο Πατρινό**, για τη συμμετοχή του στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή καθώς και την άριστη συνεργασία του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της Διδακτορικής Διατριβής.

-Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Γενετικής, κ. **Θεολόγο Μιχαηλίδη**, για την πολυεπίπεδη συνεργασία του, τη συνεχή καθοδήγησή του και το ευχάριστο κλίμα που πάντα δημιουργούσε στις συνεργασίες στο εργαστήριο. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ιδιαίτερος για την πολύτιμη βοήθεια σε κάθε πρακτική δυσκολία που συνάντησα κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της διατριβής, καθώς ανέπτυξε συνεχώς ιδέες για την ολοκλήρωση της μελέτης.

-Την κα. **Αργυρώ Σγουρού**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Σχολής Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ανοιχτού Πανεπιστημίου Πατρών, για την άψογη συνεργασία της, τη φιλοξενία στο εργαστήριό της και την εκπαίδευση που μου προσέφερε πάνω σε νέες τεχνολογίες μοριακής ανάλυσης. Την ευχαριστώ επίσης για την ουσιώδη συμμετοχή στη συγγραφή επιστημονικού άρθρου για μέρος των αποτελεσμάτων μας. Επιπλέον, θα ήθελα

να την ευχαριστήσω για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή της ανεξάρτητα από το επιστημονικό κομμάτι.

-Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, κα. **Κατερίνα Αντωνίου**, για τη βοήθειά της με την προσφορά υλικοτεχνικής υποδομής όποτε χρειάστηκε και για τη συνεργασία της τα τελευταία χρόνια σε θέματα με νέες προοπτικές και ιδέες για μελλοντική έρευνα.

-Τον Καθηγητή κ. **Θεόδωρο Φώτση**, για τη συνεργασία του και το ενδιαφέρον που έδειξε για τη διεκπεραίωση μέρος της μελέτης στο εργαστήριό του. Τον ευχαριστώ για την ευγενική του φιλοξενία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

-Τον Dr. **Carsten Wotjak**, υπεύθυνο της επιστημονικής ομάδας «Νευρωνικής Πλαστικότητας» στο Ινστιτούτο Max Planck for Psychiatry, Munich, Germany, για τη δυνατότητα που μου πρόσφερε να διεκπεραιώσω μέρος της μελέτης σε ένα διαφορετικό επιστημονικό περιβάλλον και να διευρύνω τις δεξιότητές μου. Οφείλω να τον ευχαριστήσω για την τρίμηνη υποτροφία που μου εξασφάλισε, αλλά και για τη φιλοξενία και το ευχάριστο κλίμα που φρόντισε να δημιουργήσει για μένα ως νέο μέλος στην ομάδα του.

-Την κα. **Μιχαέλα Φίλιου**, Μεταδιδάκτορα στο Ινστιτούτο Max Planck for Psychiatry, Munich, Germany, για την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφερε, καθώς και τη συμπαράσταση σε προσωπικό επίπεδο κατά την παραμονή μου στο Μόναχο. Πραγματικά της οφείλω πολλά και την ευχαριστώ για τις συμβουλές της στη συγγραφή αυτής της Διδακτορικής Διατριβής και για όλη τη συνεργασία μας η οποία συνεχίζεται.

-Τους κυρίους **Αθανάσιο Βέρρο**, **Αποστόλη Μπίλλη** και Δρ. **Παναγιώτη Λέκκα**, για την άριστη συνεργασία τους σε ότι αφορά το Εκτροφείο Πειραματόζωων και για την προθυμία τους να βοηθούν όπου προέκυπτε ανάγκη.

-Τις κυρίες **Μαρούσα Δαρσινού**, **Αναστασία Ξαγαρά** και **Φωτεινή Μάλλιου**, υποψήφιες Διδάκτορες του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, για την εκμάθηση διαφόρων εργαστηριακών τεχνικών, τη φιλία τους και τη βοήθειά τους σε κάθε τί που χρειάστηκα όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Δρ. **Δημήτριο Κουρούπη**, για την άψογη και ευχάριστη συνεργασία του στη διετέλεση μέρους της μελέτης αυτής της διατριβής.

-Την κα. **Ζωή Παπαδοπούλου**, υποψήφια Διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής, για την αρμονική συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια στο ίδιο εργαστήριο και φυσικά την κατανόηση και τη στήριξή της το τελευταίο διάστημα σε όποια ανάγκη προέκυπτε.

-Την κα. **Ντανιέλα Θεοδωρίδου**, Βιολόγο, απόφοιτη του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, η οποία εκπόνησε τη διπλωματική εργασία της στο εργαστήριο και συνέβαλε ενεργά, με ενθουσιασμό και υπευθυνότητα στην ολοκλήρωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

-Την κα. **Παναγιώτα Κασιούμη**, Διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής και πραγματική φίλη, για παρα πολλά. Είμαι ευγνώμων για την ανεκτίμητης αξίας βοήθειά της σε πρακτικό επίπεδο, για τον κόπο, την ενέργεια και το χρόνο που αφιέρωσε σε μένα στις πιο δύσκολες στιγμές. Την ευχαριστώ ακόμα περισσότερο για τη συγκινητική συμπαράσταση, τις αληθινές συμβουλές και την υπομονή της.

-Τους Διδάκτορες της Ιατρικής Σχολής, κα. **Στεφανία Μάντζιου**, κα. **Βιολέτα Μαλταμπέ** και κ. **Γεώργιο Μαρκόπουλο**, και τις υποψήφιες Διδάκτορες, κα. **Ευγενία Ρουπακιά** και κα. **Ευαγγελία Κοφίδου**, για την αρμονική συνεργασία, την αρωγή τους με τις γνώσεις τους σε εργαστηριακές τεχνικές και προγράμματα, αλλά και για τις ευχάριστες στιγμές όλα αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο.

-Όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιολογίας, Τμήματος Ιατρικής και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, για τη συνολική βοήθεια σε τεχνικό επίπεδο και το προσωπικό της Γραμματείας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων, για τη βοήθειά τους στη διεκπεραίωση των γραφειοκρατικών θεμάτων της Διδακτορικής Διατριβής.

-Τον **Ιωάννη Τσώλη**, ο οποίος βρίσκεται δίπλα μου από την αρχή αυτής της Διδακτορικής Διατριβής και με στηρίζει όλα αυτά τα χρόνια στις επιλογές μου, με υπομονή και κατανόηση στις λογικές και παράλογες στιγμές μου.

-Όλους τους φίλους μου φυσικά, που με στήριξαν στην προσπάθειά μου αυτή. Ειδική αναφορά θα ήθελα να κάνω στα αδέρφια μου, **Δημήτριο Βλάικο** και **Απόστολο Βλάικο** που στέκονται πάντα δίπλα μου με αγνή αγάπη και με ενθαρρύνουν να επιτύχω τους στόχους μου.

-Ωστόσο, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου, **Παναγιώτη Βλάικο** και **Ευαγγελή Δημητρίου**, οι οποίοι με αφοσίωση και ανιδιοτελή αγάπη μου πρόσφεραν τα πάντα και συνεχίζουν να με στηρίζουν σε κάθε επιλογή μου. Τους οφείλω ειλικρινά όσα έχω επιτύχει, διότι χωρίς εκείνους δε θα βρισκόμουν σε αυτή τη θέση σήμερα. Τους ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου που με βοήθησαν αδιάκοπα να βρεθώ ένα βήμα πιο κοντά στο όνειρό μου.

Ιωάννινα, Φεβρουάριος 2017

Αγγελική-Μαρία Βλάικου





## Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
1.1 Το στρες ως εξωγενής περιβαλλοντικός παράγοντας διαταραχής του οργανισμού.....	10
1.2 Στρες και ομοιόσταση .....	10
1.3 Ρόλος ορμονών του άξονα Υποθάλαμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (HPA) στον εγκέφαλο: ιππόκαμπος, αμυγδαλή.....	11
1.4 Υποδοχείς κορτικοειδών (GR/MR) σε απόκριση στο στρες.....	14
1.5 Λειτουργία της αμυγδαλής και του ιππόκαμπου στο στρες.....	16
1.5.1 Αμυγδαλή: η εγκεφαλική δομή που σχετίζεται άμεσα με το συναίσθημα .....	19
1.5.2 Ιππόκαμπος: δομή με έμμεσο ρόλο στο συναίσθημα και άμεσο ρόλο στη μνήμη και μάθηση .....	21
1.6 Επιγενετική ρύθμιση .....	22
1.6.1 Επιγενετική και περιβάλλον .....	23
1.6.2 Μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης .....	24
1.6.3 Μεθυλίωση του DNA.....	26
1.6.4 Μεθυλίωση και γονιδιακή έκφραση.....	27
1.6.5 Οι μεθυλοτρανσφεράσες .....	28
1.7 Ανθρώπινο μοντέλο: πρώιμα στρεσογόνα ερεθίσματα σε συνάρτηση με την ανάπτυξη συμπεριφορικών διαταραχών .....	29
1.8 Ζωικό μοντέλο: μητρική φροντίδα κατά τη μεταγεννητική περίοδο .....	30
1.9 Οι ατομικοί παράγοντες στη διαμόρφωση της απόκρισης στο στρες .....	32
1.9.1 Η σημασία της ατομικότητας στη σύνθετη αλληλεπίδραση γενετικού-επιγενετικού παράγοντα .....	32
1.9.2 Ατομικές επιγενετικές διαφορές.....	32
1.10 Μοριακοί και βιοχημικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με τη μητρική φροντίδα και την απόκριση του άξονα HPA .....	33
1.11 Μόρια που συμμετέχουν στον άξονα HPA και στην απόκριση στο στρες και μεταγραφικοί στόχοι του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών .....	38
<i>NR3C1 (Glucocorticoid Receptor, GR) και NR3C2 (Mineralocorticoid Receptor, MR)</i> .....	38
<i>UBE3A (ubiquitin protein ligase E3A)</i> .....	40
<i>GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper)</i> .....	42
<i>BDNF (brain-derived neurotrophic factor)</i> .....	44
<i>DRD1a (dopamine receptor D1)</i> .....	45

<i>POMC (pro-opiomelanocortin)</i> .....	47
1.12 Φαρμακολογική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών σε κυτταρικό επίπεδο .....	48
1.13 Κυτταρικές σειρές νευρικής ακρολοφίας.....	49
<i>SH-SY5Y</i> .....	50
<i>N2A (Neuro2a)</i> .....	51
<i>BE(2)-C</i> .....	52
<i>HCN</i> .....	53
1.14 Στρες και σύστημα ενδοκανναβινοειδών .....	54
1.14.1 Η συσχέτιση του συστήματος ενδοκανναβινοειδών με τη λειτουργία του άξονα HPA ως απόκριση στο άγχος και το φόβο .....	54
1.14.2 Εντοπισμός του CB1 υποδοχέα και διερευνητική προσέγγιση σύμφωνα με τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται .....	56
1.15 Οξειδωτικό στρες: ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην εξέλιξη νευρολογικών διαταραχών.....	57
1.16 Ο ρόλος των υποδοχέων NMDA και των διαύλων ασβεστίου στη νευρική δυσλειτουργία και τις ψυχικές διαταραχές .....	60
1.17 Μηχανικό στρες, οστεογένεση και σύμπλοκο <i>GNAS</i> .....	61
1.17.1 Επίδραση μηχανικού στρες στη διαδικασία οστεογένεσης μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων .....	61
1.17.2 Επιγενετική ρύθμιση της οστεογένεσης ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα.....	62
1.17.3 Επιγενετική ρύθμιση του συμπλόκου <i>GNAS</i> : πιθανός μηχανισμός ενεργοποίησης της οστεογένεσης στην παθολογία της έκτοπης οστεοποίησης .....	63
2. Σκοπός .....	65
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	67
3.1 Πειραματόζωα.....	68
3.2 Μοντέλο μητρικής αποστέρησης .....	69
3.3 Μελέτες συμπεριφοράς .....	70
3.3.1 Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (open field test- OFT).....	70
3.3.2 Δοκιμασία υπερυψωμένου σταυροειδούς λαβυρίνθου (elevated plus maze- EPM) .....	72
3.4 Θυσία των πειραματόζωων- απομόνωση εγκεφαλικών δομών.....	73
3.5 Κυτταροκαλλιέργεια .....	74
3.5.1 Καλλιέργεια κυττάρων (www.abcam.com) .....	74
3.5.2 Ανακαλλιέργεια των νευροβλαστωματικών κυττάρων με τη χρήση θρυψίνης (www.abcam.com) .....	75
3.5.3 Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer .....	75
3.5.4 Αποθήκευση κυτταρικών σειρών.....	76

3.5.5 Απόψυξη των κυττάρων .....	76
3.5.6 Προέλευση, απομόνωση και καλλιέργεια μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων από ανθρώπινο υποδόριο λίπος (hAT-MSCs).....	77
3.6 Μηχανικό στρες (cell stretching) .....	80
3.7 In vitro φαρμακολογική επίδραση με δεξαμεθαζόνη .....	81
3.8 In vivo φαρμακολογική επίδραση με δέλτα-9-τετραυδροκανναβινόλη ( $\Delta_9$ -THC) .....	82
3.9 Μοριακή ανάλυση δειγμάτων εγκεφαλικού ιστού .....	83
3.9.1 Απομόνωση γενετικού υλικού και πρωτεϊνών .....	83
3.9.1.1 Απομόνωση ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) από εγκεφαλικό ιστό .....	84
3.9.1.2 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα .....	84
3.9.1.3 Απομόνωση δεσοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA).....	85
3.9.1.4 Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ιστό .....	85
3.9.2 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) .....	86
3.9.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	86
3.9.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative real- time PCR-qPCR).....	89
3.9.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	89
3.9.6 Ανάλυση μεθυλίωσης.....	89
3.9.6.1 Χημική τροποποίηση γενωμικού DNA με NaHSO <sub>3</sub> .....	89
3.9.6.2 Ειδική μέθοδος ανάλυσης μεθυλίωσης- Pyrosequencing.....	91
3.9.7 In situ υβριδοποίηση σε κρυοτομές εγκεφάλου με σήμανση <sup>35</sup> S .....	92
3.9.8 Ανάλυση πρωτεϊνών.....	95
3.9.8.1 Φωτομέτρηση πρωτεϊνών- καμπύλη Bradford.....	95
3.9.8.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	96
3.9.8.3 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης .....	97
3.9.8.4 Κάλυψη μη ειδικών θέσεων μεμβράνης (Blocking) .....	97
3.9.8.5 Επώαση με ειδικά αντισώματα.....	97
3.9.8.6 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot).....	99
3.10 Έμμεσος ανοσοφθορισμός (ICC) σε νευρικά κύτταρα .....	99
3.11 Στατιστική και βιοπληροφορική ανάλυση .....	100
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	103
4.1 Επίδραση της δεξαμεθαζόνης στη μορφολογία, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των νευρικών κυττάρων .....	104
4.2 Εγκέφαλος, σύστημα ενδοκανναβινοειδών και άξονας HPA .....	119

4.3 Στρες, εγκέφαλος, μιτοχόνδρια και υποδοχείς ασβεστίου .....	120
4.4 Μητρική αποστέρηση, πρόωρος απογαλακτισμός και άξονας HPA .....	126
4.4.1 Καταμέτρηση βάρους .....	127
4.4.2 Συμπεριφορικές δοκιμασίες .....	140
4.4.3 Μοριακά αποτελέσματα .....	149
4.5 Μηχανικό στρες, πρότυπο μεθυλίωσης <i>GNAS</i> και οστεογένεση .....	165
4.5.1 Χαρακτηρισμός της μορφολογίας και επιφανειακός φαινότυπος των καλλιεργούμενων κυττάρων hAT-MSCs .....	166
4.5.2 Επιδράσεις του μηχανικού στρες στη μορφολογία και τη διαφοροποίηση των hTA-MSCs	167
4.5.3 Το μηχανικό ερέθισμα προάγει την DNA απομεθυλίωση στις περιοχές των υποκινητών των οστεο- ειδικών ισομορφών του <i>GNAS</i> .....	169
4.5.4 Οι αλλαγές σε επίπεδο μεθυλίωσης συνδέονται με τις συνέπειες της κυτταρικής διάταξης και τα μοτίβα των προσδεόμενων παραγόντων CTCF.....	171
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	175
5.1 Μελέτη της επίδρασης των γλυκοκορτικοειδών στην έκφραση και επιγενετική ρύθμιση των γονιδίων <i>NR3C1</i> και <i>UBE3A</i> σε νευροβλαστωματικές κυτταρικές σειρές.....	176
5.2 Μελέτη της έκφρασης μορίων που συμμετέχουν με άμεσο ή έμμεσο τρόπο στη ρύθμιση του άξονα HPA κατά την απόκριση του οργανισμού στα κανναβινοειδή .....	179
5.3 Διερεύνηση της έκφρασης πρωτεϊνών μιτοχονδριακής λειτουργίας στο εγκέφαλο ζώων διαφορετικού προφίλ άγχους.....	180
5.4 Μεταβολές στα πρότυπα έκφρασης μορίων που συνδέονται με τη λειτουργία του άξονα HPA σε ένα πειραματικό μοντέλο μητρικής αποστέρησης.....	183
5.5 Μελέτη της επίδρασης του μηχανικού στρες (stretch) στον επαναπρογραμματισμό διαφοροποίησης ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (hAT-MSCs) και διερεύνηση του προτύπου μεθυλίωσης του γονιδίου <i>GNAS</i> .....	188
6. Συμπεράσματα – Μελλοντικοί στόχοι .....	191
7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	193
7.1 Περίληψη .....	194
7.2 Abstract .....	196
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	199

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### **1.1 Το στρες ως εξωγενής περιβαλλοντικός παράγοντας διαταραχής του οργανισμού**

Ως στρες ορίζουμε την απόκριση ενός οργανισμού σε έναν εξωγενή παράγοντα όπως μια περιβαλλοντική συνθήκη ή ερέθισμα και αποτελεί ένα μηχανισμό προσαρμογής του οργανισμού σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα που διαταράσσουν την ομοιόσταση. Τα ερεθίσματα αυτά ή αλλιώς στρεσογόνοι παράγοντες, μπορεί να είναι είτε άμεσα, όπως επικείμενη απειλή της ζωής, είτε έμμεσα, όπως απουσία αγαπημένων ανθρώπων ή αντικειμένων που εμπνέουν ασφάλεια. Το άγχος μπορεί να συμβάλλει στην αντιμετώπιση δύσκολων καταστάσεων. Από την άλλη, το υπερβολικό και χρόνιο άγχος, το οποίο αποτελεί παθολογική κατάσταση, προκαλείται από γεγονότα που δεν αποτελούν πραγματικό κίνδυνο. Βασικό χαρακτηριστικό των στρεσογόνων διαταραχών είναι ο αυξημένος φόβος, ο οποίος συνοδεύεται από υποκειμενικές εκδηλώσεις στον άνθρωπο και αντικειμενικές εκδηλώσεις, σε ζωικά μοντέλα και ανθρώπους εξίσου. Οι υποκειμενικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν αυξημένη εγρήγορση έως έντονο φόβο επικείμενης καταστροφής, ενώ οι αντικειμενικές περιλαμβάνουν αυξημένο καρδιακό ρυθμό, μεταβολές της αναπνοής, τάσεις διερεύνησης και εγρήγορση, απότομες νευρικές αντιδράσεις, ανησυχία και φαινόμενα ακινητοποίησης. Τα στρεσογόνα ερεθίσματα, μεταβάλλουν το εσωτερικό περιβάλλον του οργανισμού και γίνονται συνειδητά αντιληπτά μέσω των συναισθημάτων.

### **1.2 Στρες και ομοιόσταση**

Είναι γενικώς παραδεκτή η εμπλοκή του στρες σε διάφορες νευροψυχιατρικές διαταραχές συνοδευόμενη από την εμφάνιση ανωμαλιών στην ανάπτυξη της κοινωνικής συμπεριφοράς. Παρόλα αυτά δεν έχει διαλευκανθεί έως τώρα πλήρως ο μηχανισμός που υποστηρίζει αυτή τη συσχέτιση. Οι περισσότεροι οργανισμοί, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, έχουν αναπτύξει ένα ιδιαίτερα περίπλοκο σύστημα το οποίο επιτρέπει την απόκριση σε εσωτερικά ή εξωτερικά ερεθίσματα με φυσιολογικές διεργασίες και τη συμμετοχή πληθώρας ορμονών και νευροδιαβιβαστών. Κύριος στόχος του συστήματος αυτού είναι η διατήρηση της λειτουργίας του ομοιοστατικού μηχανισμού ώστε να καταφέρνει ο οργανισμός να επιστρέφει σε ηρεμία κάθε φορά που δέχεται ένα οξύ ή χρόνιο στρεσογόνο ερέθισμα (1). Πολλά όργανα συμμετέχουν στις διεργασίες αυτές, με

βασικότερο τον εγκέφαλο. Οι βασικοί νευρωνικοί μηχανισμοί οι οποίοι διατηρούν την ομοιόσταση εντοπίζονται στον υποθάλαμο και στα εκτελεστικά του συστήματα, δηλαδή το αυτόνομο νευρικό και το ενδοκρινικό σύστημα. Ο υποθάλαμος δρα στο αυτόνομο νευρικό σύστημα τροποποιώντας τα σπλαγχικά αντανακλαστικά κυκλώματα. Το 1932 ο Ranson ερεθίζοντας διάφορες περιοχές του υποθαλάμου αναισθητοποιημένων ζώων προκάλεσε αντιδράσεις του αυτόνομου νευρικού συστήματος, όπως μεταβολές του καρδιακού ρυθμού, της αρτηριακής πίεσης, ανόρθωση των τριχών και σύσπαση της ουροδόχου κύστης αλλά και κινητικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα. Επιπλέον, ηλεκτρική διέγερση του υποθαλάμου οδήγησε σε αποκρίσεις του σωματικού νευρικού συστήματος, όπως ανόρθωση της ουράς και τοξοειδής θέση της ράχης σε γάτες (2). Από τις παραπάνω χαρακτηριστικές για το θυμό αντιδράσεις, προκύπτει πως ο υποθάλαμος δεν είναι απλώς ένας κινητικός πυρήνας για το αυτόνομο νευρικό σύστημα αλλά ένα συντονιστικό κέντρο που ολοκληρώνει τα προσαγωγά σε αυτό σήματα και οργανώνει τη συναισθηματική απόκριση στα περιφερειακά όργανα. Οι πληροφορίες που σχετίζονται με το συναίσθημα φτάνουν έμμεσα από τον υποθάλαμο και την αμυγδαλή, αλλά και άμεσα από τα περιφερειακά όργανα στο φλοιό των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Το νευροανατομικό σύστημα που είναι υπεύθυνο για την αντίληψη και έκφραση των συναισθημάτων, και κατ' επέκταση για τη δημιουργία της μνήμης είναι το μεταιχμιακό ή στεφανιαίο (limbic) σύστημα. Το μεταιχμιακό σύστημα αποτελείται από το μεταιχμιακό λοβό και τις εν τω βάθει δομές του. Ο μεταιχμιακός λοβός περιλαμβάνει δομές όπως η έλικα του προσαγωγίου, η παραϊπποκάμπεια έλικα και ο ιπποκάμπειος σχηματισμός. Ο Paul MacLean επέκτεινε την έννοια του μεταιχμιακού συστήματος, περιλαμβάνοντας σε αυτή μεταξύ άλλων, μέρη του υποθαλάμου, τον επικλινή πυρήνα και κυρίως την αμυγδαλή (3).

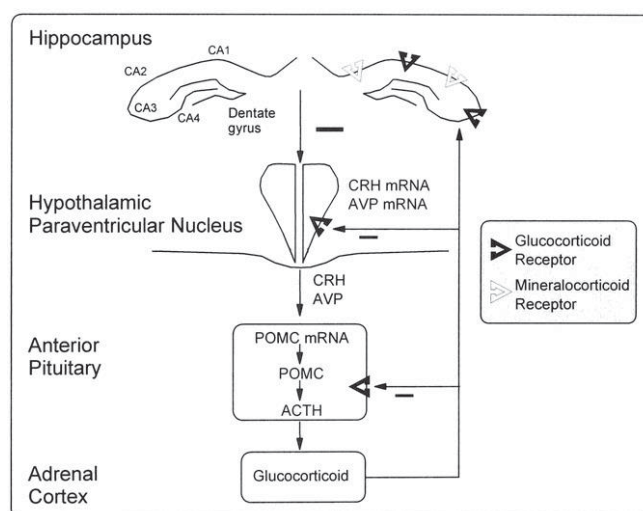
### **1.3 Ρόλος ορμονών του άξονα Υποθάλαμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (HPA) στον εγκέφαλο: ιππόκαμπος, αμυγδαλή**

Η απόκριση στο στρες περιλαμβάνει την ενεργοποίηση συστημάτων όπως το ενδοκρινικό, το νευρικό και το ανοσοποιητικό. Τα όργανα που συμμετέχουν στην ομοιοστατική ρύθμιση του οργανισμού κατά την έκθεση σε στρεσογόνα περιβαλλοντικά σήματα εντοπίζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στους περιφερικούς ιστούς. Οι δομές του εγκεφάλου που έχουν βασικό ρόλο, είναι ο παρακοιλιακός πυρήνας

(paraventricular nucleus, PVN) του υποθαλάμου (hypothalamus), ο πρόσθιος λοβός (anterior hypophysis) της υπόφυσης (pituitary) και τα επινεφρίδια (adrenal glands). Τα όργανα αυτά αποτελούν τον άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (HPA axis). Η υπόφυση συνδέεται με τον υποθάλαμο μέσω ενός μίσχου, του χοανοειδούς δακτυλίου, ο οποίος περιέχει νευρικές ίνες και αιμοφόρα αγγεία. Στους ανθρώπους, η υπόφυση αποτελείται από δύο λοβούς, την πρόσθια υπόφυση ή αδενούπόφυση και την οπίσθια υπόφυση ή νευροϋπόφυση. Σε αρκετά θηλαστικά, μεταξύ των δύο αυτών λοβών περιλαμβάνεται και ένας τρίτος. Οι ορμόνες του υποθαλάμου, που ονομάζονται εκλυτικές ορμόνες του υποθαλάμου μεταφέρονται στην πρόσθια υπόφυση. Έτσι μια εκλυτική ορμόνη του υποθαλάμου ελέγχει την έκκριση μιας ορμόνης της πρόσθιας υπόφυσης, η οποία ρυθμίζει την έκκριση μιας άλλης ορμόνης από κάποιο ενδοκρινή αδένα στην περιφέρεια. Η ακολουθία αυτή έχει μεγάλη προσαρμοστική αξία, αφού επιτρέπει πολλαπλές ορμονικές ανατροφοδοτήσεις. Συγκεκριμένα, ο παρακοιλιακός πυρήνας του υποθαλάμου συνθέτει και εκκρίνει κορτικοεκλυτίνη (CRH) και αργινίνη-βασοπρεσσίνη (AVP), οι οποίες, σε απόκριση στο στρες, απελευθερώνονται και καταλήγουν στην αδενούπόφυση. Εκεί προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς και επάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου της προ-οπιομελανοκορτίνης (POMC), η οποία διασπάται ενζυμικά σε κορτικοτροπίνη (ACTH) και απελευθερώνεται στην κυκλοφορία (4). Τα κύτταρα στόχοι της ACTH βρίσκονται στα επινεφρίδια, στα οποία κατόπιν πρόσδεσης, επάγεται η σύνθεση και έκφραση γλυκοκορτικοειδών (Εικόνα 1.3.1). Τα γλυκοκορτικοειδή, η κορτιζόλη στον άνθρωπο και η κορτικοστερόνη στα τρωκτικά, αποτελούν μια υποκατηγορία στεροειδών ορμονών που ρυθμίζουν μεταβολικές, ανοσολογικές, συμπεριφορικές και καρδιαγγειακές διαδικασίες. Όταν τα γλυκοκορτικοειδή φτάσουν με την κυκλοφορία του αίματος στα όργανα στόχους και προσδεθούν στους υποδοχείς τους, GR (glucocorticoid receptor) και MR (mineralocorticoid receptor), τους ενεργοποιούν ώστε να δράσουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Με τον τρόπο αυτό ο άξονας Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων ρυθμίζεται μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης (5). Στο σύστημα αυτό, οι ορμόνες και οι νευροδιαβιβαστές που εκκρίνονται διαδραματίζουν βασικές λειτουργίες ανταλλαγής πληροφοριών για ότι συμβαίνει στο σώμα μας (6). Η ακολουθία των γεγονότων που ενεργοποιεί τον αρνητικό επανατροφοδοτικό μηχανισμό στον άξονα HPA είναι η εξής: όταν ένα στρεσογόνο ερέθισμα εμφανιστεί, εκκρίνεται ο νευροδιαβιβαστής επινεφρίνη, ή κοινώς αδρεναλίνη, από τα επινεφρίδια. Η αδρεναλίνη δίνει σήμα στον υποθάλαμο να απελευθερώσει την ορμόνη CRH, μια μικρή πρωτεΐνη που



διεγείρει την υπόφυση και προάγει την έκκριση της κορτιζόλης (CORT) στα επινεφρίδια και την απελευθέρωσή της στην κυκλοφορία του αίματος. Όσο πιο έντονο είναι το στρεσογόνο ερέθισμα τόσο μεγαλύτερη η παραγωγή της CRH στον εγκέφαλο και η έκκριση κορτιζόλης στα επινεφρίδια. Όταν αναγνωριστεί μεγάλη συγκέντρωση της ορμόνης αυτής, ο υποθάλαμος ελαττώνει την παραγωγή CRH και επομένως επιτρέπει την ελεγχόμενη περαιτέρω έκκριση κορτιζόλης από τα επινεφρίδια. Με αυτό τον τρόπο λειτουργεί ο μηχανισμός αρνητικής επανατροφοδοτικής ρύθμισης στον άξονα του (HPA) και καταφέρνει ο οργανισμός φυσιολογικά να ξεπερνά τα επεισόδια στρες (1).



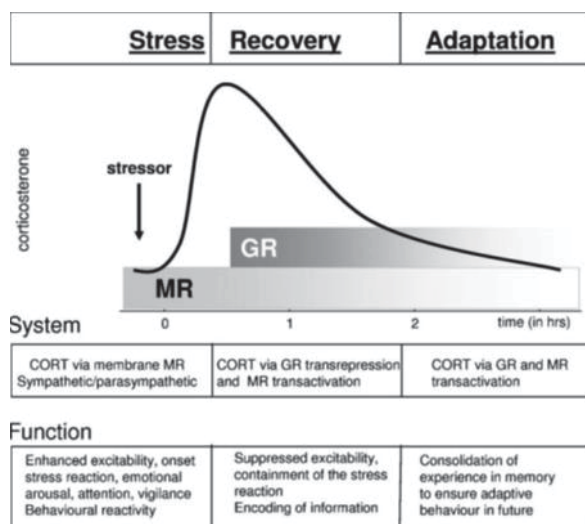
**Εικόνα 1.3.1: Σχηματική αναπαράσταση του άξονα HPA.** Τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν αρνητική ανάδραση (7).

Η κορτιζόλη είναι η βασική στεροειδής ορμόνη και αποτελεί μέλος της οικογένειας των γλυκοκορτικοειδών (GC) που παράγονται στη φλοιώδη περιοχή των επινεφριδίων και ρυθμίζουν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Ο τρόπος με τον οποίο καταφέρνει η κορτιζόλη να ξεκινήσει την ελεγχόμενη ρύθμιση στον υποθάλαμο, είναι μέσω της πρόσδεσης στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ακριβώς τη συμπληρωματική δομή σε αυτή των γλυκοκορτικοειδών και βρίσκονται στα περισσότερα κύτταρα του εγκεφάλου, με αφθονία στους νευρώνες του υποθάλαμου και του ιπόκαμπου. Η παρουσία τους επιτρέπει στα κύτταρα να αποκρίνονται στην κορτιζόλη με τον εξής τρόπο: σε καταστάσεις ηρεμίας οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών κυκλοφορούν ελεύθεροι και ανενεργοί στο κυτταρόπλασμα. Όταν αναγνωρίσουν μόρια γλυκοκορτικοειδών προσδένονται πάνω τους και σχηματίζουν σύμπλοκα GR-GC. Αμέσως μετά τη δημιουργία του συμπλόκου, το κύτταρο επιτρέπει δομικά τη μεταφορά του μέσα στον πυρήνα όπου

καθίστανται δυνατή η πρόσδεση του συμπλόκου στο DNA για να λειτουργήσει σαν μεταγραφικός παράγοντας. Τα γλυκοκορτικοειδή σε συνεργασία με τους υποδοχείς τους μπορούν να διαδραματίσουν διαφορετικούς ρόλους σε διαφορετικά κύτταρα, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή πολλών διαφορετικών γονιδίων (8). Όταν αυτά τα σύμπλοκα σχηματίζονται στα κύτταρα του υπόκαμπου καταστέλλεται η έκφραση του γονιδίου CRH και μειώνεται η παραγωγή της αντίστοιχης ορμόνης στον υποθάλαμο (9, 10).

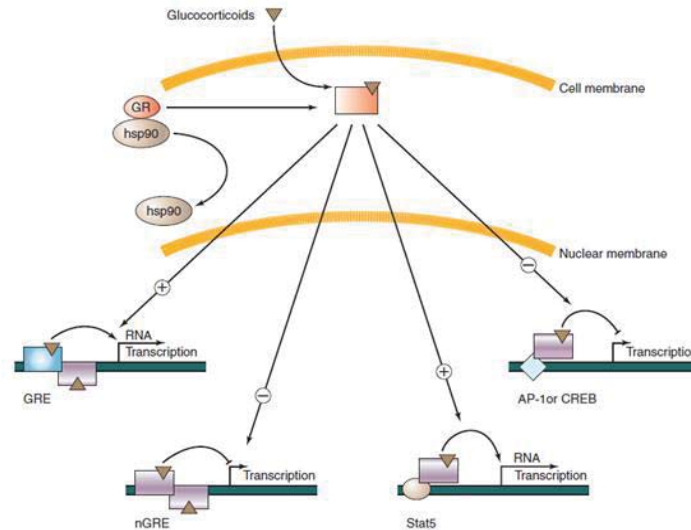
#### **1.4 Υποδοχείς κορτικοειδών (GR/MR) σε απόκριση στο στρες**

Οι ειδικοί για τα κορτικοειδή υποδοχείς (GR, MR) εμφανίζουν διαφορετική συγγένεια για τους προσδέτες τους. Συγκεκριμένα, ο υποδοχέας MR έχει δεκαπλάσια συγγένεια για τα γλυκοκορτικοειδή συγκριτικά με τον GR. Συνεπώς, οι MR υποδοχείς είναι κορεσμένοι και σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών, γεγονός που συμβαίνει κατά τους κirkάδιους κύκλους. Συγκεκριμένα, στον άνθρωπο και σε συνθήκες ηρεμίας, η συγκέντρωση κορτιζόλης αυξάνεται νωρίς το πρωί, ενώ στα τρωκτικά, εξαιτίας του ότι είναι νυκτόβια, η συγκέντρωση κορτικοστερόνης αυξάνεται νωρίς το απόγευμα. Οι GR υποδοχείς κοραίνονται σε γλυκοκορτικοειδή κατά την απόκριση στο στρες. Συνεπώς, κατά την ενεργοποίηση του HPA άξονα, τα γλυκοκορτικοειδή προσδένονται πρώτα στους MR υποδοχείς κι έπειτα στους GR (Εικόνα 1.4.1) (11). Σε νευρώνες που εκφράζουν εξίσου GR και MR, όπως αυτοί του υπόκαμπου και της αμυγδαλής, είναι πιθανό να σχηματίζονται ετεροδιμερή υποδοχέων με ενδιάμεση συγγένεια. Ο υποδοχέας GR εκφράζεται σε όλους τους ιστούς του οργανισμού, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, αλλά σε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης. Για την επιτυχή αρνητική ανατροφοδότηση του άξονα HPA, οι δομές του εγκεφάλου όπου εκφράζεται περισσότερο ο GR είναι ο παρακοιλιακός πυρήνας του υποθαλάμου και ο υπόκαμπος, ο οποίος ασκεί έμμεση αρνητική ανάδραση στον υποθάλαμο μέσω GABA-εργικών κυκλωμάτων.



**Εικόνα 1.4.1: Στάδια απόκρισης στο στρες.** Οι υποδοχείς GR και MR προσδέουν μόρια κορτικοστερόνης σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (11).

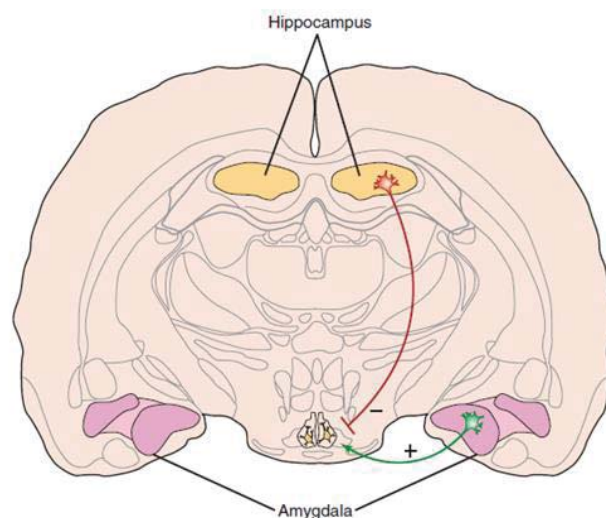
Η έκφραση του υποδοχέα MR είναι περιορισμένη συγκριτικά με την έκφραση του υποδοχέα GR. Εκτός από τον εγκέφαλο, εντοπίζεται στους νεφρούς, στο έντερο και στην καρδιά. Η πρόσδεση των ορμονών στους υποδοχείς, οδηγεί στην απελευθέρωσή τους από τις συνοδούς πρωτεΐνες (heat shock proteins), με τις οποίες σχηματίζουν ετερο- ολιγομερή σύμπλοκα στο κυτταρόπλασμα. Ακολουθεί η είσοδός τους στον πυρήνα, όπου ως ομοδιμερή ή ετεροδιμερή προσδέονται στις ειδικές αλληλουχίες GREs (Glucocorticoid Response Elements), που αποτελούν τις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων. Εναλλακτικά, μπορούν να επηρεάσουν τη δράση άλλων μεταγραφικών παραγόντων ή να αναστείλουν τους NF-κB και CREB (Εικόνα 1.4.2). Τα γλυκοκορτικοειδή, είναι ικανά να καταστείλουν το ανοσοποιητικό σύστημα μειώνοντας τη σύνθεση και απελευθέρωση κυτοκινών. Επιπλέον, δρουν σε συνεργασία με το συμπαθητικό νευρικό σύστημα για να ενεργοποιήσουν τις αποθήκες ενέργειας κατά την αντίδρασης μάχης ή φυγής (flight or fight response) η οποία είναι η τυπική αντίδραση στις συνθήκες περιβαλλοντικού στρες. Σε αυτές τις καταστάσεις ενεργοποιείται το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, οδηγώντας σε απελευθέρωση επινεφρίνης και νορεπινεφρίνης με αποτέλεσμα αύξηση του καρδιακού ρυθμού και της πίεσης του αίματος. Ταυτόχρονα, τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν τη διέγερση και επαγρύπνηση, σε καταστάσεις στρες, μέσω μονοαμινεργικών συστημάτων, κάτι που αιτιολογεί τη δημιουργία μνήμης στις περιπτώσεις αυτές.



**Εικόνα 1.4.2:** Δράση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών μετά την είσοδο στο κύτταρο (E.J. Nestler, *Molecular Neuropharmacology: A foundation for clinical neuroscience*, 2<sup>nd</sup> edition, McGrawHill Medical (2009).

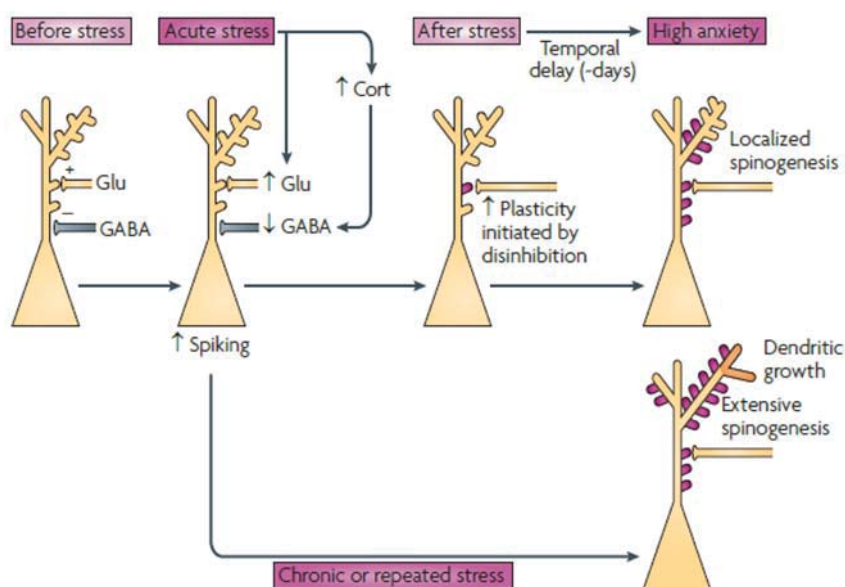
### 1.5 Λειτουργία της αμυγδαλής και του ιππόκαμπου στο στρες

Η ρύθμιση του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων γίνεται εξίσου από την αμυγδαλή και τον ιππόκαμπο. Τα προσαγωγά στον άξονα σήματα περιλαμβάνουν διεγερτικούς νευρώνες από την αμυγδαλή και ανασταλτικούς από τον ιππόκαμπο (Εικόνα 1.5.1).



**Εικόνα 1.5.1:** Ρύθμιση του άξονα HPA στον εγκέφαλο του επίμου. Ανασταλτικά σήματα από τον ιππόκαμπο και διεγερτικά από την αμυγδαλή (E.J. Nestler, *Molecular Neuropharmacology: A foundation for clinical neuroscience*, 2<sup>nd</sup> edition, McGrawHill Medical (2009).

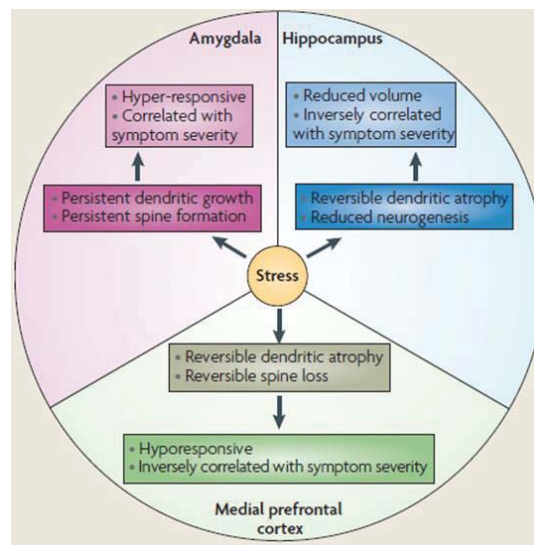
Το περιβαλλοντικό στρες μεταφράζεται από την αμυγδαλή σε συμπεριφορική απόκριση με τη βοήθεια της CRH. Συγκεκριμένα, σε ένα χαρακτηριστικό πείραμα σε επίμυες, η επαναλαμβανόμενη έγχυση ουροκορτίνης (urocortin), η οποία δρα ως αγωνιστής του υποδοχέα της CRH στην αμυγδαλή, οδήγησε σε εμμένουσα αύξηση της απόκρισης στο στρες (12). Στους νευρώνες αυτούς, κατόπιν ηλεκτροφυσιολογικής καταγραφής, παρατηρήθηκε μείωση των ανασταλτικών μετασυναπτικών δυναμικών, που οδήγησε σε υπερενεργοποίηση της αμυγδαλής. Ο χειρισμός της νευρωνικής και συναπτικής δραστηριότητας μπορεί να δημιουργήσει μόνιμες αλλαγές στα κυκλώματα της αμυγδαλής, δημιουργώντας κυτταρικές μνήμες (πλαστικότητα) (13). Ένα στρεσογόνο ερέθισμα (ακινητοποίηση) διάρκειας δύο ωρών, είναι ικανό να οδηγήσει σε αύξηση της πυκνότητας των ακάνθων των νευρώνων της αμυγδαλής και σε αποκρίσεις του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Σε αντίθεση με το οξύ στρες, χρόνια έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες οδήγησε σε δενδριτική αύξηση και δημιουργία νέων ακάνθων στους κύριους νευρώνες της βασοπλευρικής περιοχής της αμυγδαλής (Εικόνα 1.5.2) (14).



**Εικόνα 1.5.2:** Επιδράσεις οξέως και χρόνιου στρες στους νευρώνες της αμυγδαλής (14).

Οι επιδράσεις του χρόνιου στρες στην αμυγδαλή είναι τόσο σημαντικές που ακόμη και μετά από 21 ημέρες ηρεμίας των ζώων, χωρίς έκθεση σε στρεσογόνα

ερεθίσματα, τα ζώα διατήρησαν το φαινότυπο της προηγούμενης απόκρισης σε στρες. Επιπλέον, η υπερτροφία δενδριτών παρέμεινε αμετάβλητη (15). Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό πως οι επιδράσεις των στρεσογόνων παραγόντων στην αμυγδαλή επηρεάζουν τη δημιουργία μνήμης. Τα στρεσογόνα ερεθίσματα ασκούν διαφορετικές επιδράσεις και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο ιππόκαμπος και ο προμετωπιαίος φλοιός (Εικόνα 1.5.3) (13).

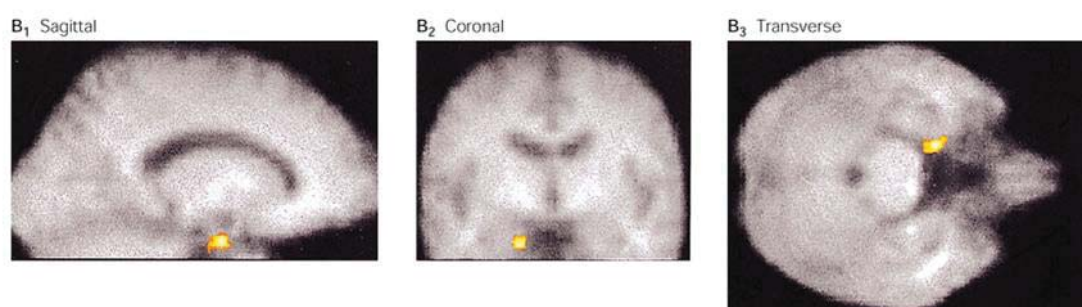


**Εικόνα 1.5.3:** Δομικές αλλαγές στις περιοχές του εγκεφάλου που επηρεάζονται από το στρες (13).

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ο σημαντικός και πολύπλοκος ρόλος της αμυγδαλής στην απόκριση στο στρες. Εκτός αυτού, φαίνεται πως υπάρχει μια δυναμική σχέση και αλληλεπίδραση των στρεσογόνων ερεθισμάτων και της αμυγδαλής. Οι αποκρίσεις της αμυγδαλής στο στρες συζεύγνυνται με άλλες δομές του εγκεφάλου οι οποίες διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην επαναφορά της ομοιόστασης. Περαιτέρω μελέτη των μηχανισμών αυτών θα βοηθούσε στην κατανόηση διαδικασιών όπως το στρες και η δημιουργία μνήμης αλλά και στην αντιμετώπιση ψυχιατρικών διαταραχών που σχετίζονται με το στρες.

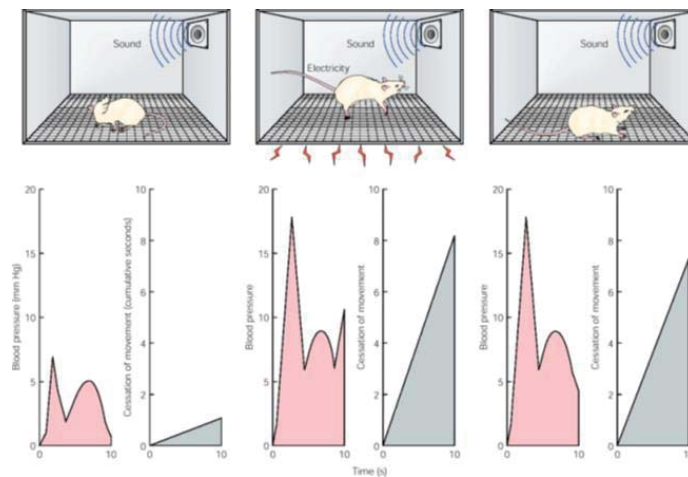
### 1.5.1 Αμυγδαλή: η εγκεφαλική δομή που σχετίζεται άμεσα με το συναίσθημα

Η αμυγδαλή (ή αμυγδαλοειδές σύμπλεγμα) αποτελείται από μια ομάδα περίπου 13 διακριτών πυρήνων και βρίσκεται στο βάθος του κροταφικού λοβού του εγκεφαλικού ημισφαιρίου. Οι πυρήνες αυτοί μπορούν να ομαδοποιηθούν ανάλογα με τις λειτουργίες και τις συνδέσεις τους στη βασοπλευρική περιοχή (basolateral amygdala, BLA) και την κεντρική περιοχή (central amygdala, CeA). Η αμυγδαλή συνδέεται με το θάλαμο, τον υποθάλαμο και τον ιπποκάμπειο σχηματισμό. Είναι η περιοχή του εγκεφάλου που σχετίζεται περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη με το συναίσθημα και πιο ειδικά με το άγχος. Ο ρόλος της είναι να συντονίζει τις αυτόνομες και τις ενδοκρινικές αποκρίσεις, σε συνδυασμό με τις συναισθηματικές καταστάσεις. Μελέτες που έγιναν το 1996 από τον Morris και την ομάδα του, έδειξαν με τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) και λειτουργική μαγνητική τομογραφία (fMRI) πως η αναγνώριση των συναισθηματικών εκφράσεων του προσώπου σχετίζεται άμεσα με την αμυγδαλή (16). Συγκεκριμένα, από τα εξεταζόμενα άτομα ζητήθηκε να αναγνωρίσουν τις εκφράσεις φόβου ή ευτυχίας σε φωτογραφίες προσώπων. Παρατηρήθηκαν εντονότερες αποκρίσεις στην αμυγδαλή του αριστερού ημισφαιρίου των ερωτηθέντων για τις εκφράσεις φόβου, παρά για τις εκφράσεις ευτυχίας. Επίσης όσο αυξανόταν η έκφραση του φόβου στις φωτογραφίες, τόσο αυξανόταν η απόκριση στην αριστερή αμυγδαλή των ερωτηθέντων, ενώ μειωνόταν με την αυξανόμενη έκφραση ευτυχίας. Η αμυγδαλή δέχεται σήματα από τον κάτω κροταφικό φλοιό, ο οποίος κωδικοεύει τις αποκρίσεις στα ερεθίσματα που επάγουν το συναίσθημα. Λόγω των ισχυρών συνδέσεών της με το αυτόνομο νευρικό σύστημα, η αμυγδαλή διεκπεραιώνει συναισθηματικές αποκρίσεις σε οπτικά ερεθίσματα (Εικόνα 1.5.4).



**Εικόνα 1.5.4:** Οι αποκρίσεις στην αμυγδαλή του αριστερού ημισφαιρίου ήταν εντονότερες για τις εκφράσεις φόβου (16).

Η αμυγδαλή ευθύνεται επίσης για την επίκτητη συναισθηματική συμπεριφορά. Αυτό αποδείχθηκε το 1994 από τον LeDoux με ένα πείραμα κλασικής εξαρτημένης μάθησης του φόβου (17). Παρόλα αυτά, βλάβες του συμπλέγματος του βασικού-έξω αμυγδαλικού πυρήνα καταργούν την επίκτητη αυτή απόκριση στο φόβο. Η κλασική εξαρτημένη μάθηση του φόβου μπορεί να δειχθεί με τη σύζευξη ενός ήχου με ήπια ηλεκτροπληξία στα πόδια επίμυος. Αρχικά ο επίμυος ακούει έναν ήχο, ο οποίος έχει ελάχιστη επίδραση στο αυτόνομο νευρικό του σύστημα. Έπειτα, ο ήχος συνδυάζεται με την ηλεκτρική εκκένωση, η οποία προκαλεί πόνο, φόβο, ακινητοποίηση και αυτόνομες αποκρίσεις. Μετά από αρκετές επαναλήψεις, το ζώο έχει εξάρτηση φόβου από τον ήχο, οπότε σε κάθε άκουσμα του ήχου επέρχεται ακινητοποίηση, καθήλωση και αύξηση της αρτηριακής πίεσης, χωρίς να υπάρχει ηλεκτρική εκκένωση (Εικόνα 1.5.5).

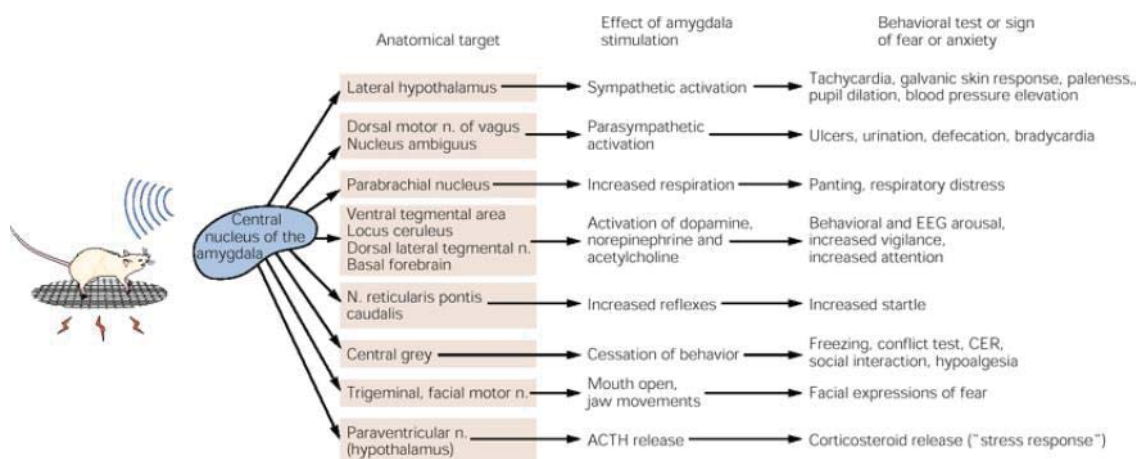


**Εικόνα 1.5.5:** Η κλασική εξαρτημένη μάθηση του φόβου προκύπτει από σύζευξη ενός ήχου με ήπια ηλεκτροπληξία στα πόδια του ζώου (17).

Η αμυγδαλή, κατά την εκμάθηση αυτή, δέχεται ηχητική πληροφορία άμεσα από τον ακουστικό θάλαμο αλλά και έμμεσα από τις πρωτοταγείς αισθητήριες περιοχές του φλοιού. Σε πολλές περιπτώσεις, πληροφορία που φτάνει στην αμυγδαλή από το θάλαμο, είναι πολύ σημαντική, διότι μπορεί να προκαλέσει ταχείες αποκρίσεις που είναι απαραίτητες σε καταστάσεις κινδύνου. Συγκεκριμένα, πληροφορίες από τους βασικούς-έξω πυρήνες φτάνουν στον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής κι από εκεί ρυθμίζουν συμπεριφορικά, αυτόνομα και ενδοκρινικά συστήματα ελέγχου της συναισθηματικής



απόκρισης. Επίσης ο κεντρικός πυρήνας της αμυγδαλής επικοινωνεί με τον βασικό πυρήνα, ο οποίος προβάλλει σε περιοχές του φλοιού και επηρεάζει τη λήψη αποφάσεων. Εκτός όμως από το ρόλο της στο φόβο και σε αρνητικές καταστάσεις, η αμυγδαλή σχετίζεται και με ευχάριστες συναισθηματικές αντιδράσεις. Η αμυγδαλή λοιπόν έχει διπλή λειτουργία. Είναι υπεύθυνη αφενός για τη μη συνειδητή συναισθηματική κατάσταση και αφετέρου για το συνειδητό συναίσθημα. Οι αυτόνομες εκδηλώσεις της συναισθηματικής κατάστασης ολοκληρώνονται από την αλληλεπίδραση της αμυγδαλής με τον υποθάλαμο. Οι συνειδητές αποκρίσεις στο συναίσθημα οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις της αμυγδαλής με την έλικα του προσαγωγίου και τον προμετωπιαίο φλοιό. Επίσης, οι πυρήνες της αμυγδαλής συνδέονται αμοιβαία με το εγκεφαλικό στέλεχος, τον ιππόκαμπο και το θάλαμο (Εικόνα 1.5.6) (18).



**Εικόνα 1.5.6:** Συνδέσεις του κεντρικού αμυγδαλικού πυρήνα με περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με το φόβο και το στρες (18).

### 1.5.2 Ιππόκαμπος: δομή με έμμεσο ρόλο στο συναίσθημα και άμεσο ρόλο στη μνήμη και μάθηση

Ο ιππόκαμπος είναι μια εν τω βάθει δομή του κροταφικού λοβού των εγκεφαλικών ημισφαιρίων. Συμμετέχει στη μάθηση, τη δημιουργία μνήμης, τον προσανατολισμό και την απόκριση στο στρες. Ο ιππόκαμπος αποτελείται από τρεις κύριες προσαγωγές οδούς. Η πρώτη οδός είναι η διατριταίνουσα, η οποία προβάλλει από τον ενδορρινικό φλοιό στα κοκκιοειδή κύτταρα της οδοντωτής έλικας. Η δεύτερη, είναι η οδός των βρυωδών ινών, η οποία περιλαμβάνει τους νευράξονες των κοκκιοειδών κυττάρων και οι οποίοι καταλήγουν στα πυραμιδοειδή κύτταρα της περιοχής CA3 του ιππόκαμπου.

Τρίτη και τελευταία οδός του ιππόκαμπου, είναι η παράπλευρη οδός του Schaffer, που αποτελείται από τα πυραμιδοειδή κύτταρα της περιοχής CA3, τα οποία καταλήγουν στην περιοχή CA1. Οι τρεις αυτές οδοί έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη μακρόχρονη ενδυνάμωση (Long- Term Potentiation/ LTP) και τη δημιουργία μνήμης. Η LTP αποτελεί τον βασικό μηχανισμό δημιουργίας μακροχρόνιας μνήμης στον εγκέφαλο που καθιστά τη δομή του ιππόκαμπου βασικό στόχο έρευνας της νευροφυσιολογίας. Οι άνθρωποι με βλάβες στον ιππόκαμπο εμφανίζουν αδυναμία να συγκρατούν νέες πληροφορίες και αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχει σχέση του μεγέθους του ιππόκαμπου και της μνήμης (19). Ο πρώτος διαγνωστικός δείκτης για τη νόσο Alzheimer's είναι ο όγκος της δομής αυτής στα εγκεφαλικά ημισφαίρια, ενώ σχετική έρευνα έδειξε ότι η αερόβια άσκηση βοηθά στη βελτίωση του όγκου του ιππόκαμπου σε ανθρώπους μέσης ηλικίας, βοηθώντας και στον προσανατολισμό τους στο χώρο (20). Οι νευρώνες του ιππόκαμπου περιέχουν μεγάλο αριθμό υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών οι οποίοι είναι ευάλωτοι σε καταστάσεις χρόνιου στρες. Ενώ υπό κανονικές συνθήκες ο ιππόκαμπος είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση της έκκρισης κορτιζόλης, η χρόνια περίσσεια αυτής, εκφυλίζει τους νευρώνες προκαλώντας ατροφία ολόκληρης της δομής (19). Ο ιππόκαμπος είναι η μία απ' τις δύο περιοχές του εγκεφάλου που συμβαίνει η διαδικασία της νευρογένεσης, η οποία είναι ευάλωτη στο στρες. Επομένως, είναι δυνατόν το στρες να δυσχεραίνει τον ομοιοστατικό ρόλο της. Η μείωση της νευρογένεσης είναι χαρακτηριστικό των νευροεκφυλιστικών νόσων όπως η άνοια και το Αλτσχάιμερ, καθώς επίσης και διαταραχών ψυχιατρικής φύσης όπως η κατάθλιψη και η διπολική διαταραχή. Οι ψυχικές παθήσεις επίσης προκαλούν συρρίκνωση του ιππόκαμπου, κάτι το οποίο μπορεί να αναστραφεί σε κάποιο ποσοστό με την αντικαταθλιπτική αγωγή. Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω χαρακτηριστικά, η δομή αυτή του μεταιχμιακού συστήματος είναι κεντρικής σημασίας στη διερεύνηση των επιπτώσεων του πρώιμου στρεσογόνου περιβάλλοντος στη διαμόρφωση του ενήλικου ατόμου.

### **1.6 Επιγενετική ρύθμιση**

Η σύγχρονη μοριακή γενετική έχει αναπτύξει μεθόδους με βελτιωμένη διακριτική ικανότητα για την καλύτερη δυνατή ανίχνευση διαταραχών σε επίπεδο γονιδιώματος. Επιπλέον, είναι πλέον αποδεκτό ότι για την ολοκληρωμένη εικόνα της λειτουργίας του

γονιδιώματος και της ρύθμισής του, θα πρέπει να γνωρίζουμε τις τροποποιήσεις που συμβαίνουν σε επίπεδο επιγονιδιώματος. Η επιγενετική αναφέρεται στις αλλαγές που κληρονομούνται και συμμετέχουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης με αντιστρεπτό και δυναμικό τρόπο, χωρίς να αλλάζει ο γενετικός κώδικας. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι ομοιοπολικές και λαμβάνουν χώρα είτε στο ίδιο το DNA είτε στις πρωτεΐνες που βρίσκονται στενά συνδεδεμένες με αυτό (π.χ. ιστόνες). Το σύνολό τους αποτελεί το επιγονιδίωμα το οποίο ρυθμίζει εν μέρει τη λειτουργία του κυττάρου και μπορεί υπό συνθήκες να διαταραχθεί οδηγώντας στην εκδήλωση ασθενειών (21-23).

### **1.6.1 Επιγενετική και περιβάλλον**

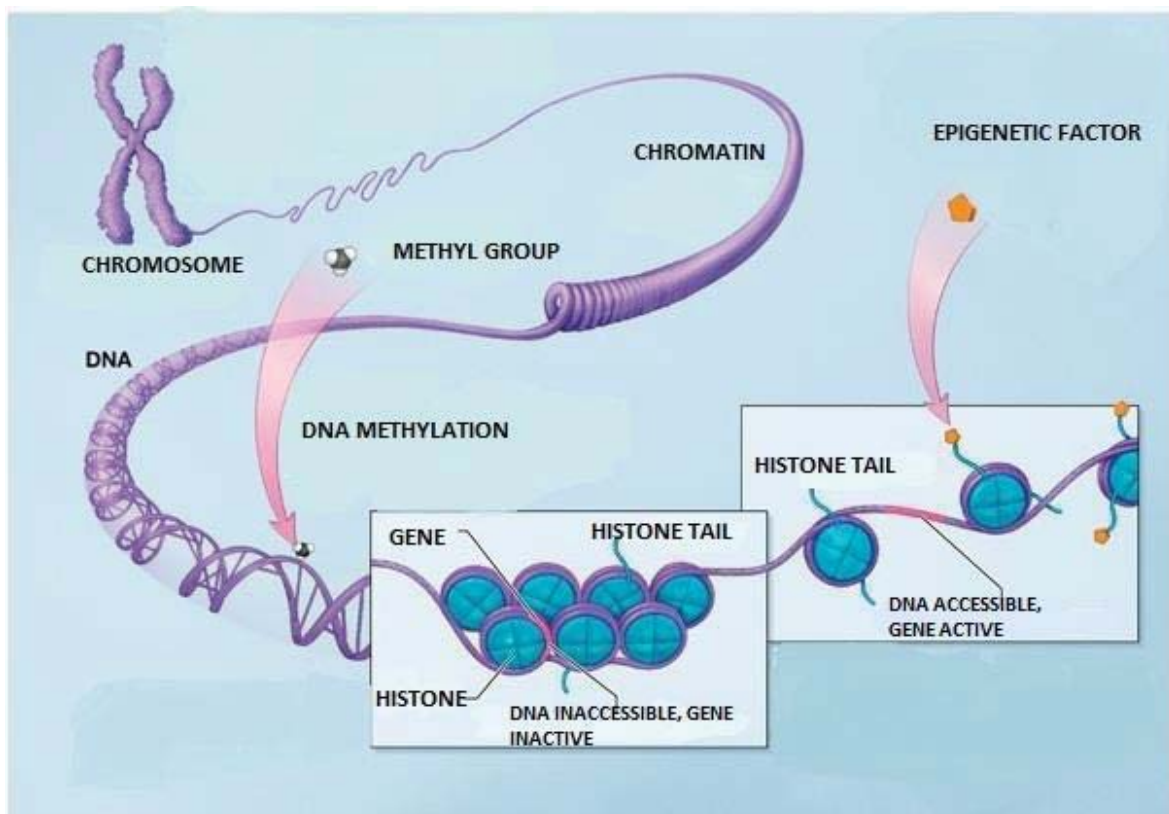
Τα γονίδια δρουν σε συνεργασία με το περιβάλλον και άλλους μη γενετικούς παράγοντες για να διαμορφώσουν το φαινότυπο ενός οργανισμού. Τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα μπορεί να επηρεάσουν τη βιολογική ενεργότητα σε διαφορετικά επίπεδα, σε επίπεδο νευρώνων σε αισθητήρια όργανα, σε επίπεδο ορμονών στο περιφερικό αίμα και σε επίπεδο γονιδίων στον πυρήνα των κυττάρων. Η επιγενετική της συμπεριφοράς είναι ο σύνδεσμος μεταξύ γονιδίων και περιβάλλοντος και αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο οι εμπειρίες μας μπορούν να διαμορφώσουν τον εγκέφαλο και να επηρεάσουν τις φυσιολογικές διεργασίες του στην πορεία της ζωής. Επομένως, το επιγενετικό προφίλ των κυττάρων διαμορφώνονται σε απόκριση στις εμπειρίες και τα ερεθίσματα που βιώνουμε. Η έρευνα στον κλάδο της επιγενετικής αποκάλυψε τον μηχανισμό μέσω του οποίου οι εμπειρίες μπορεί να αποτυπωθούν στον εγκέφαλο. Ο μηχανισμός αυτός παίζει κρίσιμο ρόλο σε διεργασίες μνήμης και μάθησης που αποτυπώνονται στον εγκέφαλο σε απόκριση στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που βιώνουμε σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξής μας και διατηρούνται αναλλοίωτα στη διάρκεια της ζωής. Η ανακάλυψη του κώδικα της επιγενετικής ρύθμισης αναφέρεται επιπλέον στην επιρροή που έχουν οι περιβαλλοντικοί παράγοντες στην έκφραση των γονιδίων και υποστηρίζει την ατομικότητα και την ανάπτυξη διαφορετικών χαρακτηριστικών στο ίδιο είδος. Η έρευνα στον τομέα της επιγενετικής στοχεύει συχνά στην κατανόηση των μηχανισμών ανάπτυξης ασθενειών όπως είναι η σχιζοφρένεια, ο εθισμός, οι διαταραχές συμπεριφοράς, η παχυσαρκεία και ο καρκίνος. Ο φαινότυπος προκύπτει από το στάδιο της ανάπτυξης και στόχος της έρευνας είναι η επίδραση στο στάδιο αυτό έτσι ώστε να προληφθούν τέτοιου είδους ασθένειες (24-26).

Προκειμένου όμως να κατανοήσουμε καλύτερα τη σπουδαιότητα των επιγενετικών τροποποιήσεων είναι χρήσιμο να γνωρίζουμε κατ' αρχήν τον τρόπο με τον οποίο δρα η μεταγραφή. Η μεταγραφή ξεκινά όταν μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται σε ρυθμιστικές περιοχές πάνω στο DNA. Τα κύτταρα ανάλογα με τα ερεθίσματα στα οποία εκτίθενται αποκρίνονται συνθέτοντας διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες με αποτέλεσμα τα γονίδια να μεταγράφονται εξαρτώμενα από το συνδυασμό των μεταγραφικών παραγόντων. Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων εξαρτάται από τη ρυθμιστική περιοχή πάνω στην οποία βρίσκονται οι επιγενετικές αλλαγές. Ο τρόπος με τον οποίο οι επιγενετικοί παράγοντες επηρεάζουν την έκφραση ενός γονιδίου έγκειται στην αλλαγή της ικανότητας των μεταγραφικών παραγόντων να προσδένονται πάνω στις ρυθμιστικές περιοχές που ρυθμίζουν την ενεργότητα του γονιδίου (27).

### **1.6.2 Μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης**

Υπάρχουν διαφορετικοί επιγενετικοί μηχανισμοί οι οποίοι οδηγούν σε αποσιώπηση ή ενεργοποίηση του DNA (Εικόνα 1.6.1). Ο μηχανισμός που έχει περιγραφεί καλύτερα και αλληλεπιδρά άμεσα με το DNA είναι η μεθυλίωση του DNA (28). Πρόκειται για μια διαδικασία κατά την οποία μια μεθυλομάδα προστίθεται στην αλυσίδα του DNA με αποτέλεσμα το μεθυλιωμένο τμήμα της αλυσίδας να γίνεται μη προσβάσιμο στο μηχανισμό που θα ξεκινούσε σε φυσιολογικές συνθήκες τη μεταγραφή. Συνοπτικά, το αποτέλεσμα της μεθυλίωσης του DNA είναι η αποσιώπηση των γονιδίων. Αντιθέτως, οι περιοχές του DNA που είναι υπομεθυλιωμένες αφήνουν ελεύθερη την περιοχή για τη δράση του μηχανισμού μεταγραφής, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση των γονιδίων (29). Οι N- τελικές ουρές των ιστονών μπορούν να υποστούν διαφόρων τύπων ομοιοπολικές μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις (μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικιτινυλίωση). Οι τροποποιήσεις αυτές καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις των ιστονών με άλλες πρωτεΐνες, ρυθμίζοντας έτσι τη δομή και την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (30). Σε αντίθεση με τη DNA μεθυλίωση, η μεθυλίωση των ιστονών μπορεί να οδηγήσει σε αποσιώπηση ή ενεργοποίηση γονιδίων με έμμεσο τρόπο, εξαρτώμενο από διάφορους παράπλευρους παράγοντες (31, 32). Ακόμα ένας μηχανισμός επιγενετικής ρύθμισης είναι η ακετυλίωση των ιστονών κατά την οποία μια ακετυλομάδα, κατά τον ίδιο τρόπο με τη μεθυλομάδα, προσδένεται στις ιστόνες και τροποποιεί τη δομή τους έτσι ώστε η παρακείμενη αλυσίδα DNA να γίνεται προσβάσιμη και η έκφραση των γονιδίων να

επιτρέπεται. Επομένως, ο μηχανισμός της ακετυλίωσης των ιστονών έχει αντίθετα αποτελέσματα από αυτά της μεθυλίωσης του DNA (33, 34). Ένας ακόμα μηχανισμός επιγενετικού ελέγχου συνίσταται στη μετα-μεταγραφική δράση μεταγράφων όπως μη κωδικά RNA (35), μη κωδικά αντινοσηματικά RNA (36) και παρεμβατικά RNA (RNA interference, RNAi), τα οποία οδηγούν στην αποσιώπηση γονιδίων. Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA (microRNA/ miRNA) τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν και στην επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (37-39).



**Εικόνα 1.6.1: Μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης.** Επιγενετικές τροποποιήσεις των ιστονικών ουρών και μεθυλίωση του DNA (National Institute of Mental Health- NIMH).

Ο μηχανισμός της μεθυλίωσης του DNA υπερέχει των άλλων μηχανισμών, καθώς αποτελεί ένα πολύ σταθερό μηχανισμό που διατηρείται και κληρονομείται στις επόμενες γενιές (24, 40). Επιπλέον, παίζει ρόλο-κλειδί σε αρκετές βιολογικές διεργασίες, όπως η γονιδιακή αποτύπωση (imprinting) (41), η αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X (42), η αποσιώπηση ξένου DNA και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου (43). Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεθυλίωση του DNA αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της ανάπτυξης, της

διαφοροποίησης και της γήρανσης (44-46) και έχει αναφερθεί ότι αποτελεί βασική συνιστώσα του μηχανισμού μακροχρόνιας μνήμης (47).

### 1.6.3 Μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση των νουκλεϊκών οξέων μελετήθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του '60 (48), ενώ μια δεκαετία αργότερα αποδείχθηκε ότι συγκεκριμένα η μεθυλίωση των κυτοσινών του DNA σχετίζεται με τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και τη διαφοροποίηση (49). Η μεθυλίωση του DNA αφορά την τροποποίηση του γονιδιώματος με τη βιοχημική προσθήκη μιας μεθυλομάδας (-CH<sub>3</sub>) στις νουκλεοτιδικές βάσεις του DNA. Αποτελεί ίσως τη σημαντικότερη τροποποίηση του γονιδιώματος, καθώς υφίστανται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς (βακτήρια, μύκητες, φυτά, ασπόνδυλα, σπονδυλωτά) (50). Υπάρχουν τρεις κατηγορίες μεθυλίωσης: α) της αδεΐνης στη θέση N-6, η οποία συναντάται σε βακτήρια και κάποιους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (51, 52), β) της κυτοσίνης στη θέση N-4, κυρίως σε θερμόφιλα βακτήρια (53, 54) και γ) της κυτοσίνης στη θέση C-5, που είναι και η συνηθέστερη τροποποίηση (55). Η προσθήκη μεθυλομάδας στο 5' άτομο άνθρακα του δακτυλίου κυτοσίνης συναντάται σε όλους τους οργανισμούς και είναι αυτή στην οποία θα αναφερόμαστε από δω και στο εξής στην παρούσα διατριβή.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA είναι σταθερό και μεταδίδεται στα κύτταρα μέσω της μίτωσης από γενιά σε γενιά. Παρόλα αυτά δεν είναι μη αναστρέψιμη κατάσταση και μπορεί κατά τη διάρκεια της ζωής να αλλάξει (26). Όταν αναφερόμαστε σε υπερμεθυλιωμένη περιοχή του DNA εννοούμε ότι πολλές βάσεις κυτοσίνης (C) σε αυτή την περιοχή έχουν μετατραπεί σε μεθυλιωμένες κυτοσίνες (mC) εφόσον μεθυλομάδες έχουν καταλάβει μία θέση πάνω σε κάθε κυτοσίνη. Εάν επιπλέον, αυτές οι mC βρίσκονται σε ρυθμιστικές περιοχές πάνω στο γονιδίωμα, τότε παρεμποδίζεται η έκφραση των γονιδίων που εδράζονται σε αυτές τις περιοχές στα χρωμοσώματα (56). Η έκταση της μεθυλίωσης σε μια περιοχή πάνω στο γονιδίωμα σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι τυχαία (57), σε άλλες να είναι αποτέλεσμα γενετικών μεταλλάξεων (58) ή να αντανακλά συγκεκριμένες εμπειρίες και αλληλεπιδράσεις γονιδίων-περιβάλλοντος (59, 60). Η απομεθυλίωση του DNA αποτελεί κατά γενική ομολογία μια ενεργητική διεργασία που συμβαίνει λίγο μετά τη σύλληψη. Όταν το DNA διπλασιάζεται κατά την κυτταρική διαίρεση, φυσιολογικά το νέο αντίγραφο

παρουσιάζει ένα πρότυπο μεθυλίωσης το οποίο «καθρεφτίζει» την πατρική αλυσίδα. Η αδυναμία να εμφανίσει το ίδιο πρότυπο μεθυλίωσης και στην 2<sup>η</sup> αλυσίδα αναφέρεται ως παθητική απομεθυλίωση (61). Παρόλα αυτά, αυτή η διεργασία θεωρείται αδύνατον να υφίστανται σε μη διαιρούμενα κύτταρα όπως είναι οι ώριμοι νευρώνες οι οποίοι παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στο πεδίο της επιγενετικής της συμπεριφοράς. Σε αυτή την περίπτωση η απομεθυλίωση αντανακλά την απόκριση των κυττάρων σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως στρεσογόνα ερεθίσματα και φαρμακευτικές αγωγές που στοχεύουν αυτούς τους νευρώνες και το κεντρικό νευρικό σύστημα (24, 34, 61-63). Η DNA μεθυλίωση και κάθε επακόλουθη αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως «καλή» ή «κακή» για τον οργανισμό, διότι εξαρτάται πάντα από την περιοχή του γονιδιώματος η οποία επηρεάζεται. Το ίδιο ισχύει και για την έκκριση κορτιζόλης. Η απελευθέρωση της ορμόνης όταν ο οργανισμός δέχεται κάποια απειλή, βοηθά στη γρήγορη αντιμετώπισή του. Όταν όμως η κορτιζόλη παραμένει σε υψηλά επίπεδα στο σύστημα, αποτελεί κίνδυνο για τη φυσιολογική λειτουργία του.

#### **1.6.4 Μεθυλίωση και γονιδιακή έκφραση**

Η δομή της χρωματίνης σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του μηχανισμού ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Η χρωματίνη μπορεί να βρίσκεται σε ενεργή ή ανενεργή κατάσταση, γεγονός που χαρακτηρίζει τη δυνατότητα έκφρασης ενός γονιδίου. Επομένως, η ενεργή μορφή εμφανίζεται στα κύτταρα που εκφράζεται το γονίδιο (64). Η χρωματίνη διακρίνεται σε δύο κατηγορίες: α) την ευχρωματίνη και β) την ετεροχρωματίνη. Στη μεταγραφικά ενεργή ευχρωματίνη τα ινίδια σχηματίζουν μια χαλαρή δομή και το γενετικό υλικό είναι διάσπαρτο, καταλαμβάνοντας το μεγαλύτερο μέρος του πυρήνα. Αντίθετα, η δεύτερη χαρακτηρίζεται από μια δομή ιδιαίτερα συμπυκνωμένη, ανάλογη με αυτή που συναντάται στα μιτωτικά χρωμοσώματα, και από την ιδιότητα να καταστέλλει της γονιδιακής έκφρασης. Επίσης, οι αλληλουχίες CpG είναι συνήθως μεθυλιωμένες, ενώ οι ιστόνες υποακετυλιωμένες. Η ευχρωματίνη περιλαμβάνει ακετυλιωμένες ιστόνες και αντιγράφεται νωρίς, κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περιοχές που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στη διαμόρφωση της χρωματίνης μεταξύ των δύο αλληλόμορφων, οι οποίες αφορούν σε διαφορετικές ιστονικές τροποποιήσεις και μη συγχρονισμένο διπλασιασμό (65).

Στα φυσιολογικά κύτταρα, οι περιοχές του γονιδιώματος που δεν είναι πλούσιες σε νησίδες CpG, τα επίπεδα μεθυλίωσης είναι συνήθως αυξημένα, ενώ αντίθετα οι περιοχές με πολλές νησίδες CpG χαρακτηρίζονται από υπομεθυλίωση. Οι νησίδες CpG έχουν συνήθως μέγεθος 1-2 Kb και εντοπίζονται στους υποκινητές γονιδίων. Κατ' εξαίρεση, οι νησίδες CpG των υποκινητών είναι μεθυλιωμένες στο φαινόμενο της γονιδιοματικής αποτύπωσης και στην αδρανοποίηση του ενός χρωμοσώματος X των θηλυκών θηλαστικών (66). Αυξημένη μεθυλίωση σε φυσιολογικά μη μεθυλιωμένες νησίδες CpG έχει αναφερθεί σε αθανатоποιημένα και μετασχηματισμένα κύτταρα καθώς επίσης και σε κακοήθεις όγκους (67).

Η μεθυλίωση των CpGs στις περιοχές υποκινητών γονιδίων συνήθως δρα ως σήμα αποσιώπησης των γονιδίων αυτών. Στη διεργασία αυτή συμμετέχουν πρωτεΐνες (methyl-binding CpG proteins, MBP) οι οποίες αναγνωρίζουν τις μεθυλιωμένες νησίδες CpG και προσδένονται σε αυτές. Μετά την ειδική πρόσδεσή τους στο μεθυλιωμένο τμήμα DNA, οι MBP στρατολογούν κάποιο παράγοντα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, όπως είναι οι αποακετυλάσες των ιστονών (Histone Deacetylases, HDAC), και με αυτό τον τρόπο δρουν ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Το κυριότερο μέλος της οικογένειας των MBP είναι η πρωτεΐνη 2 η οποία προσδέεται σε μεθυλιωμένα CpGs (methyl-CpG binding protein 2, MeCP2). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη προσδέεται σε συμμετρικά μεθυλιωμένες κυτοσίνες και προκαλεί αποσιώπηση της μεταγραφής (68).

### 1.6.5 Οι μεθυλοτρανσφεράσες

Η μεθυλίωση των κυτοσινών απαιτεί τη δράση ειδικών ενζύμων που ονομάζονται μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyltransferases, DNMTs). Η πρώτη μεθυλοτρανσφεράση που περιγράφηκε ήταν η Dnmt1, η οποία είναι απαραίτητη για την αποκατάσταση του φυσιολογικού προτύπου μεθυλίωσης στο ημιμεθυλιωμένο DNA που προκύπτει εξαιτίας του ημισυντηρητικού μηχανισμού αντιγραφής του DNA. Στα θηλαστικά έχουν χαρακτηριστεί ακόμα τέσσερα γονίδια μεθυλοτρανσφερασών (*Dnmt2*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Dnmt3L*). Η *Dnmt2* έχει χαμηλή ενζυμική δραστηριότητα και δρα ως tRNA μεθυλοτρανσφεράση (69), ενώ οι *Dnmt3a* και *Dnmt3b* εκφράζονται σε ηψηλά επίπεδα στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και έχουν δραστηριότητα *de novo* μεθυλοτρανσφεράσης. Κατά συνέπεια, μετά την καθολική απομεθυλίωση που συμβαίνει προεμφυτευτικά, οι *Dnmt3a* και *Dnmt3b* είναι υπεύθυνες για την έναρξη της μεθυλίωσης του DNA κατά την



πρώιμη εμβρυονική ανάπτυξη. Οι δύο αυτές μεθυλοτρανσφεράσες, με τη συμμετοχή και του ενζύμου Dnmt1, έχει δειχθεί ότι στοχεύουν στη σταθερότητα των προτύπων μεθυλίωσης του DNA, δεδομένου ότι γνωρίζουμε πως η απενεργοποίηση των Dnmt3a και Dnmt3b στα σωματικά κύτταρα οδηγεί σε αστάθεια των χρωμοσωμάτων (70).

### **1.7 Ανθρώπινο μοντέλο: πρώιμα στρεσογόνα ερεθίσματα σε συνάρτηση με την ανάπτυξη συμπεριφορικών διαταραχών**

Είναι πλέον παραδεκτή η συσχέτιση του στρεσογόνου περιβάλλοντος κατά την πρώιμη αναπτυξιακή ηλικία με τη μεταγενέστερη ανάπτυξη ψυχιατρικών διαταραχών. Άτομα που υφίστανται βίαιη μεταχείριση στην παιδική τους ηλικία ή βιώνουν έντονα το συναίσθημα της παραμέλησης και της απώλειας, παρουσιάζουν ιδιαίτερα αυξημένες πιθανότητες να αναπτύξουν κατάθλιψη ή συναφείς διαταραχές στην ενήλικη ζωή τους. Τα κύρια σημεία που παρουσιάζουν ενδιαφέρον διερεύνησης είναι α) η κρίσιμη αναπτυξιακή περίοδος της ζωής κατά την οποία η επίδραση του περιβάλλοντος έχει σημαντικές επιπτώσεις, β) η αλληλεπίδραση γενετικής και περιβάλλοντος έτσι ώστε να διαταραχθεί το επιγενετικό προφίλ βασικών ρυθμιστικών παραγόντων και γ) ο βαθμός στον οποίο τα ατομικά χαρακτηριστικά συμμετέχουν στη διαμόρφωση του ατόμου και ο ρόλος της επιγενετικής ρύθμισης στην απόκριση του οργανισμού στο πρώιμο στρες. Η απάντηση στα παραπάνω ερωτήματα θα βοηθήσει στη στοχευμένη πρόληψη ή αντιμετώπιση διαταραχών που έχουν τη βάση τους σε μια ευαίσθητη αναπτυξιακή περίοδο, καθώς τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι σήμερα συνηγορούν στην παραδοχή ότι τα ίδια γονίδια που διαταράσσονται από ένα αρνητικό γεγονός, μπορεί να έχουν ευεργετική δράση όταν διεγείρονται από ένα θετικό περιβαλλοντικό ερέθισμα (71).

Η επικράτηση του στρες σε πρώιμα στάδια της ζωής του ανθρώπου αποτυπώνεται στα στατιστικά στοιχεία ερευνών του εθνικού συστήματος καταχώρησης δεδομένων για παιδιά που έχουν βιώσει εγκατάληψη ή κάποιου είδους βιασμό (National Child Abuse and Neglect Data System- NCANDS). Τα πιο πρόσφατα στοιχεία μαρτυρούν ότι περισσότερα από 1600 παιδιά πέθαναν εξαιτίας βιασμού ή εγκατάληψης κατά το έτος 2009. Το μεγαλύτερο ποσοστό (75%) των περιπτώσεων αφορούσε εγκατάληψη, ένα μικρό ποσοστό (15%) φυσική βία, κι ακόμα ένα μικρό ποσοστό (10%) σεξουαλική βία. Όσον αφορά το εύρος της ηλικίας, ένα μεγάλο ποσοστό (>30%) περιλαμβάνει παιδιά ηλικίας 0-3 ετών, και ακολουθούν οι ηλικίες 4-7 ετών (23%), 8-11 ετών (19%) και 12-15 ετών (18%). Τα

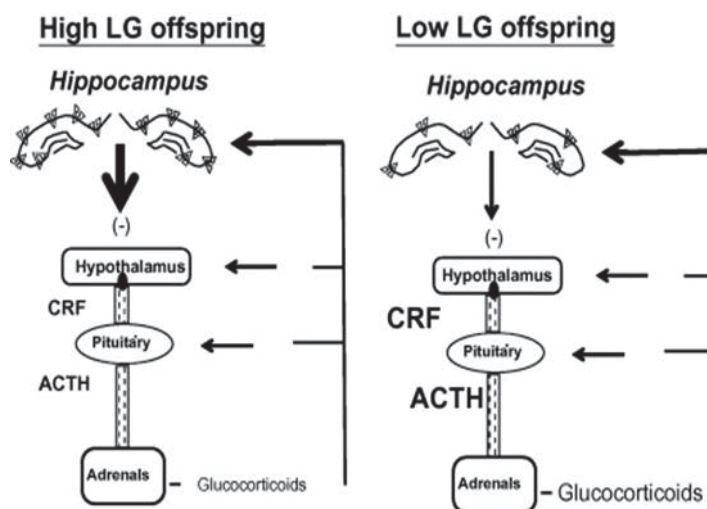
στοιχεία αυτά αποτελούν μία βάση για το λόγο που οι έρευνες επικεντρώνονται στην πρόωμη αναπτυξιακή περίοδο αμέσως μετά τη γέννηση, παρόλο που δεν υπάρχει αρκετή πληροφορία η οποία να υποδηλώνει διαφορετικές επιπτώσεις του στρες σύμφωνα με την ακριβή ηλικία έκθεσης του παιδιού στο δυσμενές περιβάλλον.

### **1.8 Ζωικό μοντέλο: μητρική φροντίδα κατά τη μεταγεννητική περίοδο**

Η ερευνητική ομάδα του M. Meaney & M. Szyf, ήταν εκείνη που συνέβαλε σημαντικά στην κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι εμπειρίες κατά τη μεταγεννητική ηλικία μπορούν να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση και κατ' επέκταση τη συμπεριφορά του ατόμου στην ενήλικη ζωή. Πειραματικά ο οργανισμός του επίμου κρίθηκε καταλληλότερος για την ερευνητική προσπάθεια στα πλαίσια αυτά, δεδομένου ότι παρουσιάζει ορισμένες ιδιαιτερότητες αρκετά κοινές με τον ανθρώπινο οργανισμό. Το νεογέννητο είναι άμεσα εξαρτώμενο από τη μητρική φροντίδα κατά το πρώτο στάδιο της ζωής του και το νευρικό του σύστημα δομικά και λειτουργικά παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με το ανθρώπινο (72, 73).

Το κύριο ερώτημα που απασχόλησε αυτό το πεδίο της έρευνας, ήταν ο τρόπος με τον οποίο οι στρεσογόνες εμπειρίες κατά τα πρώτα στάδια της ζωής του ατόμου συμβάλλουν στην ανάπτυξη μιας παθολογικής κατάστασης και πιθανώς μιας νευρικής δυσλειτουργίας, καθώς και ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα γονίδια εμπλέκονται σε αυτές τις διεργασίες. Η πρώτη παρατήρηση αφορά τον τρόπο με τον οποίο οι μητέρες φροντίζουν τα νεογέννητα μωρά τους και διακρίνονται σε «καλές» και «κακές» μητέρες ανάλογα με τη φροντίδα που προσφέρουν στους απογόνους (high licking-grooming (High LG) mothers, low licking-grooming (Low LG) mothers) (74). Το ποσοστό περιποίησης σχετίζεται με ατομικές διαφορές στην απόκριση του HPA άξονα στο στρες κατά την ενήλικη ζωή. Τα νεογνά τα οποία έχουν υποστεί υψηλά ποσοστά περιποίησης (High LG, ABN) τις πρώτες εβδομάδες μετά τη γέννηση, παρουσιάζουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών στο αίμα, σε σχέση με τα νεογνά που έχουν δεχθεί λιγότερη φροντίδα από τις μητέρες τους (Low LG, ABN), κατά την έκθεση στο στρες στην ενήλικη ζωή. Αυτό συμβαίνει επειδή η μητρική φροντίδα αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα GR στον ιππόκαμπο, οπότε επέρχεται ταχύτερα αρνητική ανατροφοδότηση του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (Εικόνα 1.8.1). Ταυτόχρονα, έγχυση

μορίων-ανταγωνιστών του GR στον ιππόκαμπο, μειώνει την επίδραση της μητρικής φροντίδας στην απόκριση στο στρες (75).



Εικόνα 1.8.1: Επιδράσεις μητρικής φροντίδας στον άξονα HPA (75).

Τα νεογέννητα που εκτίθενται κατά τις πρώτες 10 ημέρες σε χαμηλά επίπεδα μητρικής φροντίδας εξελίσσονται σε ενήλικα ζώα με αυξημένη ευαισθησία σε οξέα στρεσογόνα ερεθίσματα, κι αυτό εξετάζεται με συμπεριφορικές δοκιμασίες στις οποίες τα ενήλικα ζώα που έχουν ανατραφεί από μητέρες low LG ανταποκρίνονται με δειλία σε ένα εκτεθειμένο χώρο και με δισταγμό στην πρόσληψη τροφής σε ένα καινούργιο περιβάλλον. Επιπλέον, αντιμετωπίζουν ένα οξύ ερέθισμα με νευρικότητα και έχει αποδειχθεί ότι τέτοιου είδους πρώιμες εμπειρίες μπορούν να διαταράξουν το νευρικό σύστημα του οργανισμού επηρεάζοντας την απόκριση στις ορμόνες που εκκρίνονται φυσιολογικά ως απάντηση στο στρες (74, 76). Το βασικό συμπέρασμα αυτής της δοκιμασίας είναι ότι ο βαθμός της μητρικής φροντίδας κατά τη νεογνική ηλικία καταγράφεται στον εγκέφαλο με τέτοιο τρόπο που οδηγεί σε αποσιώπηση γονιδίων υπεύθυνων για τη φυσιολογική απόκριση του οργανισμού σε στρεσογόνες καταστάσεις. Επιπλέον, κάποια στοιχεία συμπεριφορικών τεστ στηρίζουν τη διαφορετική συσχέτιση του χρόνιου στρες στη νεογνική ηλικία με την επιθετική συμπεριφορά των ζώων, ανάλογα με το είδος/στέλεχος (αρσενικοί επίμυες Wistar: αύξηση επιθετικότητας, αρσενικά ποντίκια C57Bl/6: μείωση επιθετικότητας) (77, 78). Αυτή η παρατήρηση αποδεικνύει ότι η επίδραση του στρες εξαρτάται από το είδος, τη διάρκεια, τη σοβαρότητα και την ηλικία των ζώων την περίοδο της μητρικής αποστέρησης (79).

## 1.9 Οι ατομικοί παράγοντες στη διαμόρφωση της απόκρισης στο στρες

### 1.9.1 Η σημασία της ατομικότητας στη σύνθετη αλληλεπίδραση γενετικού-επιγενετικού παράγοντα

Πρόσφατες έρευνες συσχετίζουν τη σύνθετη αλληλεπίδραση γενετικών και επιγενετικών μεταβολών με τη διαφορετική επιρροή που μπορεί να έχει το περιβάλλον στην ανάπτυξη του κάθε ατόμου ξεχωριστά. Διαφορετικοί πολυμορφισμοί στο γονότυπο ενός ατόμου σε συνδυασμό με ποικίλες μεθυλιωμένες περιοχές είναι δυνατόν να οδηγούν σε διαφορετικά αποτελέσματα στην πορεία της ανάπτυξης και την απόκριση του κάθε ατόμου σε συγκεκριμένα ερεθίσματα. Το 75% των διαφορεικά μεθυλιωμένων περιοχών μπορεί να εξηγηθεί ως το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του γονότυπου με διαφορετικές συνθήκες ενδομήτριου περιβάλλοντος και εμπειρίες ακόμα και από το στάδιο της ανάπτυξης του εμβρύου, το οποίο εξαρτάται από την κατάσταση της μητέρας (κάπνισμα, κατάθλιψη, υγεία της μητέρας, βάρος νεογνού, σειρά γέννησης, ηλικία της σύλληψης) (80). Το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA δεν είναι σταθερό κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου και αυτές οι χρονο-εξαρτώμενες αλλαγές έχουν συσχετιστεί ακόμα και με τη γεωγραφική περιοχή και τον πληθυσμό της οικογένειας (81). Εμφανίζονται επομένως διαφορές ακόμα και μεταξύ ατόμων που εντάσσονται στο ίδιο περιβάλλον. Αυτές οι σύνθετες αλληλεπιδράσεις έχουν αντίκτυπο στην ανάπτυξη ποικιλίας ασθενειών στην πορεία της ζωής. Τα πιθανά προβλήματα των πειραμάτων *in vivo* είναι συνήθως η αδυναμία επανάληψης των πειραματικών συνθηκών, η δυσκολία σύγκρισης των αποτελεσμάτων εξ' αιτίας των διαφορετικών πειραματικών προσεγγίσεων και η ευαισθησία της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται για την αναγνώριση των επιγενετικών αλλαγών.

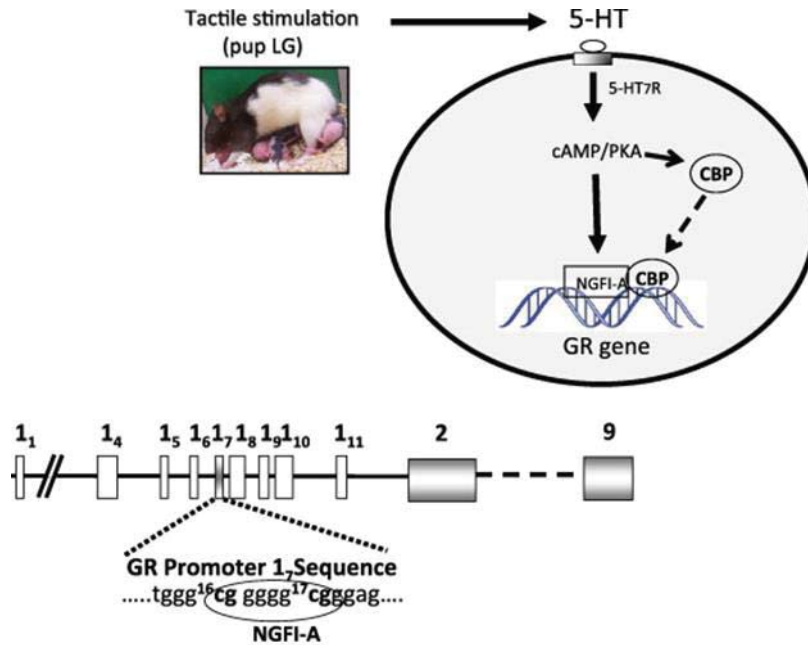
### 1.9.2 Ατομικές επιγενετικές διαφορές

Στον άνθρωπο οι ατομικές διαφορές στη μεθυλίωση του DNA μπορεί να οφείλονται συνολικά ή εν μέρει σε νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς π.χ. γενετικό πολυμορφισμό ενός νουκλεοτιδίου που καταργεί μια θέση CpG. Ακόμα έχουν αναφερθεί γονιδιακές θέσεις των οποίων η επιγενετική κατάσταση επηρεάζεται από γενετικά στοιχεία *in cis* (στο ίδιο χρωμόσωμα) ή *in trans* (σε διαφορετικό χρωμόσωμα) ή και τα δύο, γεγονός που καθιστά σαφές ότι η DNA μεθυλίωση δεν είναι ανεξάρτητη από το γονότυπο (82).

Επίσης υπάρχουν και θέσεις στις οποίες οι ατομικές διαφορές δεν φαίνεται να σχετίζονται με την αλληλουχία DNA (83). Τέλος έχει περιγραφεί μια ιδιαίτερη ομάδα γονιδίων των οποίων τα αλληλόμορφα εμφανίζουν διαφορετική έκφραση και διαφορετική μεθυλίωση σε γενετικά πανομοιότυπα άτομα εξαιτίας επιγενετικών τροποποιήσεων κατά την πρόωμη ανάπτυξη και πιστεύεται ότι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε περιβαλλοντικές επιδράσεις (metastable epialleles) (84, 85).

#### **1.10 Μοριακοί και βιοχημικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με τη μητρική φροντίδα και την απόκριση του άξονα HPA**

Ο μοριακός μηχανισμός για τη δημιουργία κυτταρικής μνήμης από τη μητρική φροντίδα παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.10.1. Συγκεκριμένα, η μητρική περιποίηση αυξάνει την έκφραση και παραγωγή σεροτονίνης (5-HT) στον ιππόκαμπο (86). Αυτό οδηγεί σε θετική ρύθμιση του υποδοχέα GR. Αρχικά, η 5-HT αυξάνει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα (nerve growth factor-inducible factor A, NGFI-A) (87), ο οποίος προσδένεται στον υποκινητή του εξονίου 1<sub>7</sub> του γονιδίου του GR (9). Έπειτα, μέσω ενός καταρράκτη αντιδράσεων που περιλαμβάνουν κυκλικό AMP (cAMP) και πρωτεϊνική κινάση A (PKA), στρατολογεί στο σημείο αυτό τον γενικό συνενεργοποιητή CREB Binding Protein (CBP) (88). Ο CBP εμφανίζει ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης με αποτέλεσμα την ακετυλίωση των ιστονικών ουρών που οδηγεί σε χαλάρωμα της δομής DNA-ιστονών, οπότε επιτρέπεται η μεταγραφή του γονιδίου (89). Έτσι, υπερέκφραση του GR βοηθά στην ταχύτερη αρνητική ανατροφοδότηση του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων.

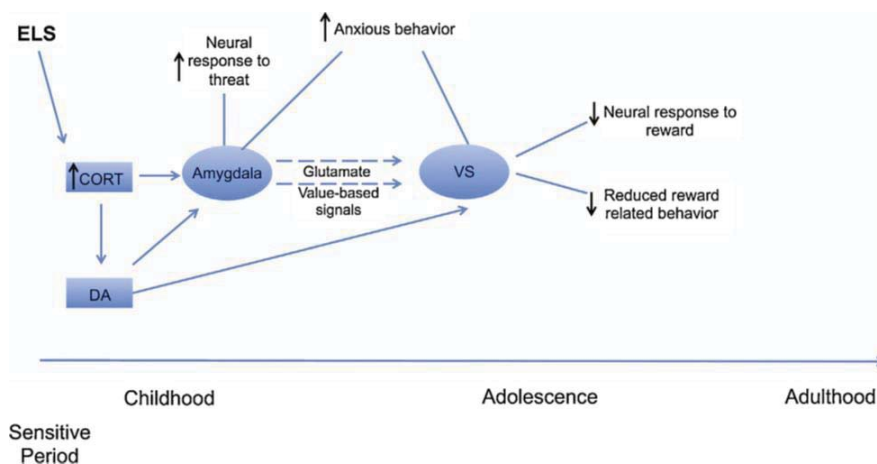


**Εικόνα 1.10.1:** Μοριακές και επιγενετικές επιδράσεις της μητρικής φροντίδας (75).

Παρατηρούμε λοιπόν, τη σημασία της μητρικής φροντίδας στην πρόωμη ανάπτυξη κατά την πρόωμη μεταγεννητική ηλικία. Η απομάκρυνση από τη μητέρα ή αλλιώς μητρική αποστέρηση (maternal deprivation, MD) αποτελεί στρεσογόνο παράγοντα για τα νεογνά, καθώς στις περιπτώσεις αυτές δε δέχονται φροντίδα, ούτε καταφέρνουν να διατηρηθούν θερμά ή να θηλάσουν. Η αρνητική ανατροφοδότηση που ασκεί ο ιππόκαμπος στον άξονα HPA μεταβάλλεται από τις επιγενετικές τροποποιήσεις που επιδέχονται τα συμμετέχοντα μόρια στις αντιδράσεις αυτές, αναλόγως του περιβάλλοντος, δηλαδή της ύπαρξης ή όχι μητρικής περιποίησης. Αντίστοιχα, με τέτοιου είδους επιγενετική τροποποίηση, θα μπορούσαν να ρυθμίζονται τα γονίδια που εκφράζονται στην αμυγδαλή και συμμετέχουν στη θετική ανατροφοδότηση του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων.

Το στρες κατά την πρόωμη ανάπτυξη (Early-Life Stress, ELS) μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στα κυκλώματα της αμυγδαλής αλλά και σε συναισθηματική απορρύθμιση, η οποία αυξάνει τις πιθανότητες για παθολογικές καταστάσεις. Αρχικά, η μητρική αποστέρηση οδηγεί σε υπερτροφία των νευρώνων της αμυγδαλής και σε συμπεριφορικές αποκρίσεις ανάλογες αυτών που παρατηρούνται κατά την έκθεση σε στρεσογόνα ερεθίσματα (15). Η έκθεση πειραματόζωων σε ELS επάγει πρόωμες και μόνιμες αλλαγές

στα νευρωνικά κυκλώματα της αμυγδαλής. Οι αλλαγές αυτές δεν εξαλείφονται όταν σταματήσει η έκθεση στο στρεσογόνο ερέθισμα, ούτε επανέρχονται στην αρχική κατάσταση με την ανάπτυξη των περιοχών του προμετωπιαίου φλοιού που ρυθμίζουν το συναίσθημα. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια μιας κρίσιμης περιόδου για την ανάπτυξη και μέχρι τη δέκατη ημέρα μετά τη γέννηση, έχει παρατηρηθεί πως τα νεογνά επίμυων «παίρνουν περισσότερα ρίσκα» παρουσία της μητρικής φιγούρας, παρά απουσία αυτής και παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα κορτικοστεροειδών (90). Συμπεραίνουμε λοιπόν πως και μόνο η μητρική παρουσία εμπνέει ασφάλεια, ενώ η απουσία της προκαλεί άμεσες και μακροπρόθεσμες νευρωνικές αλλαγές. Στην Εικόνα 1.10.2 παρατηρούμε την επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης γλυκοκορτικοειδών στην αμυγδαλή. Συγκεκριμένα, το στρες κατά τη νεαρή ηλικία επάγει την έκφραση ορμονών, οι οποίες όχι μόνο επιταχύνουν την ανάπτυξη της αμυγδαλής αλλά αλληλεπιδρούν με το ντοπαμινεργικό σύστημα του εγκεφάλου, οδηγώντας σε αυξημένη απελευθέρωση ντοπαμίνης (DA) στην αμυγδαλή και το κοιλιακό ραβδωτό σώμα (Ventral Striatum, VS). Η αύξηση ντοπαμίνης κατά τη νεαρή ηλικία μπορεί να δημιουργήσει νευρικούς και συμπεριφορικούς φαινοτύπους ο οποίοι εμμένουν μέχρι την ενηλικίωση και ίσως σχετίζονται με το άγχος και την κατάθλιψη (91).



**Εικόνα 1.10.2:** Επιδράσεις του ELS στην αμυγδαλή και το ραβδωτό σώμα με μακροπρόθεσμες συνέπειες (91).

Ο υπεύθυνος μηχανισμός γι' αυτό το αποτέλεσμα είναι η επιγενετική τροποποίηση σε ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων, κατά κύριο λόγο η μεθυλίωση του DNA, η οποία διατηρείται και επηρεάζει την έκβαση της ανάπτυξης του ατόμου. Πιο συγκεκριμένα, χαμηλά επίπεδα μητρικής φροντίδας συνδέονται με αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης

γονιδίων που εμπλέκονται στον άξονα υποθαλάμου- υπόφυσης- επινεφριδίων. Ελαττώνεται επομένως η έκφρασή τους σε συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου και διαταράσσεται η ομαλή λειτουργία του μηχανισμού αρνητικής επανατροφοδοτικής ρύθμισης του άξονα που ενεργοποιείται σε συνθήκες έντονου στρες. Κατ' επέκταση, το ενήλικο ζώο παράγει τις αντίστοιχες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη φυσιολογική απόκριση του οργανισμού σε στρεσογόνες καταστάσεις, σε χαμηλά επίπεδα και με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται η ομοιόσταση.

Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR) είναι το πιο καλά μελετημένο μόριο το οποίο εμπλέκεται σε αυτόν τον μηχανισμό. Τα νεογνά που στερούνται της μητρικής φροντίδας υφίστανται επιγενετική αποσιώπηση του γονιδίου GR που εκφράζεται στον ιππόκαμπο και κατά την ενήλικη φάση της ζωής τους ανιχνεύονται χαμηλά επίπεδα της πρωτεΐνης GR σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ζώα. Η ερευνητική ομάδα του Meaney επικεντρώθηκε στο επιγενετικό προφίλ του υποκινητή του GR στον ιππόκαμπο και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης DNA σε αυτή την περιοχή του γονιδίου είναι υπεύθυνα για τον φαινότυπο των ενήλικων ζώων. Εξήγησε μάλιστα ότι ο βαθμός της μητρικής φροντίδας (high-low LG) είναι η αιτία των επιγενετικών αλλαγών και όχι το γενετικό υπόβαθρο της μητέρας, κάνοντας πειράματα ανταλλαγής λύτρας από «κακή» φυσική μητέρα σε «καλή» θετή μητέρα. Διαπιστώθηκε έτσι ότι οι απόγονοι της αδιάφορης μητέρας ανέπτυξαν φυσιολογική συμπεριφορά και επίπεδα μεθυλίωσης ακολουθώντας το πρότυπο της μητέρας από την οποία υιοθετήθηκαν. Και το αντίστροφο παρατηρήθηκε με λύτρες ζώων που γεννήθηκαν από «καλή» μητέρα και ανατράφηκαν από «κακή» τις πρώτες 10 ημέρες μετά τη γέννηση. Η αναπτυξιακή περίοδος αυτή είναι σημαντικός παράγοντας για τη διερεύνηση της επίδρασης των πρώιμων εμπειριών στη διαμόρφωση του ενήλικου ατόμου επιβεβαιώνοντας τη λειτουργία της μνήμης του ιππόκαμπου στον εγκέφαλο (73, 92).

Παρότι ο επίμυς ήταν το πρώτο πειραματόζωο στο οποίο μελετήθηκε το επιγενετικό πρότυπο σε απόκριση στο στρες, προσπάθειες για τη διερεύνηση και άλλων ορμονικών συστημάτων πραγματοποιήθηκαν σε άλλους οργανισμούς. Μεταγενέστερα των Weaver and Meaney ασχολήθηκε με το πεδίο αυτό, ο Dietmar Spengler και η ομάδα του μελετώντας σε μύες την επίδραση της απομόνωσης των νεογέννητων από τη μητέρα τους για τρεις ώρες καθημερινά κατά την πρώιμη μεταγεννητική ηλικία. Συγκεκριμένα, η ερευνητική ομάδα του Spengler επικεντρώθηκε τη δράση μιας άλλης ορμόνης, της



αργινίνης-βασοπρεσίνης (AVP) η οποία εκκρίνεται στον υποθάλαμο μαζί με την CRH και προάγουν την έκλυση κορτιζόλης από τα επινεφρίδια ως απόκριση στο στρες. Το στρες της μητρικής αποστέρησης προκαλεί υπερδιέγερση του άξονα HPA με ταυτόχρονη αυξημένη έκφραση της ορμόνης AVP. Αυτό σημαίνει ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης ρυθμιστικών περιοχών DNA ανιχνεύονται μειωμένα και παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης AVP. Η υπομεθυλίωση και η αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση σχετίζονται με την αυξημένη ευαισθησία που δείχνουν τα ενήλικα πλέον ζώα σε στρεσογόνα ερεθίσματα, καθώς επίσης και με τον τρόπο με τον οποίο οι νευρώνες του υποθάλαμου δρουν τη στιγμή της απομόνωσης των νεαρών μυών από τη μητέρα τους (93). Ακόμα μια περίοδος που έχει μελετηθεί σχετικά με το στρες σε πρόιμη ηλικία είναι η εμβρυϊκή. Οι εμπειρίες που βιώνει το έμβρυο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι καθοριστικής σημασίας στη διαμόρφωση του επιγενετικού προφίλ και της συμπεριφοράς του ενήλικου ατόμου. Διαπιστώθηκε ότι το περιγεννητικό στρες οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα GR στον υπόκαμπο του νεαρού μυός και υπερμεθυλίωση, κάτι που αυτομάτως υποδηλώνει αυξημένη ευαισθησία σε νέες στρεσογόνες καταστάσεις στην ενήλικη ζωή (94).

Εκτός από τον GR, την CRH, την AVP και γενικά τα μόρια που εμπλέκονται αυστηρά στον άξονα HPA, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν και επηρεάζονται από το στρες είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της ενεργότητας των πρώτων. Οι παράγοντες αυτοί είναι στόχοι του άξονα και αποτελούν σημαντικά στοιχεία ρύθμισης της ομοιόστασης. Ένας από τους πιο σημαντικούς είναι ο παράγοντας νευροτροφίνης που προέρχεται απ' τον εγκέφαλο (Brain Derived Neurotrophin Factor, BDNF) και προάγει την επιβίωση και ανανέωση των νευρώνων. Σε καταστάσεις έντονου στρες έχουμε αυξημένη μεθυλίωση στις ρυθμιστικές περιοχές DNA του BDNF και μειωμένα επίπεδα πρωτεΐνης που δεν επαρκούν για τη φυσιολογική λειτουργία του εγκεφάλου (95).

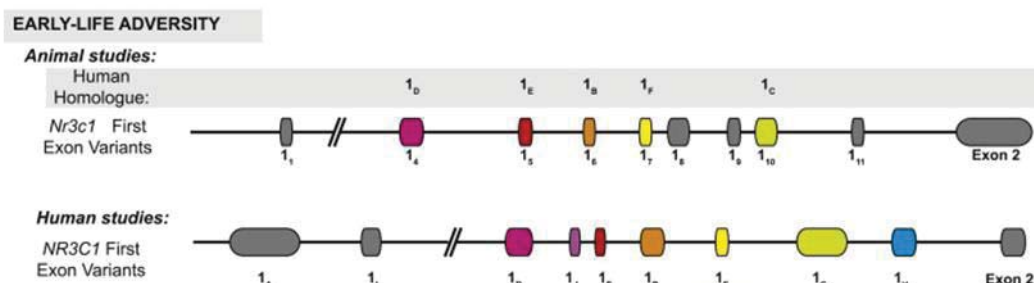
Το γενικό συμπέρασμα της μελέτης του πρόιμου στρες είναι ότι είναι δυνατόν να επηρεαστούν πολλά γονίδια σε πολλές περιοχές του εγκεφάλου σε πολλούς συγγενείς οργανισμούς και τα αποτελέσματα να είναι σταθερά και ανιχνεύσιμα μετά από πολλά χρόνια.

### 1.11 Μόρια που συμμετέχουν στον άξονα HPA και στην απόκριση στο στρες και μεταγραφικοί στόχοι του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

*NR3C1 (Glucocorticoid Receptor, GR) και NR3C2 (Mineralocorticoid Receptor, MR)*

Τα γλυκοκορτικοειδή και τα αλατοκορτικοειδή (*mineralocorticoids*) αποτελούν δύο κατηγορίες κορτικοστεροειδών ορμονών, με σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του νατρίου και στη διαμεσολάβηση της απόκρισης στο στρες. Οι υποδοχείς GR, MR ανήκουν στην οικογένεια υποδοχέων στεροειδών ορμονών και εκφράζονται με υψηλή συχνότητα στον εγκέφαλο. Επιπλέον, εδράζονται σε επιθηλιακούς ιστούς που συμμετέχουν στη διαμεταφορά  $\text{Na}^+$ , όπως οι νεφροί και το κόλον (96, 97). Αμφότεροι οι τύποι κορτικοστεροειδών ορμονών, είναι απλά μόρια που προέρχονται από χοληστερόλη και είναι συντηρημένα σε όλα τα σπονδυλωτά. Οι φυσιολογικές λειτουργίες των υποδοχέων GR και MR είναι διακριτές. Ο πρωταρχικός ρόλος του υποδοχέα MR είναι η διατήρηση της ισορροπίας νερού, νατρίου και η ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας, η οποία επάγεται μέσω του αλατοκορτικοειδούς αλδοστερόνη, που εκκρίνεται από τα επινεφρίδια (98). Τα γλυκοκορτικοειδή, με την πρόσδεση στον υποδοχέα τους, ασκούν επίσης τις παραπάνω λειτουργίες αλλά αντίθετα από τα αλατοκορτικοειδή, ρυθμίζουν την καταβολική απόκριση στο στρες. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι υπεύθυνα για διαδικασίες όπως νευρωνική απόπτωση και αναγέννηση, δημιουργία μνήμης, μάθηση και προσαρμογή στο περιβάλλον (99). Τα λιπόφιλα γλυκοκορτικοειδή που μεταφέρονται με την αιματική ροή, προσδένονται σε πρωτεΐνες του ορού, όπως οι σφαιρίνες (globulins) και εισέρχονται στα κύτταρα μέσω απλής διάχυσης. Εκεί προσδένονται στους υποδοχείς τους στο κυτταρόπλασμα, διμερίζονται και εισέρχονται στον πυρήνα όπου δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, προσδενόμενα σε ειδικές αλληλουχίες (glucocorticoid response elements, GREs) ώστε να επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων (100). Η πρωτεϊνική δομή των υποδοχέων GR, MR αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές. Το  $-\text{NH}_2$ , αμινοτελικό άκρο μπορεί να ποικίλλει σε αλληλουχία και μήκος, ενώ το  $-\text{COOH}$ , καρβοξυτελικό άκρο στο οποίο προσδένονται τα γλυκοκορτικοειδή παρουσιάζει ακόμη μεγαλύτερη ποικιλομορφία. Μεταξύ τους παρεμβάλλεται μια πολύ συντηρημένη αλληλουχία, η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (101). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα GR, στους ανθρώπους αλλά και στα τρωκτικά, περιλαμβάνει 11 εξόνια (102). Το πρώτο εξόνιο του γονιδίου, στην 5' μη κωδικοποιούσα περιοχή του, αποτελείται από εννιά εναλλακτικά μετάγραφα, καθένα εκ

των οποίων φέρει δικό του υποκινητή. Στον άνθρωπο τα εναλλακτικά πρώτα εξόνια αριθμούνται ως 1<sub>A,I,D,J,E,B,F,C,H</sub> ενώ στα τρωκτικά ως 1<sub>1,4-11</sub> (Εικόνα 1.11.1) (103).



**Εικόνα 1.11.1:** Εναλλακτικά μετάγραφα του πρώτου εξονίου του γονιδίου *Nr3c1* (103).

Από τα παραπάνω εναλλακτικά εξόνια, φαίνεται πως το 1<sub>7</sub> έχει ιστοειδική έκφραση για τον ιππόκαμπο και η κατάσταση μεθυλίωσής του αλλάζει ανάλογα με τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Συγκεκριμένα, 24-48 ώρες πριν τη γέννηση, στα τρωκτικά, ολόκληρη η περιοχή του εξονίου 1<sub>7</sub> είναι απομεθυλιωμένη. Την 1<sup>η</sup> ημέρα μετά τη γέννηση γίνεται *de novo* μεθυλίωση στα 3' και 5' άκρα του εξονίου, σε νεογνά που υφίστανται High LG και Low LG, εξίσου. Την 6<sup>η</sup> ημέρα μετά τη γέννηση, σε νεογνά που δέχονται χαμηλά ποσοστά φροντίδας (Low LG), παρατηρείται μεθυλίωση του εξονίου. Αντιθέτως, νεογνά που δέχονται υψηλά ποσοστά φροντίδας (High LG) φέρουν απομεθυλιωμένο το εξόνιο 1<sub>7</sub>. Αυτό το φαινόμενο που προκαλείται από τη μητρική φροντίδα παραμένει σε όλη τη διάρκεια ζωής των απογόνων (76).

Οι υποδοχείς GR και MR εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στην αμυγδαλή (104). Έχει παρατηρηθεί πως έγχυση κορτικοστεροειδών στην αμυγδαλή επάγει συμπεριφορά ανάλογη αυτής που εκδηλώνεται σε περιπτώσεις άγχους (105). Ανταγωνιστές των υποδοχέων αυτών οδηγούν σε αύξηση του χρόνου παραμονής επίμυων, όπως και μεγαλύτερο αριθμό εισόδων στους ανοικτούς βραχίονες του υπερυψωμένου σταυροειδούς λαβυρίνθου (Elevated Plus Maze, EPM) κατά τη διενέργεια συμπεριφορικών πειραμάτων (106). Σύμφωνα με μια έρευνα των Han και Shi, το παρατεταμένο άγχος (single prolonged stress, SPS) προκαλεί μείωση της έκφρασης GR, MR στην αμυγδαλή επίμυων, σε επίπεδο μεταγραφής (mRNA) και μετάφρασης (πρωτεΐνης). Επίσης, παρατηρήθηκε πως τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης MR στην

αμυγδαλή επάγουν την απώλεια νευρώνων και οδηγούν σε δυσλειτουργία της αμυγδαλής κατά τη διαταραχή μετατραυματικού στρες (Post-traumatic stress disorder, PTSD). Η μείωση αυτή θα μπορούσε να σχετίζεται με κλινική εικόνα αυξημένης επαγρύπνησης και άγχους (107). Σύμφωνα με τους Arnett και Pan, το στρες κατά την πρώιμη ανάπτυξη σε νεογέννητους μύες, οδηγεί σε μείωση των επιπέδων mRNA του GR στην αμυγδαλή. Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με μακροπρόθεσμες συνέπειες στην κοινωνική συμπεριφορά των ζώων, αλλά και στην ικανότητα διαχείρισης του άγχους. Παρόλα αυτά, η έκφραση του GR μπορεί να αποκατασταθεί και οι συνέπειες στη συμπεριφορά των ζώων να αναστραφούν. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του GR στον κεντρικό πυρήνα της αμυγδαλής σε ζώα που υπέστησαν μητρική αποστέρηση. Επιπλέον, η απώλεια των υποδοχέων GR σχετίστηκε με εμμένουσες αλλαγές στη σχετική με το άγχος συμπεριφορά. Συμπεριφορικά πειράματα των συγκεκριμένων ζώων σε ηλικία 8-10 εβδομάδων έδειξαν αύξηση του χρόνου εξερεύνησης και της απόστασης που διανύθηκε. Για να διαπιστωθεί εάν αυτές οι συμπεριφορικές αποκρίσεις ήταν αναστρέψιμες, στα αγχωμένα ζώα έγινε έγχυση λεντιού (lentivirus) που έφερε το γονίδιο GR. Μετά το χειρισμό, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων GR. Ταυτόχρονα, στα συμπεριφορικά πειράματα παρατηρήθηκε αγχώδης συμπεριφορά. Τα ζώα πλέον περνούσαν λιγότερο χρόνο στους ανοικτούς βραχίονες του EPM. Βλέπουμε, πως τα συμπεριφορικά πρότυπα που δημιουργούνται από αντιξοότητες της νεαρής ηλικίας, μπορούν να αναστραφούν κατά την ενήλικη ζωή. Έτσι λοιπόν, το στρες κατά τη νεαρή ηλικία μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένο άγχος και αύξηση της κοινωνικότητας κατά την ενήλικη ζωή, συμπεριφορές που υποδηλώνουν προσαρμοστικότητα στο άγχος και τον φόβο και εξερευνητική διάθεση στα τρωκτικά (108).

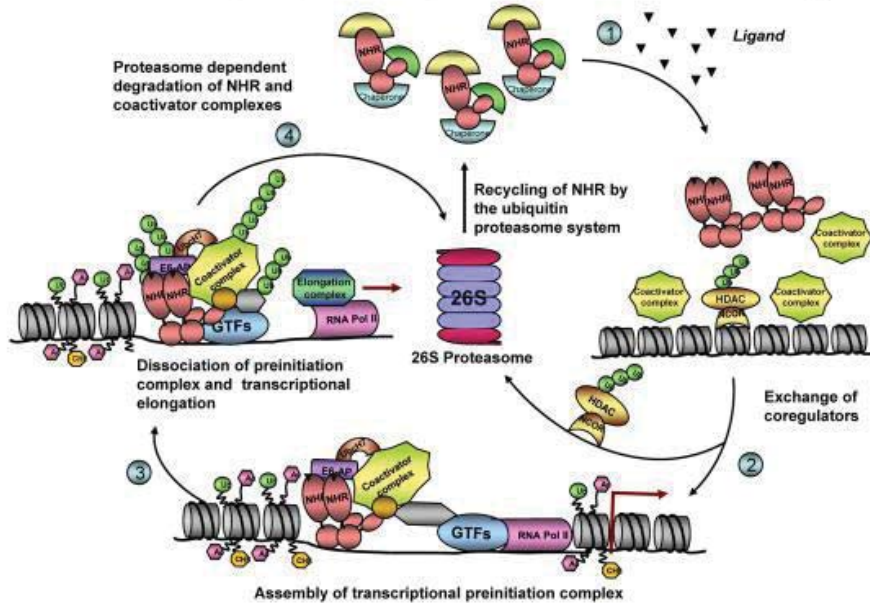
### ***UBE3A (ubiquitin protein ligase E3A)***

Το γονίδιο αυτό εδράζεται στο χρωμόσωμα 15q11-q13 με αποτύπωμα στο πατρικό αλληλόμορφο, οπότε το προϊόν κωδικεύεται από το μητρικό αλληλόμορφο. Έτσι, η απώλεια μητρικού γενετικού υλικού είναι αυτή που οδηγεί στο σύνδρομο Angelman (109). Το σύνδρομο αυτό αποτελεί μια νευροαναπτυξιακή διαταραχή που χαρακτηρίζεται από σοβαρή νοητική υστέρηση, επιδεκτικότητα σε επιληπτικές κρίσεις, δυσλειτουργία της ομιλίας και χαρακτηριστικά αυτισμού (110). Το γονίδιο *UBE3A* είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση μιας πρωτεΐνης 100 kDa, της E6AP, που ανήκει στην οικογένεια E3 των λιγασών ουβικιτίνης. Οι E3 λιγασές συμμετέχουν στο σχηματισμό του πρωτεασώματος

(ubiquitin proteasome system, UPS) το οποίο ευθύνεται για την ανακύκλωση πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα οι προς αποδόμηση, ενεργοποίηση ή μεταφορά στο κύτταρο πρωτεΐνες «σημαίνονται» με μια πρωτεΐνη 76 αμινοξέων, την ουβικιτίνη. Στη λειτουργία του πρωτεασώματος συμμετέχουν τρεις οικογένειες ενζύμων. Η E1 που ενεργοποιεί την ουβικιτίνη, η E2 που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση της ουβικιτίνης και η E3 η οποία έχει δράση λιγάσης ουβικιτίνης. Τα ένζυμα της οικογένειας E3 φέρουν στο καρβοξυτελικό άκρο τους μια αλληλουχία που αποτελεί το ενεργό τους κέντρο και μεταφέρει την ουβικιτίνη από το ένζυμο της οικογένειας E2 στο επιθυμητό υπόστρωμα (Εικόνα 1.11.2).

Το προϊόν του *UBE3A* λειτουργεί επίσης ως μεταγραφικός συνενεργοποιητής των υποδοχέων στεροειδών ορμονών όπως της προγεστερόνης, των οιστρογόνων και άλλων ορμονικών υποδοχέων (111). Σε μια έρευνα του Godavarthi και των συνεργατών του, βρέθηκε πως το *UBE3A*, εκτός της δράσης του ως μεταγραφικού συνενεργοποιητή του GR, επάγει και την αποδόμησή του από το πρωτεάσωμα. Εκτός αυτού, το σηματοδοτικό μονοπάτι του GR διαταράσσεται σε μύες με έλλειψη στο μητρικό αλληλόμορφο του *UBE3A*, γεγονός που οδηγεί σε ευαισθησία σε στρεσογόνα ερεθίσματα. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η αλληλεπίδραση του *UBE3A* με το GR και τα αποτελέσματα της ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν πως τα μόρια αυτά αλληλεπιδρούν. Πειράματα ανοσοφθορισμού έδειξαν πως ενώ το GR εδράζεται στο κυτταρόπλασμα, το *UBE3A* βρίσκεται στον πυρήνα. Μετά τη χορήγηση του συνθετικού γλυκοκορτικοειδών, δεξαμεθαζόνη, το GR μεταφέρθηκε στον πυρήνα και συνεντοπίστηκε με το *UBE3A*. Επιπλέον, στις περιπτώσεις υψηλών επιπέδων έκφρασης του *UBE3A*, η έκφραση του GR μειώθηκε. Συνεπώς, υψηλές συγκεντρώσεις *UBE3A* επάγουν την αποδόμηση του GR από το πρωτεάσωμα. Η μείωση των επιπέδων GR στον υπόκαμπο μυών με έλλειμμα στο μητρικό αλληλόμορφο του *UBE3A* οδήγησαν στο συμπέρασμα πως τα ζώα αυτά πιθανότατα υφίστανται χρόνια στρες, κάτι που φάνηκε στα αντίστοιχα συμπεριφορικά πειράματα.

### The role of Ubiquitin proteasome pathway in NHR mediated transcription



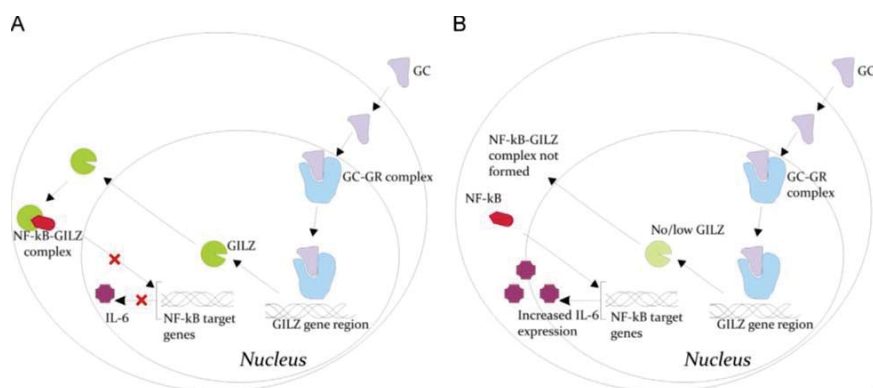
**Εικόνα 1.11.2:** Μηχανισμός αλληλεπίδρασης πυρηνικών υποδοχέων με τους ρυθμιστές τους κατά την μεταγραφική ενεργοποίηση και ο ρόλος του πρωτεασώματος (111).

Σε πειράματα ανοσοφθορισμού δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στην έκφραση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών GR στην αμυγδαλή ζώων με έλλειμμα στο μητρικό αλληλόμορφο του *UBE3A*. Αυτό υποδηλώνει πως η αμυγδαλή των ζώων αυτών είναι ικανή για ρύθμιση μέσω θετικής ανατροφοδότησης του άξονα HPA και δημιουργεί τις συνθήκες για τη συμπεριφορά απόκρισης στο άγχος. Ενδιαφέρον, τέλος, παρουσιάζει το ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι του GR απορυθμίζεται στους εγκεφάλους μωών με σύνδρομο Angelman, πράγμα που φαίνεται από την αρνητική ρύθμιση των γονιδίων στόχων του GR, όπως το *BDNF* και το *FKBP5* (112). Σε κάθε περίπτωση το *UBE3A*, είτε σε χαμηλές είτε σε υψηλές συγκεντρώσεις, ρυθμίζει την έκφραση του GR στον εγκέφαλο διατηρώντας μια δυναμική ισορροπία.

### *GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper)*

Το γονίδιο αυτό αποτελεί μεταγραφικό στόχο του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, GR. Το σύμπλοκο κορτικοστερόνης-GR, μετά την είσοδό του στον πυρήνα, επάγει την έκφραση του γονιδίου *GILZ*. Ο υποκινητής του *GILZ* περιλαμβάνει 6 GREs, σημεία

δηλαδή στα οποία μπορεί να προσδεθεί ο GR και να λειτουργήσει ως μεταγραφικός παράγοντας. Εκτός αυτών, έχουν βρεθεί δύο υψηλής συγγένειας για τον GR GREs, που εδράζονται 2kb ανοδικά της θέσης έναρξης μεταγραφής του υποκινητή του *GILZ* στον επίμου (113). Το *GILZ* (ή αλλιώς *TSC22D3*) εδράζεται στο X χρωμόσωμα και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με δομή «φερμουάρ» λευκίνης (*leucine zipper, LZ*). Η πρωτεΐνη αυτή στον μυ έχει μέγεθος 137 αμινοξέων ενώ στον άνθρωπο έχει μέγεθος 135 αμινοξέων (114, 115). Το προϊόν του *GILZ* στο μυ αποτελείται από μια -NH<sub>2</sub>, αμινοτελική περιοχή, μια -COOH, καρβοξυτελική περιοχή πλούσια σε προλίνη και γλουταμικό οξύ και την κεντρική περιοχή με δομή LZ (116). Το γονίδιο αυτό εκφράζεται σε πολλούς ιστούς του ανθρώπου και του μυός και ρυθμίζεται θετικά από τα γλυκοκορτικοειδή στα κύτταρα περιοχών του εγκεφάλου που σχετίζονται με την απόκριση στο στρες, στα θυμοκύτταρα και T-λεμφοκύτταρα του μυός (117), στα επιθηλιακά κύτταρα που αναπνευστικού σωλήνα του ανθρώπου και σε βλαστικές σειρές μεσεγγυματικών κυττάρων (118, 119). Επιπλέον, η έκφραση της πρωτεΐνης επάγεται και ρυθμίζει διάφορες ορμόνες στην εμβρυική υπόφυση (120). Το *GILZ* αποτελεί το καλύτερο μέτρο εκτίμησης της ενεργότητας του GR, καθώς η μεταγραφή του εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση γλυκοκορτικοειδών (113). Αυξημένη συγκέντρωση γλυκοκορτικοειδών, αυξάνει τη μεταγραφή του *GILZ*, το οποίο ενισχύει τη λειτουργία του HPA άξονα ρυθμίζοντας τη δράση διάφορων κυτταρικών τύπων του ανοσοποιητικού συστήματος (μακροφάγα, T-λεμφοκύτταρα κτλ) (121). Σε καταστάσεις απόκρισης του άξονα HPA στο στρες, παράγεται μεγάλη συγκέντρωση μορίων *GILZ* εντός του κυττάρου. Τα μόρια του *GILZ* προσδέονται τον παράγοντα NF-kB, αποτρέποντας την επαγωγή της έκφρασης IL-6. Αντίστροφα, μείωση της έκφρασης *GILZ*, οδηγεί σε άυξηση των συγκεντρώσεων IL-6. Συνεπώς, η IL-6 μπορεί να επάγει τη δραστηριότητα των γλυκοκορτικοειδών (Εικόνα 1.11.3) (122).



**Εικόνα 1.11.3:** Μεταγραφικό μονοπάτι δράσης του GILZ (122).

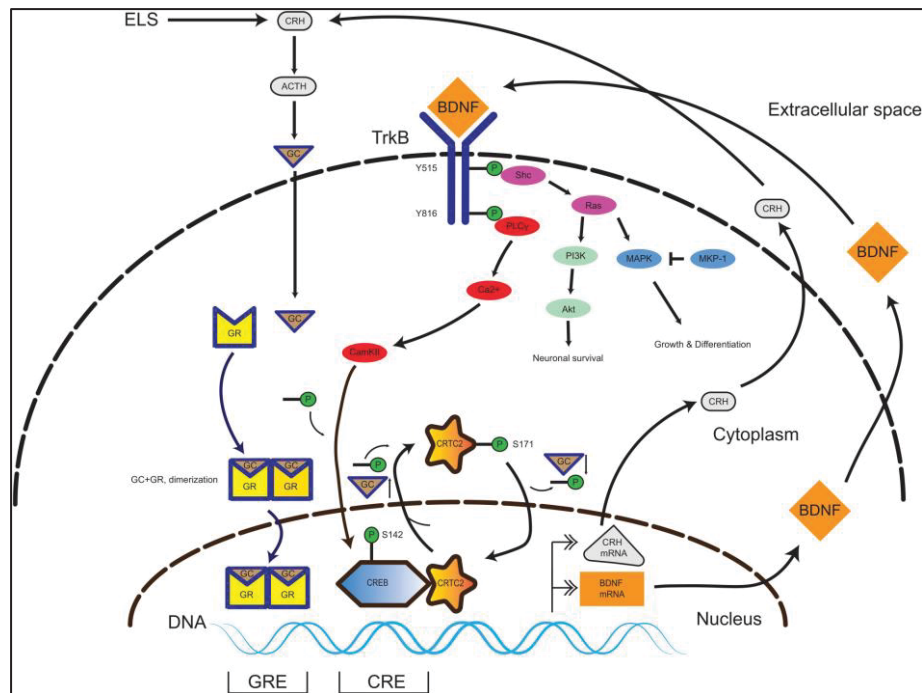
Σύμφωνα με έρευνες για τη δράση του *GILZ* έπειτα από έκθεση των πειραματόζωων σε δοκιμασία εξαναγκασμένης κολύμβησης (water-immersion restraint stress, WRS), διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA του *GILZ* σε περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο μέσος προμετωπιαίος φλοιός και ο ιππόκαμπος. Σε ζώα τα οποία είχαν υποστεί επινεφριδεκτομή, δεν παρατηρήθηκε τέτοια αύξηση, γεγονός που επιβεβαιώνει την αλληλεξάρτηση της έκφρασης του *GILZ* με τον HPA άξονα (123). Συμπερασματικά, το *GILZ*, δρώντας ως μεταγραφικός στόχος του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, αποτελεί το καλύτερο μέτρο ελέγχου της συγκέντρωσης GR κατά τη διερεύνηση της απόκρισης στο στρες.

### ***BDNF (brain-derived neurotrophic factor)***

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια νευροτροφίνη που εκφράζεται στον εγκέφαλο αλλά και στους περιφερικούς ιστούς και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη νευρωνική διαφοροποίηση, στον πολλαπλασιασμό και στη συναπτική πλαστικότητα (124). Η έκφραση του *BDNF* στον εγκέφαλο φαίνεται να επηρεάζεται από το περιβάλλον κατά τη νεαρή ηλικία. Συγκεκριμένα, στην αμυγδαλή μυών, η έκφραση του *BDNF* είναι ανάλογη της μητρικής φροντίδας που δέχεται κάθε νεογνό (125). Σε μια έρευνα που έγινε από τους Boersma και Lee σε επίμυες, διαπιστώθηκε πως η έκθεση σε στρες προγεννητικά οδήγησε σε μείωση των επιπέδων mRNA στην αμυγδαλή των νεογνών. Εκτός αυτού, στην αμυγδαλή των ζώων αυτών, ο υποκινητής του εξονίου IV του γονιδίου *BDNF* βρέθηκε μεθυλιωμένος τις ημέρες 21 και 80 μετά τη γέννηση. Έτσι, η μείωση στην έκφραση του *BDNF* μπορεί να οφείλεται στη μεθυλίωση του υποκινητή του εξονίου IV, η οποία προέκυψε από έκθεση σε στρεσογόνα ερεθίσματα κατά την προγεννητική ανάπτυξη. Επιπλέον, ελέγχθηκε και η έκφραση των DNA μεθυλομεταφορασών Dnmt1, Dnmt3a και Dnmt3b. Διαπιστώθηκε αύξηση της έκφρασης της Dnmt1 στην αμυγδαλή των στρεσορισμένων ζώων, κάτι που υποδηλώνει μεγάλη πιθανότητα δράσης του συγκεκριμένου ενζύμου στη μεθυλίωση του υποκινητή του εξονίου IV (126). Ο σημαντικός ρόλος του *BDNF* στην αμυγδαλή, κατά τη διαδικασία απόκρισης στο άγχος φαίνεται επίσης από το αποτέλεσμα που έχει η απουσία ή η αποσιώπηση του TrkB. Ο TrkB είναι ο υποδοχέας του *BDNF* και σε περιπτώσεις απώλειάς του, έχουν παρατηρηθεί μορφολογικές διαφορές στην αμυγδαλή και συμπεριφορά ανάλογη αυτής που παρατηρείται σε περιπτώσεις στρες (127).



Συμπερασματικά, ο BDNF αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα κατά την απόκριση στο στρες και το σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει με την πρόσδεση στον υποδοχέα του δρα καταλυτικά στην αντιμετώπιση του περιβαλλοντικού στρες (Εικόνα 1.11.4).



**Εικόνα 1.11.4: Αλληλεπίδραση των σηματοδοτικών μονοπατιών του GR και TrkB στο κεντρικό νευρικό σύστημα.** Το στρες κατά τη νεαρή ηλικία ενεργοποιεί τον άξονα HPA με τη δημιουργία του συμπλόκου GR-GC, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί τον υποκινητή του BDNF για τη μεταγραφή του γονιδίου. Η ισορροπία στα επίπεδα BDNF και GC είναι απαραίτητη για την ομοιοστατική ρύθμιση κατά τη νευρογένεση (128).

### *DRD1a (dopamine receptor D1)*

Οι κατεχολαμίνες (ντοπαμίνη, επινεφρίνη, νορεπινεφρίνη) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση στο στρες (129). Υπάρχουν δύο τύποι υποδοχέων ντοπαμίνης, οι D1 και οι D2. Οι D1 υποδοχείς εμφανίζουν δύο ισομορφές τις D1α και D1β, ενώ οι D2 υποδοχείς εμφανίζουν τρεις ισομορφές, τις D2α, D2β, D2γ. Λειτουργία των D1 υποδοχέων είναι η αύξηση της αδενυλικής κυκλάσης ενώ των D2 είναι η μείωση της αδενυλικής κυκλάσης και η παρεμπόδιση της απελευθέρωσης προλακτίνης. Οι D1α υποδοχείς έχουν μικρή συγγένεια για την ντοπαμίνη, ενώ οι D1β έχουν μεγαλύτερη. Οι υποδοχείς ντοπαμίνης είναι υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνες και ενεργοποιούνται από προσδέτες όπως φωτόνια, αμίνες, λιπίδια, πεπτιδία και

γλυκοπρωτεΐνες. Η ντοπαμίνη είναι παρούσα στις περισσότερες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος αλλά τα βασικά νευρωνικά μονοπάτια που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ντοπαμινεργική διαβίβαση είναι τέσσερα. Το πρώτο μονοπάτι συνδέει την κοιλιακή καλύπτρα (ventral tegmental area, VTA) με το φλοιό και σχετίζεται με τη συναισθηματική κινητοποίηση και απόκριση. Το δεύτερο μονοπάτι ενώνει την κοιλιακή καλύπτρα με περιοχές του μεταϊχμιακού συστήματος όπως ο ιππόκαμπος και η αμυγδαλή και συμμετέχει στο σύστημα ανταμοιβής του εγκεφάλου. Επιπλέον, το μονοπάτι αυτό φαίνεται να ενεργοποιείται κατά την απόκριση στο στρες. Το τρίτο μονοπάτι συνδέει τη μέλαινα ουσία (substantia nigra, SN) με το ραβδωτό σώμα (striatum, STR) και συμμετέχει στον έλεγχο της κίνησης. Το τελευταίο ντοπαμινεργικό μονοπάτι βρίσκεται μεταξύ του υποθαλάμου και της υπόφυσης και ρυθμίζει την ορμονική ισορροπία και τη διαδικασία της εγκυμοσύνης. Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) εμπλέκεται σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με απορύθμιση των ντοπαμινεργικών κυκλωμάτων του εγκεφάλου, όπως η σχιζοφρένεια, η διπολική διαταραχή, η Πάρκινσον αλλά και η εξάρτηση από ουσίες. Η απορύθμιση των συγκεντρώσεων γλυκοκορτικοειδών στον εγκέφαλο μπορεί να επηρεάσει τα ντοπαμινεργικά μονοπάτια. Συγκεκριμένα, διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία υπερεκφράζεται ο υποδοχέας GR σε περιοχές του πρόσθιου εγκεφάλου παρουσιάζουν υπερβολική απόκριση στο στρες, κατάθλιψη και τείνουν να εμφανίζουν υπερευαισθησία στα αντικαταθληπτικά. Επίσης εθίζονται εύκολα στην κοκαΐνη. Συμπερασματικά, αλλαγές στην έκφραση του γονιδίου GR θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην επαναφορά της συναισθηματικής σταθερότητας σε ασθένειες όπως η διπολική διαταραχή.

Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των υποδοχέων ντοπαμίνης φέρουν στους υποκινητές τους ειδικές αλληλουχίες δέσμησης μεταγραφικών παραγόντων όπως ο AP-1 και ο CREB. Γνωρίζουμε πως η έκφραση των AP-1, CREB ρυθμίζεται αρνητικά από μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο GR, συνεπώς η έκφραση των υποδοχέων ντοπαμίνης είναι πιθανό να ρυθμίζεται έμμεσα από την έκφραση γλυκοκορτικοειδών σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου (130). Τέλος, είναι γνωστό πως τα γλυκοκορτικοειδή ενισχύουν τη δράση των αγωνιστών ντοπαμίνης στο μεταϊχμιακό σύστημα και συνεπώς είναι πιθανό να συμμετέχουν στο σύστημα ανταμοιβής, διευκολύνοντας τη λήψη αποφάσεων και βοηθώντας τον οργανισμό να ανταπεξέλθει σε στρεσογόνες συνθήκες.

### *POMC (pro-opiomelanocortin)*

Η προ-οπιομελανοκορτίνη κωδικοποιείται από το γονίδιο *POMC* και συμμετέχει ενεργά όπως είπαμε, στην ακολουθία σημάτων που πυροδοτεί ένα στρεσογόνο ερέθισμα στον άξονα HPA. Η παραγωγή και η έκκρισή της πραγματοποιείται κατά κύριο λόγο στην υπόφυση του εγκεφάλου, όπου συντίθεται περίπου το 1/3 του συνολικού mRNA, και ελέγχεται ειδικά από τη δράση των ορμονών CRH, AVP και GC. Οι δύο πρώτες δρουν ενεργοποιώντας την έκκριση POMC, ενώ η έκκριση γλυκοκορτικοειδών σε απόκριση στο στρες δρα παρεμποδίζοντάς την (131-140). Το γονίδιο της προ-οπιομελανοκορτίνης εδράζεται στο χρωμόσωμα 2 για τον άνθρωπο (132), ενώ στο μύ διακρίνεται σε δύο ισομορφές ( $\alpha$ -POMC και  $\beta$ -POMC) οι οποίες αντιστοιχούν στα χρωμοσώματα 12 και 19 αντίστοιχα (141). Η πρώτη, παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την αλληλουχία του ανθρώπινου γονιδίου (142), ενώ η δεύτερη αποτελεί ψευδογονίδιο με χαμηλή ομολογία με τα αντίστοιχα γονίδια και μηδαμινή έκφραση στην υπόφυση (141). Το γονίδιο περιέχει τρία εξόνια στα οποία παρεμβάλλονται δύο ιντρόνια, και το mRNA μεταφράζεται για τη δημιουργία μιας μικρής πρωτεΐνης μεγέθους 30-kDa. Αυτό το μόριο αποτελεί την πρόδρομη μορφή των ορμονών κορτικοτροπίνης (ACTH), ενδορφίνης, μελανοτροπίνης (MSH) και λιποτροπίνης (LPH) (132, 134, 136, 139).

Αναφορικά με το οξύ στρες, σε ένα πείραμα που διεξήχθη το 1999 από την ερευνητική ομάδα του Zhou Y., μελετήθηκε η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου POMC σε επίπεδο mRNA μετά από έκθεση επίμυων σε διαδικασία ήπιου στρες περιορισμένης κολύμβησης. Κάτω από αυτές τις συνθήκες τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αυξήθηκαν στην περιοχή της υπόφυσης (143), κάτι το οποίο εξηγείται από προηγούμενη έρευνα που υποστηρίζει τον έλεγχο της έκφρασης του POMC μέσω του μηχανισμού αρνητικής επανατροφοδότησης των γλυκοκορτικοειδών (144). Πολύ αργότερα, διερευνήθηκε ο μηχανισμός δράσης των λιποπολυσακχαριτών (LPS) αναφορικά με την επίδρασή τους στις γνωστικές λειτουργίες του εγκεφάλου (μνήμη και μάθηση). Έγχυση υψηλής δόσης LPS ενδοπεριτοναϊκά σε μύες, οδήγησε σε αρνητική ρύθμιση του συστήματος των νευροτροφινών στον εγκέφαλο, καθώς επίσης και του HPA άξονα επηρεάζοντας το κεντρικό νευρικό σύστημα. Επομένως, η σταθερά μειωμένη έκφραση των γονιδίων *BDNF*, *CRH* και *POMC* μετά την 3η ημέρα από την έγχυση των λιποπολυσακχαριτών, καταδεικνύει την εμπλοκή του μηχανισμού αρνητικής επανατροφοδότησης του HPA άξονα στην παρεμπόδιση της λειτουργίας των νευροτροφινών στους αντίστοιχους

νευρώνες (145). Αξίζει να σημειωθεί ότι τελευταία το ενδιαφέρον εστιάζεται στη συσχέτιση της διατροφής με την απόκριση των νευρώνων του εγκεφάλου στους οποίους κεντρικό ρόλο παίζουν οι αλληλεπιδράσεις GR-POMC. Συγκεκριμένα, περιορισμός της λήψης τροφής κατά την εμβρυική ανάπτυξη οδηγεί σε διαταραχή των νευρώνων του υποθαλάμου όπου παρατηρείται αυξημένη ακετυλίωση και μειωμένη μεθυλίωση του υποκινητή των γονιδίων GR και POMC. Οι αλλαγές αυτές δεν συνοδεύονται με αλλαγές στην έκφραση του γονιδίου *POMC* στον υποθάλαμο, ούτε και με επιγενετικές αλλαγές του προτύπου μεθυλίωσης του *GR* στην υπόφυση και τον ιππόκαμπο. Οι παραπάνω παρατηρήσεις συνηγορούν στην υπόθεση ότι επιγενετικές αλλαγές στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια μπορεί να διαταράξουν την ισορροπία του ομοιοστατικού μηχανισμού στα μετέπειτα στάδια της ζωής (146). Διερευνώντας τις αλλαγές των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση πρόσληψης τροφής και τον μεταβολισμό, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα mRNA του *POMC* είναι αρκετά αυξημένα στον ιππόκαμπο ενήλικου ανθρώπου σε σχέση με τον εμβρυϊκό. Επομένως, πιθανώς η προ-οπιομελανοκορτίνη όπως και άλλα νευροπεπτίδια (AgRP (Agouti-Related Protein), CART (Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript), NPY (Neuropeptide Y)) συμμετέχουν ενεργά στην ανάπτυξη της δομής του ιππόκαμπου (147) και κατ' επέκταση στο μηχανισμό απόκρισης του οργανισμού σε στρεσογόνα ερεθίσματα.

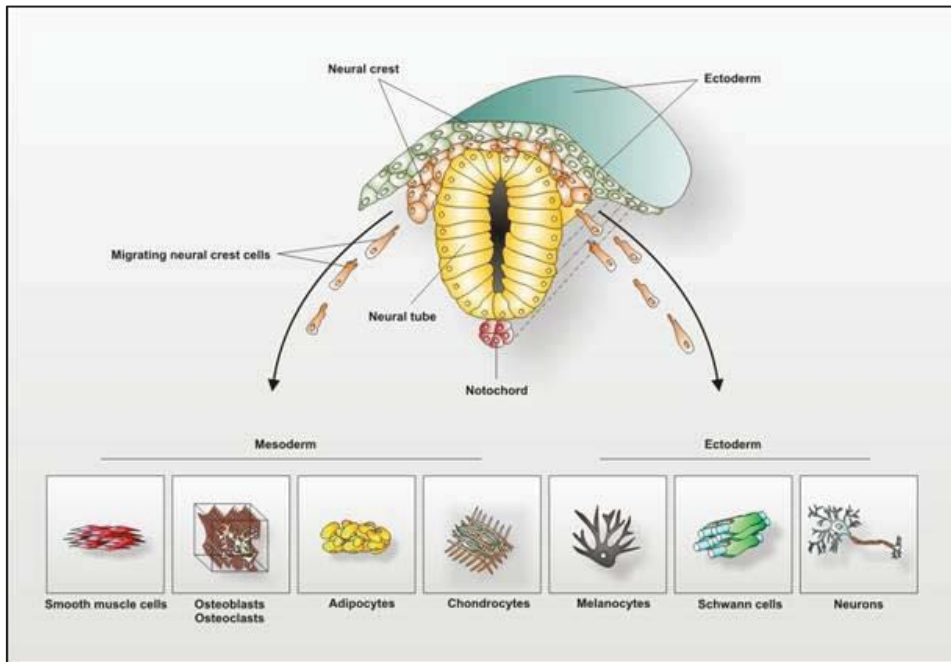
### **1.12 Φαρμακολογική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών σε κυτταρικό επίπεδο**

Οι στεροειδής ορμόνες και οι μεταβολίτες τους συμμετέχουν ενεργά στη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) και η διαθεσιμότητα των κυτταρικών σειρών του νευροβλαστώματος μας έδωσε τη δυνατότητα να μελετήσουμε σε μοριακό επίπεδο τη δράση των στεροειδών ορμονών στο ανθρώπινο νευρικό σύστημα. Γνωρίζοντας ότι τα οιστρογόνα και οι άλλες ορμόνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση και την επέκταση των νευρώνων και νευριτών *in vivo*, θεωρήθηκε κρίσιμης σημασίας η διερεύνηση του ρόλου των γλυκοκορτικοειδών σε κυτταρικό επίπεδο (*in vitro*). Ένα από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα και καλά μελετημένα κυτταρικά συστήματα στη διερεύνηση της επίδρασης γλυκοκορτικοειδών ως προς τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, είναι η κυτταρική σειρά SH-SY5Y (148). Ως συνθετικό

γλυκοκορτικοειδές χρησιμοποιείται η ουσία δεξαμεθαζόνη (dexamethasone), η οποία αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό στον κυτταρικό κύκλο όταν χορηγείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και σε συνδυασμό με θεραπευτικό υλικό απουσία στεροειδών. Επίσης η ουσία αυτή φαίνεται να επηρεάζει τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων του νευροβλαστώματος (SK-N-SH), παρεμποδίζοντάς την (149). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται πειραματικά με την αντίστροφη δράση μιας ουσίας που δρα ανταγωνιστικά ως προς τα γλυκοκορτικοειδή (RU486). Η χημική ουσία RU486 ή μιφεπριστόνη (mifepristone) έχει τα αντίθετα αποτελέσματα από τη δεξαμεθαζόνη όμως η δράση της δεν αντιστρέφεται από την τελευταία. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η αύξηση του ρυθμού κυτταρικού πολλαπλασιασμού διαμεσολαβείται από τη συμμετοχή διακυτταρικών υποδοχέων όπως είναι ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR) (150).

### **1.13 Κυτταρικές σειρές νευρικής ακρολοφίας**

Οι κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον στη μελέτη της τοξικότητας και των αντίστοιχων μηχανισμών. Προέρχονται οντογενετικά από τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας τα οποία χαρακτηρίζονται από μεγάλη πλαστικότητα, που σημαίνει ότι από αυτά μπορούν να προκύψουν πολλοί διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι, από νευρικά μέχρι οστικά κύτταρα (Εικόνα 1.13.1). Οι νευροβλαστωματικές σειρές χαρακτηρίζονται συνήθως από διαφορές στη μορφολογία, τα σηματοδοτικά μονοπάτια και την ανάπτυξη από τις αντίστοιχες πατρικές σειρές και ως εκ τούτου η απόκριση σε τοξικές συνθήκες δεν ταυτίζεται με αυτή των νευρώνων. Θα πρέπει επομένως να αξιολογούνται σωστά οι διαφορές σε λειτουργικό επίπεδο, ώστε η φαρμακολογική επίδραση να είναι αντίστοιχη.



**Εικόνα 1.13.1: Κυτταρικοί τύποι που προέρχονται από τη νευρική ακρολοφία.** Κατά την ωρίμανση, τα κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας μεταναστεύουν και διαφοροποιούνται σε κύτταρα νευρώνων, οστοβλάστες, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα κ.α. ([web.biologie.uni-bielefeld.de](http://web.biologie.uni-bielefeld.de)).

### *SH-SY5Y*

Το μεγαλύτερο μέρος της βιβλιογραφίας εστιάζεται στη μελέτη πάνω στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος SK-N-SH. Αυτά προέρχονται από μεταστατικό καρκίνο του μυελού των οστών ενός τετράχρονου κοριτσιού και στην καλλιέργεια έχουν τις ιδιότητες κυττάρων νευρικής ακρολοφίας. Η σειρά αυτή διακρίνεται σε δύο υποκατηγορίες ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους: Α) SH-SY5Y, τα οποία συμπεριλαμβάνουν ένζυμα βιοσύνθεσης κατεχολαμίνης, και Β) SH-EP, τα οποία παρουσιάζουν τα χαρακτηριστικά μελανοκυττάρων Schwann (151, 152). Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y διακρίνεται με τη σειρά της σε δύο τύπους κυττάρων: τα S-type, που αποτελούν νευρογλοϊικά κύτταρα και τα N-type, που είναι κύτταρα που σχηματίζουν νευρώνες. Η μορφολογία και τα βιοχημικά μονοπάτια για τη διαφοροποίηση των κυττάρων SH-SY5Y εξαρτώνται από τους παράγοντες που εμπλουτίζονται τα θρεπτικά υλικά, με τη χρήση του ρετινοϊκού οξέος (RA) να οδηγεί τα κύτταρα προς χολινεργικό φαινότυπο (153). Έχοντας λίγα στοιχεία για το μεταβολισμό των στεροειδών ορμονών στα νευρικά κύτταρα, οι έρευνες εστίαστηκαν στην ανάλυση των ενζύμων που συμμετέχουν στον εγκέφαλο, μέσω αυτού του κυτταρικού συστήματος. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα

η τεστοστερόνη (T) και η προγεστερόνη (P) συμμετέχουν ενεργά. Η προγεστερόνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις προάγει την κυτταρική ανάπτυξη και την επιβίωση, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι κυτταροτοξική (150). Προσεγγίζοντας το θέμα αντίστροφα με τη χρήση της ουσίας μifeπριστόνης (17 $\beta$ -hydroxy-11 $\beta$ -(4-dimethylamino-phenyl-1)-17-(prop-1-ynyl)estra-4,9-dien-3-one) ή RU486, που δρα ανταγωνιστικά σε σχέση με την προγεστερόνη, οι έρευνες έδειξαν ότι παρεμποδίζεται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων SK-N-SH σύμφωνα με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Η δράση της μifeπριστόνης έχει κυτταροστατικό αποτέλεσμα και ανταγωνίζεται τα γλυκοκορτικοειδή στο ρόλο τους στο νευρικό σύστημα (154).

### *N2A (Neuro2a)*

Αυτή η κυτταρική σειρά αποτελεί μια κατηγορία κυττάρων νευροβλαστώματος μύος με κύριο χαρακτηριστικό τον ταχύ ρυθμό πολλαπλασιασμού, που την καθιστά ιδιαίτερα δημοφιλή ως *in vitro* πειραματικό μοντέλο. Τα εν λόγω κύτταρα μπορούν να διαφοροποιούνται σε κύτταρα με χαρακτηριστικά νευρώνων και χρησιμοποιούνται ευρέως στη μελέτη της τοξικότητας (155), της αύξησης των νευριτών (156) και της ασθένειας Alzheimer's (157). Αναφορικά με την τοξικότητα, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σύγκρισης της επίδρασης νευροτοξικών ουσιών στην ομοιόσταση και την επιβίωση μεταξύ νευρωνικών κυττάρων και κυττάρων N2A. Φαίνεται πως η ευαισθησία των κυττάρων διαφέρει, με την κυτταροτοξικότητα στους νευρώνες να εκδηλώνεται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό. Για τη διερεύνηση των μηχανισμών απόκρισης σε στρεσογόνα ερεθίσματα, έχουν μελετηθεί μεταξύ άλλων και τα τάση-εξαρτώμενα κανάλια ιόντων νατρίου (Voltage-Gated Sodium Channels- VGSC) με τους υποδοχείς τους (N-methyl-D-aspartate receptors- NMDAR). Η αυξημένη απελευθέρωση ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα με αντίστοιχη αύξηση της έκφρασης των VGSC και NMDAR, συνοδεύει την κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα των νευρώνων, υποστηρίζοντας την εμπλοκή του ασβεστίου στο μηχανισμό απόκρισης στο στρες. Παρόλα αυτά, δεν συμβαίνει το ίδιο στα κύτταρα νευροβλαστώματος N2A (155). Η παρατήρηση αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η επίδραση ουσιών που δρουν στο νευρικό σύστημα δεν αποτελεί μονόδρομο, και θα πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά ο μηχανισμός απόκρισης στον κάθε κυτταρικό τύπο ξεχωριστά. Προς την κατεύθυνση αυτή, μια διαφορετική μελέτη έδειξε ότι η δεξαμεθαζόνη περιορίζει την κυτταροτοξικότητα ουσιών που δρουν καταστρεπτικά στους νευρώνες, όπως για παράδειγμα της ουσίας λιδοκαΐνης (Lido) η οποία δρα μέσω της

αποφωσφορυλίωσης της πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB/ Akt) (158). Το συνθετικό αυτό γλυκοκορτικοειδές φαίνεται να δρα προστατευτικά ενάντια στην κυτταροτοξικότητα, καθώς προσδίδει ανθεκτικότητα σε τέτοιου είδους ουσίες και για τον λόγο αυτό θα μας φανεί ιδιαίτερα χρήσιμο στην πορεία της μελέτης μας.

### *BE(2)-C*

Η κυτταρική σειρά BE(2)-C αποτελεί κλώνο ανθρώπινου νευροβλαστώματος και είναι αρκετά καλά χαρακτηρισμένη. Η εμπλουτισμένη καλλιέργεια με ρετινοϊκό οξύ και φορσκολίνη ενισχύει τη σύνθεση και έκκριση CRH, στοιχείο που υποστηρίζει τη συμμετοχή του συστήματος του HPA άξονα. Επιπλέον, μελετάται η απόκριση των κυττάρων αυτών στη δεξαμεθαζόνη, ιντερλευκίνες και διάφορα πεπτίδια, νευροδιαβιβαστές και πρωτεϊνικούς ενεργοποιητές (159). Τα γλυκοκορτικοειδή φαίνεται να αναστέλουν την έκκριση ACTH παρεμποδίζοντας τη μεταγραφή του γονιδίου CRH. Στο μοριακό μηχανισμό της δράσης αυτής εμπλέκεται ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR) ανεξάρτητα από παράγοντες αρνητικής απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (negative Glucocorticoid-Response Elements, nGRE), με την πιθανή εμπλοκή όμως της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), η υπερέκφραση της οποίας ανταγωνίζεται τη δράση της δεξαμεθαζόνης (160). Όλοι οι παράγοντες ρύθμισης της ισορροπίας στο εσωτερικό του κυττάρου έχουν μια αλληλεπίδραση με διαφορετική βαρύτητα ανάλογα με το είδος του ερεθίσματος. Η διερεύνηση της μεταγραφικής ρύθμισης του υποδοχέα αλατοκορτικοειδών (MR) αντίστοιχα στην ίδια κυτταρική σειρά, αποκαλύπτει την αναγκαιότητα της δράσης του GR και σε αυτό το επίπεδο. Η εν λόγω έρευνα υποστηρίζει ότι η μεταγραφική ρύθμιση γονιδίου που εξαρτάται από το ισοζύγιο GR/MR (HRE- lusiferase), ενισχύεται μόνο παρουσία και του GR. Η χορήγηση αλδοστερόνης που αποτελεί ουσία αγωνιστή του MR, δεν ενεργοποιεί τη μεταγραφή του HRE, ακόμα και σε συνθήκες υπερέκφρασης του υποδοχέα. Αντιθέτως, όταν στο σύστημα συμμετέχει και ο GR, η απόκριση του μηχανισμού μεταγραφής είναι σαφής. Η παρατήρηση αυτή προτείνει τη συμμετοχή του GR είτε σαν ετεροδιμερές του MR, είτε ως συμπάραγοντας ενεργοποίησης στα ομοδιμερή MR-MR (161). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι δεν έχουν όλες οι υπομονάδες του GR την ίδια απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή. Η GR-β υπομονάδα δεν έχει την ικανότητα να ασκήσει θετική ή αρνητική ανάδραση στα γονίδια στόχους της, όταν η βασική μορφή του υποδοχέα (GR-α) αποσιωπάται. Αυτό που κάνει είναι να παρεμβαίνει στην αποσιώπηση της μεταγραφής γονιδίων- στόχων των λοιπών υπομονάδων, κι αυτός ο μηχανισμός είναι



ίσως η εξήγηση της ανθεκτικότητας στα γλυκοκορτικοειδή που παρουσιάζεται σε κάποιες μολυσματικές ασθένειες (162).

### *HCN*

Οι κυτταρικές σειρές που αναπτύχθηκαν από νευρώνες του φλοιού του ανθρώπου (human cortical neuronal, HCN) εγκαθιδρύθηκαν σαν ένα πολλά υποσχόμενο ερευνητικό μοντέλο τη δεκαετία του 1990 και έκτοτε χρησιμοποιούνται κατά κόρον στη διερεύνηση ανθρώπινων νευρολογικών παθήσεων, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ (163) και η εγκεφαλίτιδα που σχετίζεται με τον ιό HIV-1 (164). Διακρίνονται σε δύο επιμέρους σειρές: Α) HCN-1, τα οποία προήλθαν από ένα περιστατικό νεογνού 11 μηνών με μεγαλεγκεφαλία στο ένα ημισφαίριο και Β) HCN-2, τα οποία προήλθαν από εγκεφαλίτιδα “Rasmussen” σε παιδί 7 ετών (165). Τα ανθρώπινα νευρικά κύτταρα HCN-1 εμφανίζουν τυπικά χαρακτηριστικά πολυδυναμίας ως ανώριμα κύτταρα νευρικής φύσεως. Εκφράζουν ειδική νευρωνική ενολάση (neuron-specific enolase, NSE), πρωτεΐνες νευρικού νηματίου, πρωτεΐνες μικροσωληνίσκων (microtubule-associated protein 2, MAP2), καθώς επίσης και διάφορους νευροδιαβιβαστές με τους υποδοχείς τους, ενώ δεν εκφράζουν δείκτες νευρογλοίας (π.χ. GFAP) (166). Κάτω από ιδανικές συνθήκες, διαφοροποιούνται σε ώριμους νευρώνες και εκφράζουν φιμπρονεκτίνη όπως επίσης και κάποιες ουσίες ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκονται, ενώ χαρακτηρίζονται από ανάμεικτο φαινότυπο, εκφράζοντας τόσο νευρωνικούς όσο και μεσεγχυματικούς δείκτες. Πρόκειται πιθανόν για προγονικά νευροεπιθηλιακά κύτταρα και επιπλέον διακρίνονται από δυνατότητα μετασχηματισμού που τα καθιστά κατάλληλα για τη μελέτη της μεταμόσχευσης εγκεφάλου (167). Τα HCN-1A κύτταρα αποτελούν έναν υποτύπο των HCN-1, ο οποίος προήλθε από ένα περιστατικό θηλυκού νεογνού 18 μηνών με μεγαλεγκεφαλία στο ένα ημισφαίριο και είναι η πρώτη ανθρώπινη μη-μετασχηματισμένη νευρική κυτταρική σειρά (166). Αυτά τα κύτταρα έχουν ρυθμό πολλαπλασιασμού 96-120 ώρες σε μονόστοιβη καλλιέργεια και η μορφολογία τους είναι επίπεδη και πολύγωνη. Όταν υπόκεινται σε διαδικασία διαφοροποίησης τα HCN-1A κύτταρα εμφανίζουν ιδιότητες νευρώνων με την ανάπτυξη και τον σχηματισμό νευριτών.

## 1.14 Στρες και σύστημα ενδοκανναβινοειδών

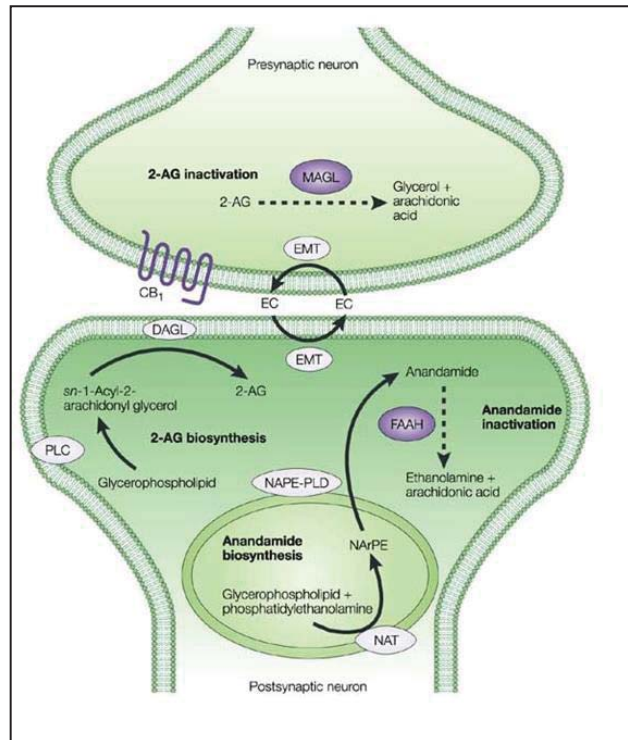
### 1.14.1 Η συσχέτιση του συστήματος ενδοκανναβινοειδών με τη λειτουργία του άξονα HPA ως απόκριση στο άγχος και το φόβο

Σήμερα, η ρύθμιση του συστήματος ενδοκανναβινοειδών βρίσκεται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος στην προσπάθεια βελτίωσης της θεραπείας ψυχωσικών διαταραχών. Το σύστημα ενδοκανναβινοειδών (eCB) φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση της απόκρισης στο στρες και της λειτουργίας του νευροενδοκρινικού συστήματος, καθώς υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν τον ρόλο των κανναβινοειδών στη λειτουργία του HPA άξονα μετά από στρεσογόνα ερεθίσματα (168). Τα κανναβινοειδή και τα φάρμακα που επιδρούν στο σύστημα ενδοκανναβινοειδών χρησιμοποιούνται ευρέως στη μελέτη του στρες και του φόβου *in vivo*, ενώ ο κάθε οργανισμός μπορεί να ανταποκρίνεται εξατομικευμένα και με γνώμονα τα εκάστοτε περιβαλλοντικά ερεθίσματα.

Το σύστημα eCB αποτελείται από: Α) τους υποδοχείς ενδοκανναβινοειδών (CB1, CB2), με τον υποδοχέα τύπου 1 (CB1) να εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, Β) τα ενδοκανναβινοειδή, ανανδαμίδη (N- arachidonylethanolamide/ AEA) και 2-αραχιδοנוύλογλυκερόλη (2-arachidonoylglycerol/ 2-AG), Γ) τα αντίστοιχα μεταβολικά ένζυμα, υδρολάση του αμιδίου των λιπαρών οξέων (fatty acid amide hydro-lase/ FAAH) και λιπάση της μονοακυλγλυκερόλης (monoacylglycerol lipase/ MAGL) και Δ) έναν μεταφορέα ενδοκανναβινοειδών (Εικόνα 1.14.1)(169). Ο υποδοχέας CB1, η AEA, η 2-AG και το ένζυμο FAAH εκφράζονται κυρίως σε περιοχές του εγκεφάλου οι οποίες σχετίζονται με το στρες, το συναίσθημα, τον φόβο και το άγχος (170, 171). Τα κανναβινοειδή δρουν ενεργοποιώντας τον υποδοχέα CB1 στις περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος του εγκεφάλου (φλοιό, αμυγδαλή, ιππόκαμπος) όπου δηλαδή εντοπίζονται σε μεγάλο βαθμό οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (GR) (172).

Αναφορικά με τη συσχέτιση του συστήματος ενδοκανναβινοειδών και των γλυκοκορτικοειδών, γνωρίζουμε ότι επηρεάζουν λειτουργικά το ένα το άλλο με αμφίδρομο τρόπο. Συγκεκριμένα, το σύστημα eCB παίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή της λειτουργίας του HPA άξονα σε απόκριση στο στρες. Τα γλυκοκορτικοειδή ευαισθητοποιούν το σύστημα eCB ώστε να δράσει άμεσα προσφέροντας στον αρνητικό επανατροφοδοτικό έλεγχο για τη ρύθμιση της ομοιόστασης. Αυτή η αλληλεπίδραση

μεταξύ των δύο συστημάτων στον περιορισμό της έντασης της διαταραχής, υποστηρίζει τη χρησιμότητα μιας θεραπείας βασιζόμενης στα κανναβινοειδή για τον έλεγχο των στρεσογόνων καταστάσεων και την πρόληψη ανάπτυξης ψυχωσικών διαταραχών (168). Παρόλα αυτά, τα συνθετικά κανναβινοειδή προσδίδουν διαφορετικού είδους νευροενδοκρινική απόκριση του HPA άξονα απ' ότι τα ενδοκανναβινοειδή, πιθανώς εξαιτίας της έλλειψης ειδικότητας (173, 174). Αυτή θα μπορούσε να είναι και η εξήγηση για τα αντικρουόμενα αποτελέσματα ορισμένων μελετών που υποστηρίζουν ότι η υπερδοσολογία έχει τα αντίθετα αποτελέσματα από τη μειωμένη συγκέντρωση του φαρμάκου (175). Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί πειραματικά ότι η χαμηλή δόση φαρμάκου προσδίδει αγχολυτική δράση, ενώ η υπερδοσολογία έχει αντίθετα αποτελέσματα. Από την άλλη, η ενζυμική παρεμπόδιση της αποδόμησης των ενδοκανναβινοειδών ενισχύει την ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων, μειώνοντας έτσι την αγχογόνο συμπεριφορά. Έτσι, η φαρμακολογική παρεμπόδιση ή η γενετική αποσιώπηση των CB1 υποδοχέων αναμένεται να έχει αντίθετη δράση. Η θεραπευτική αξία της Δ<sub>9</sub>-THC στη μετατραυματική εμπειρία έχει εγείρει ένα νέο ενδιαφέρον. Γνωρίζοντας ότι τα φυτοκανναβινοειδή παρεμβάλλονται στο ρόλο των γλυκοκορτικοειδών στη μνήμη τραυματικών εμπειριών, μελετάται πληθώρα μορίων που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία. Έτσι, ενώ η χορήγηση δέλτα-9-τετραϋδροκανναβινόλης (Δ<sub>9</sub>-THC) σε ζώα ενεργοποιεί την ACTH για απελευθέρωση γλυκοκορτικοειδών, η φαρμακολογική διέγερση των CB1 υποδοχέων με ουσιές αγωνιστές ή ουσιές που παρεμποδίζουν τη δράση του ενζύμου FAAH, εμποδίζει την απόκριση στο στρες ελαττώνοντας την αποδοτικότητα του HPA άξονα (176). Πρόσφατα μελετήθηκαν οι επιπτώσεις του στρες στη γονιδιακή έκφραση απουσία του υποδοχέα CB1. Βρέθηκε ότι η έκθεση των πειραματόζων σε ένα χρόνιο στρεσογόνο ερέθισμα οδήγησε στην ανάπτυξη καταθλιπτικού φαινότυπου με γονιδιακές αλλαγές παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται σε ζώα με αποσιώπηση του CB1. Το DRD1A είναι μεταξύ αυτών των γονιδίων, υποστηρίζοντας την ομοιότητα του καταθλιπτικού φαινότυπου απουσία CB1 υποδοχέα, με τον φαινότυπο που αναπτύσσουν τα ζώα αγρίου τύπου που υφίστανται έκθεση σε χρόνιο στρες (177).



**Εικόνα 1.14.1:** Μεταβολικά μονοπάτια του συστήματος ενδοκανναβινοειδών και ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των μορίων (178).

### 1.14.2 Εντοπισμός του CB1 υποδοχέα και διερευνητική προσέγγιση σύμφωνα με τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται

Ο υποδοχέας CB1 είναι μια διαμεμβρανική G πρωτεΐνη και εκφράζεται φυσιολογικά σε όλα τα μέρη του εγκεφάλου. Παρόλα αυτά, ο εντοπισμός του σε μεγάλη πυκνότητα στο φλοιό και τον υπόκαμπο δικαιολογεί τον συσχετισμό των κανναβινοειδών με τις διεργασίες μνήμης και μάθησης. Επιπλέον, εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα στα βασικά γάγγλια, την παρεγκεφαλίδα και την αμυγδαλή, περιοχές οι οποίες σχετίζονται με το συναίσθημα και την κίνηση (179). Οι CB1 υποδοχείς βρίσκονται στις προσυναπτικές απολήξεις σε καταστάσεις ηρεμίας. Τα ενδοκανναβινοειδή από την άλλη εντοπίζονται μετασυναπτικά και η ενεργοποίησή τους δίνει σήμα να απελευθερωθούν και να προσδεθούν στους υποδοχείς, ώστε να καταστείλουν την περαιτέρω απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών (Εικόνα 1.14.1)(180). Οι φαρμακολογικές μελέτες για την αποδοτικότητα των ενδοκανναβινοειδών βασίζονται σε κάποια κλινικά χαρακτηριστικά: μειωμένη κινητικότητα, πτώση της θερμοκρασίας του σώματος, κρίσεις αναλγησίας και καταληψίας. Για την καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας του συστήματος

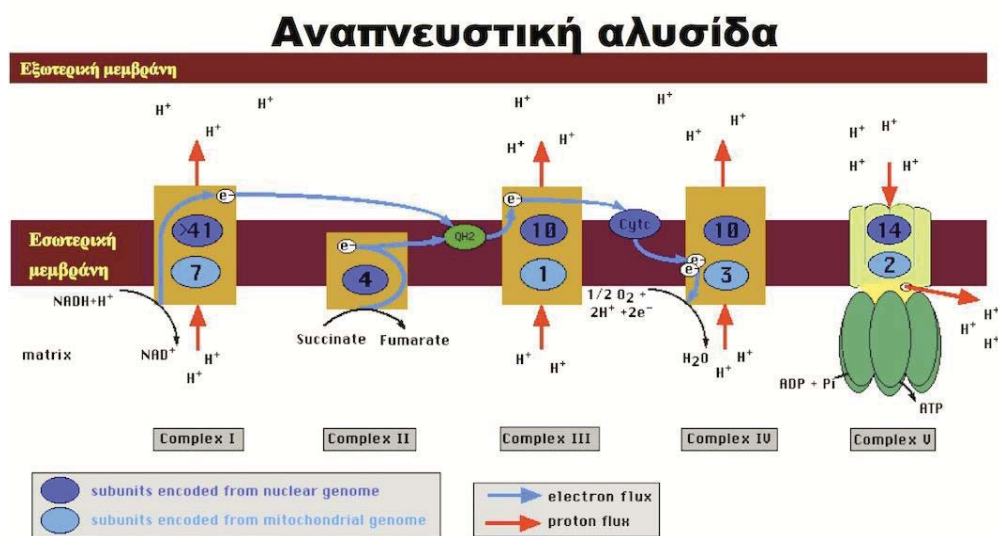
ενδοκανναβινοειδών, δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ζωικά μοντέλα αποσιώπησης του CB1 μέσω διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Camk-CB1-KO, GABA-CB1-KO, Glu-CB1-KO, D1-CB1-KO). Η ανανδαμίδη όμως ενεργοποιεί εκτός από το CB1 και τον υποδοχέα βανιλλοειδών τύπου 1 (Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1, TRPV1). Παρόλα αυτά, η παρεμπόδιση αυτών των υποδοχέων έχει αντίθετα αποτελέσματα όπως παρατηρείται σε πειραματόζωα με αποσιώπησης των CB1 και TRPV1. Έτσι, ενώ στα CB1-KO πειραματόζωα η ανανδαμίδη ενισχύει την αγχογόνο συμπεριφορά, στα TRPV1-KO έχει αγχολυτική δράση (180).

Μια εναλλακτική προσέγγιση μελέτης του συστήματος αποτέλεσε η ενζυμική παρεμπόδιση της υδρόλυσης των ενδοκανναβινοειδών με ειδικούς αναστολείς των ενζύμων FAAH και MAGL (181) και τέλος η διερεύνηση της επίδρασης συνθετικών ουσιών που δρουν ενεργοποιώντας (ACEA) ή μπλοκάροντας (AM251) τον υποδοχέα CB1 (182). Παρόλο που γνωρίζουμε ότι τα κανναβινοειδή ασκούν αγχογόνο ή αγχολυτική δράση με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, οι πειραματικές δοκιμές με αγωνιστές και ανταγωνιστές του υποδοχέα σε καταστάσεις ελεγχόμενου ή μη- φόβου, υποστηρίζουν ότι η ίδια δόση μπορεί να έχει διαφορετική επίδραση ανάλογα με την ευαισθησία του υποδοχέα και της περιοχής που ευαισθητοποιεί (182). Όλο και περισσότερα στοιχεία υποστηρίζουν την ενεργοποίηση του συστήματος ενδοκανναβινοειδών σε καταστάσεις άγχους και φόβου, όμως η απόκριση των επιμέρους τμημάτων του εγκεφάλου διαφέρει σημαντικά (183).

### **1.15 Οξειδωτικό στρες: ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην εξέλιξη νευρολογικών διαταραχών**

Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη νευροψυχιατρικών διαταραχών όπως κατάθλιψη, διπολική διαταραχή, άγχος και αυτισμός. Η κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των αλλαγών στη μορφολογία των μιτοχονδρίων, της ενζυμικής ενεργότητας των μιτοχονδρίων και του μεταβολισμού στον εγκέφαλο μπορεί να συμβάλει στην εξέλιξη των φαρμάκων για αποτελεσματικότερη θεραπεία (184).

Τα μιτοχόνδρια είναι υπεύθυνα για τη βασική παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η έσω μιτοχονδριακή μεμβράνη περιέχει μια ειδική «μοριακή μηχανή» για την παραγωγή ενέργειας που ονομάζεται αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) και αποτελείται από πέντε πρωτεϊνικά σύμπλοκα (I, II, III, IV, V). Από αυτά, τα τρία (I, III και IV) αντλούν πρωτόνια διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης, δημιουργώντας ένα ισοζύγιο κατάλληλο για τη σύνθεση ATP στο σύμπλοκο V με τη δράση της ATP συνθάσης (Εικόνα 1.15.1). Το μιτοχονδριακό DNA κωδικοποιεί 13 πρωτεΐνες της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, ενώ το πυρηνικό DNA κωδικοποιεί ακόμα περίπου 1000 πρωτεΐνες που σχετίζονται με διεργασίες ρύθμισης της ομοιόστασης των ιόντων και μεταγωγής σήματος, καθώς και με την απόκριση στο στρες και την επιβίωση του κυττάρου. Η προμήθεια ενέργειας στους νευρώνες βασίζεται σχεδόν εξ' ολοκλήρου στη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση, δεδομένου ότι ο μεταβολισμός της γλυκόζης προσφέρει ελάχιστα στα νευρικά κύτταρα. Το οξειδωτικό στρες προκαλείται από διαταραχές στο μηχανισμό παροχής ενέργειας των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα την παραγωγή τοξικών ουσιών που εμπλέκονται στην παθογένεια του στρες και διαφόρων νευρολογικών ασθενειών. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι η πρόκληση άγχους από κάποιο στρεσογόνο ερέθισμα στα τρωκτικά έχει ως αποτέλεσμα την οξειδωτική καταστροφή λόγω ανεβασμένων επιπέδων μορίων που διαμεσολαβούν τον κύκλο του Krebs. Ως εκ τούτου, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων μπορεί να αποβεί μοιραία για τη λειτουργία του νευρικού συστήματος (184).



Εικόνα 1.15.1: Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Μέσω του μηχανισμού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης τα κύτταρα προμηθεύονται ενέργεια με τη μορφή ATP.

Προκειμένου να δημιουργηθούν κατάλληλα *in vivo* μοντέλα για τη διερεύνηση του στρες, έχουν πραγματοποιηθεί εκτροφές μυών στελέχους CD1 οι οποίες διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες «άγχους», σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας υπερυψωμένου σταυροειδούς λαβυρίνθου (EPM). Έτσι, οι μύες με χαμηλά επίπεδα άγχους (low anxiety-related behavior- LAB) παρουσιάζουν αντίθετες μετρήσεις στις συμπεριφορικές δοκιμασίες από τους αντίστοιχους μύες με υψηλά επίπεδα (high anxiety-related behavior- HAB), ενώ τα ζώα που χαρακτηρίζονται φυσιολογικά (normal anxiety-related behavior- NAB) έχουν ενδιάμεσες μετρήσεις (185). Πρόσφατα μάλιστα εντοπίστηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των μεταβολιτών και ενζύμων του κύκλου του κιτρικού οξέος μεταξύ μυών με υψηλά επίπεδα άγχους (HAB) και μυών με χαμηλά επίπεδα άγχους (LAB). Συγκεκριμένα, στα ζώα τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως «έντονα στρεσαρισμένα» (HAB) εντοπίζονται υψηλά επίπεδα γλουταμινικού (Glu), του νευροδιαβιβαστή δηλαδή που προσδένεται στον υποδοχέα NMDA (186). Θα πρέπει να τονιστεί ότι υπάρχει μεγάλη συνάφεια μεταξύ συναπτικής ενεργότητας και μιτοχονδριακής γονιδιακής έκφρασης (187). Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, μια πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει την υπόθεση ότι οι μοριακές αλλαγές που παρατηρούνται στο φλοιό του εγκεφάλου μυών μετά από την έκθεσή τους σε κάποιο στρεσογόνο παράγοντα, έχουν μιτοχονδριακή προέλευση. Βρέθηκαν λοιπόν αυξημένα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs στα «αγχωμένα ζώα» (HAB), τα οποία συνοδεύονταν από αυξημένο οξειδωτικό στρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτές οι μιτοχονδριακές αλλαγές ακολουθούνται από κάποιες αλλαγές της ρύθμισης επιπέδων ασβεστίου και παραγωγής ATP, οι οποίες επηρεάζουν τους νευροδιαβιβαστές κατά τη συμπεριφορική απόκριση (188). Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται επιπλέον από μία προγενέστερη μελέτη που περιγράφει μια έντονα αγχωτική συμπεριφορά σε ζώα στα οποία έχουν αποσιωπηθεί οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες (189). Συνοψίζοντας, τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των μιτοχονδρίων μπορεί να αποδειχθούν κατάλληλα για στοχευμένες θεραπείες των διαταραχών του φάσματος του στρες (190).

### **1.16 Ο ρόλος των υποδοχέων NMDA και των διαύλων ασβεστίου στη νευρική δυσλειτουργία και τις ψυχικές διαταραχές**

Η διάκριση των μυών στελέχους CD1 σε κατηγορίες ανάλογα με τα επίπεδα άγχους που καταμετράται με τη συμπεριφορά τους, βοήθησε στην εγκαθίδρυση ενός νέου γενετικού μοντέλου διερεύνησης της διαταραχής ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας (ADHD) (191). Τόσο οι έλεγχοι συμπεριφοράς όσο και τα φαρμακολογικά κριτήρια, συνηγορούν στο γεγονός ότι οι LAB μύες παρουσιάζουν φαινότυπο που ομοιάζει με αυτόν του ADHD με υπερκινητικότητα, χαμηλό βαθμό εξοικείωσης, επιρροή στη μνήμη και ανάλογη απόκριση στη χορήγηση αμφεταμίνης. Η κατηγορία αυτή με το σύνθετο γενετικό υπόβαθρο εμφανίζει ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτες δεδομένου ότι αντιπροσωπεύει ένα μοντέλο μανιώδους σχιζοφρένειας (ADHD) (191, 192). Οι διεργασίες μνήμης και μάθησης πιστεύεται ότι διαμεσολαβούνται από ένα μηχανισμό με διαδοχικές αλληλεπιδράσεις μορίων για τη διατήρηση της συναπτικής πλαστικότητας (193-195).

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν το σημαντικό ρόλο των υποδοχέων NMDA στις παραπάνω διεργασίες και τον συσχετίζουν με διαταραχές του νευρικού συστήματος και την ανάπτυξη ψυχωσικών ασθενειών. Η θεωρία υποστηρίζει ότι η περιορισμένη λειτουργία των NMDA υποδοχέων ισοδυναμεί με μειωμένη λειτουργικότητα του φλοιού στη σχιζοφρένεια. Η ενδοκυττάρια ενεργότητα των NMDA υποδοχέων πιθανόν να σχετίζεται με την αλληλεπίδραση NMDAR και διαύλων ασβεστίου σε περιοχές του μεταχιακού συστήματος (196, 197). Δεδομένου ότι οι υποδοχείς αυτοί είναι ιδιαίτερα διαπερατοί από ιόντα ασβεστίου, οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ροή ασβεστίου μέσω των NMDA υποδοχέων είναι κρίσιμης σημασίας για τη νευρική ενεργότητα και τα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια. Η ενδοκυττάρια αύξηση ασβεστίου ελέγχεται και από τους διαύλους ασβεστίου που ρυθμίζονται από την τάση (Voltage Gated Calcium Channels- VGCC). Πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που επιτρέπουν τη διόδο κατιόντων ασβεστίου στο εσωτερικό του κυττάρου με στόχο την πρόσδεση σε μόρια στόχους για την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών συναπτογένεσης (198, 199). Μελέτες ολόκληρου του γενόματος υποστηρίζουν την εμπλοκή των διαύλων ιόντων τύπου L στις πιο σημαντικές ψυχιατρικές ασθένειες, όπως η διπολική διαταραχή και η κατάθλιψη (200). Οι δίαυλοι ιόντων τύπου L διακρίνονται σε τέσσερις ισομορφές ( $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$ ,  $Ca_v1.4$ ) εκ των οποίων η μία ( $Ca_v1.2$ )



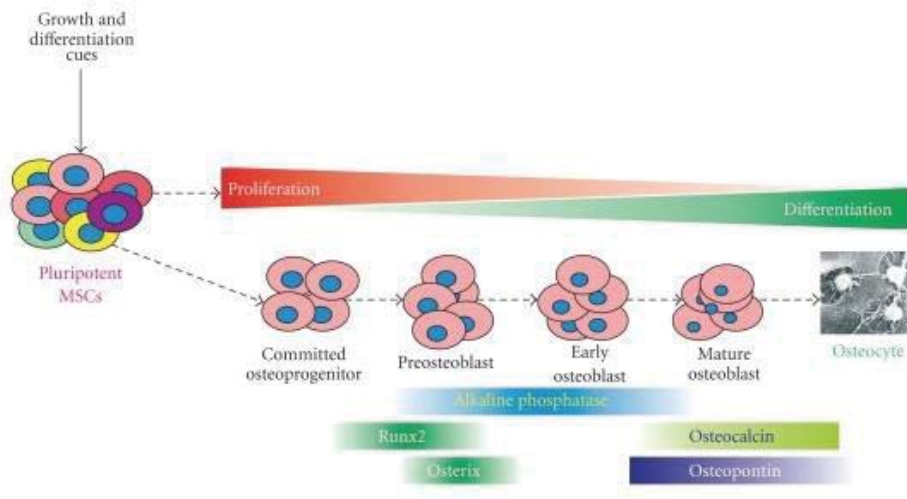
κωδικοποιείται από το γονίδιο *CACNA1C* το οποίο εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και η ρύθμισή του εξαρτάται από το φύλο (201, 202). Η ισομορφή  $Ca_v1.2$  διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπτώσεων της συναπτογένεσης στην επιβίωση των κυττάρων, την πλαστικότητα και τη γονιδιακή έκφραση (203), με αυξημένα επίπεδα mRNA του *CACNA1C* να εντοπίζονται στον εγκέφαλο ασθενών με διπολική διαταραχή μετά θάνατον (204). Η  $Ca_v1.2$  έχει συσχετιστεί επίσης με την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης MAP (205) και τα ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου που ρυθμίζονται από αυτή την ισομορφή επηρεάζουν μια σειρά γεγονότων που ρυθμίζουν την έκφραση ορισμένων γονιδίων στόχων του ασβεστίου, όπως τα *BCL-2*, *BDNF*, and *c-fos* (206). Τέλος, υπάρχουν μελέτες που επικεντρώνονται στο ρόλο του  $Ca_v1.2$  στις διεργασίες μνήμης και μάθησης (207, 208) και αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει κίνητρο για τη διερεύνηση του γενετικού και επιγενετικού προτύπου του  $Ca_v1.2$  σε συνάρτηση με τα μόρια ρύθμισης του HPA άξονα, μετά την επίδραση χρόνιου στρες κατά την πρώιμη μεταγεννητική ηλικία.

## **1.17 Μηχανικό στρες, οστεογένεση και σύμπλοκο *GNAS***

### **1.17.1 Επίδραση μηχανικού στρες στη διαδικασία οστεογένεσης μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων**

Εκτός από το ήπιο αλλά χρόνιο στρες αναφορικά με τη συμπεριφορά και την ανάπτυξη νευροψυχιατρικών παθήσεων, στρες μπορεί να αποτελέσει και ένα μηχανικό περιβαλλοντικό ερέθισμα, το οποίο μπορεί να είναι ήπιο ή οξύ, χρόνιο ή στιγμιαίο. Το μηχανικό στρες διαδραματίζει ουσιώδη ρόλο κατά τον σχηματισμό των σκελετικών κυττάρων και αποκαλύπτονται όλο και περισσότερα στοιχεία για την εμπλοκή επιγενετικών αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Τα οστά εκτίθενται συνεχώς σε μηχανική πίεση, η οποία μπορεί να αναδιαμορφώσει τον κυτταρικό φαινότυπο, την αρχιτεκτονική και την έκφραση βασικών γονιδίων στην προσπάθεια προσαρμογής του συστήματος. Η οστεογένεση ενεργοποιείται κατά τον μετασχηματισμό των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) σε οστεοβλάστες (Εικόνα 1.17.1). Στη πορεία της οστεοποίησης, οι οστεοβλάστες

μεταπίπτουν σε οστεοκύτταρα με τη σύνθεση ασβεστίου και τον σχηματισμό της εξωκυττάριας μήτρας και κάθε είδους εξωγενές σήμα μπορεί να επηρεάσει τον προγραμματισμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης των κυττάρων (209, 210). Ποικιλία παραμέτρων μπορεί να επηρεάσει την κυτταρική απόκριση, όπως η ένταση της πίεσης, η διάρκεια και η συχνότητα των μεταβολών όπως αυτές φαίνονται στα *in vitro* μοντέλα διερεύνησης του μηχανικού στρες. Αξίζει να σημειωθεί βέβαια, ότι παρατηρούνται αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ μελετών σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα, πιθανόν διότι στην κυτταροκαλλιέργεια απουσιάζει ο σχηματισμός της εξωκυττάριας μήτρας (211).



**Εικόνα 1.17.1: Στάδια διαφοροποίησης μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (MSCs) σε οστεοκύτταρα.** Τα MSCs χαρακτηρίζονται από πολυδυναμία και μπορούν να προγραμματιστούν προς οστεογένεση μέσω διαδοχικών σταδίων ωρίμανσης κατά τη διάρκεια των οποίων ελέγχεται η έκφραση ειδικών δεικτών (212).

### 1.17.2 Επιγενετική ρύθμιση της οστεογένεσης ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα

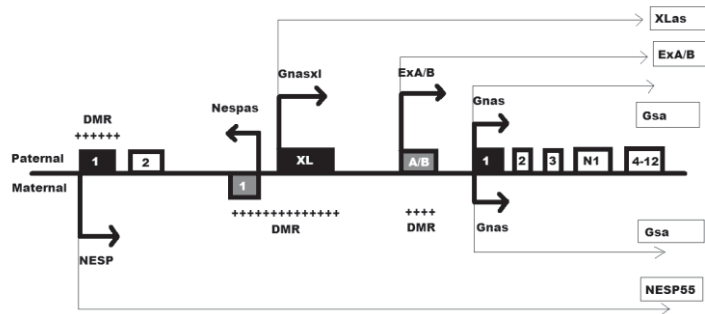
Τις τελευταίες δεκαετίες η μεθυλίωση του DNA εξετάζεται ως πιθανός σημαντικός μηχανισμός ρύθμισης της διαφοροποίησης των MSCs προς οστεοκύτταρα, δίνοντας έτσι μια άλλη προοπτική στην εξέλιξη της θεραπείας ασθενειών που σχετίζονται με το σκελετικό σύστημα (213). Όπως ήδη έχει περιγραφεί, η μεθυλίωση του DNA αποτελεί ένα μηχανισμό επιγενετικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης με σταθερό και κληρονομικό τρόπο, τα αποτελέσματα του οποίου είναι δυναμικά και μπορεί να αναστραφούν. Ο

*Arnsdorf* με την ομάδα του πρότεινε ένα μηχανισμό επιγενετικής ρύθμισης της οστεογένεσης (214), ενώ μια ακόμα πιο πρόσφατη μελέτη περιγράφει την ευαισθησία των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων σε μηχανικά ερεθίσματα *in vitro*, μέσω επιγενετικής ρύθμισης της διαφοροποίησης προς οστεοκύτταρα (215).

### **1.17.3 Επιγενετική ρύθμιση του συμπλόκου GNAS: πιθανός μηχανισμός ενεργοποίησης της οστεογένεσης στην παθολογία της έκτοπης οστεοποίησης**

Το γονίδιο *GNAS* εδράζεται στο χρωμόσωμα 20 (20q13.11) και διακρίνεται σε διαφορετικές ισομορφές που αντιστοιχούν σε εναλλακτικά μετάγραφα τα οποία προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα με ξεχωριστούς υποκινητές. Πρόκειται για ένα γονίδιο με αποτύπωμα, εκφράζοντας είτε το πατρικό και είτε το μητρικό αλληλόμορφο και οι βασικές ισομορφές του είναι οι: *Gs-a*, *XLAS*, *NESP55* και *A/B* (Εικόνα 1.17.1) (216, 217). Η έκτοπη οστεοποίηση ανήκει στο φάσμα διαταραχών της αποσιώπησης του γονιδίου *GNAS* και διακρίνεται σε δύο τύπους ανάλογα με την έκταση της οστεοποίησης η οποία μπορεί να αφορά Α) επιφανειακές οστικές αλλοιώσεις ή Β) επιφανειακές βλάβες με κατ' επέκταση διείσδυση σε γειτονικούς ιστούς. Η επέκταση στους παρακείμενους ιστούς υποδηλώνει ότι στην παθογένεια εμπλέκεται διαταραχή της προγραμματισμένης διαφοροποίησης των MSCs που προέρχονται από υποδόριο λίπος, υποδηλώνοντας έτσι μια αμοιβαία σχέση της λιπογένεσης και της οστεογένεσης σε περιφερικούς ιστούς (218, 219). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η διαφοροποίηση των οστεοβλαστών προωθεί την αφθονία των μεταγράφων *NESP* και *XL*, επιβεβαιώνοντας τον προφανή ρόλο του γονιδίου *GNAS* κατά τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων που προέρχονται από υποδόριο λίπος (human adipose tissue mesenchymal stem cells, hAT-MSCs) (220). Το *GNAS* έχει συσχετιστεί επίσης με τη δυναμική ρύθμιση των επιπέδων cAMP και το σηματοδοτικό μονοπάτι οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης (bone morphogenetic protein, BMP), και κατ' επέκταση με την ενίσχυση του ρυθμού και την πρόοδο της διαφοροποίησης (221). Η πρόσφατη βιβλιογραφία εστιάζεται στις επιγενετικές αλλαγές, παρά στις μεταλλάξεις του *GNAS* όπως είχε επικρατήσει στο παρελθόν. Γνωρίζοντας τις μεθοδολογίες που ακολουθούνται μέχρι σήμερα, είναι αξιοσημείωτο ότι η πλειοψηφία των ερευνών που επικεντρώθηκαν στις μεταλλάξεις απενεργοποίησης του *GNAS*, έγιναν πάνω στην *Gs-a* υπομονάδα του γονιδίου, η οποία κωδικοποιεί μια G πρωτεΐνη και σηματοδοτεί την παραγωγή cAMP μετά από ορμονική διέγερση. Επιπλέον, τα πειματικά μοντέλα που αναφέρονται είναι συνήθως πειραματόζωα τρωκτικά με

αποσιώπηση της πρωτεΐνης (220) ή ασθενείς με κληρονομική οστεοδυστροφία “Albright” (222) είτε με προοδευτική οστική δυσπλασία (218). Ο συνδυασμός των παραπάνω στοιχείων της βιβλιογραφίας εγείρει νέα ερωτήματα όσον αφορά την αλληλεπίδραση επιγενετικών τροποποιήσεων στο γενετικό τόπο του *GNAS* με τον επαναπρογραμματισμό της διαφοροποίησης των hAT-MSCs προς οστεοκύτταρα κάτω από την επίδραση ενός σταθερά έντονου περιβαλλοντικού ερεθίσματος.



**Εικόνα 1.17.1:** Το σύμπλοκο *GNAS* με τις εναλλακτικές ισομορφές που εκφράζονται ανάλογα με το πρότυπο αποτύπωσης.

## 2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης εξωγενών περιβαλλοντικών και φαρμακολογικών παραγόντων σε διαφορετικά πειραματικά πρότυπα επαγωγής στρες σε ζώα-μοντέλα, στο γενετικό και επιγενετικό προφίλ σημαντικών μορίων ρύθμισης της ομοιόστασης. Αρχικά, η μελέτη μας επικεντρώθηκε στις μεταβολές στα πρότυπα έκφρασης και μεθυλίωσης μορίων που συνδέονται με τη λειτουργία του άξονα HPA σε ένα πειραματικό μοντέλο μητρικής αποστέρησης, ενώ παράλληλα διερευνήθηκε η φαρμακολογική επίδραση γλυκοκορτικοειδών σε κυτταρικό επίπεδο. Επιπλέον, εξετάστηκε η συσχέτιση του συστήματος ενδοκανναβινοειδών, των μιτοχονδρίων και του ασβεστίου με τη λειτουργία του άξονα HPA και την ανάπτυξη νευρολογικών διαταραχών. Διερευνήθηκε επίσης ο πιθανός μηχανισμός ενεργοποίησης της οστεογένεσης κατά την επίδραση μηχανικού στρες μέσω της επιγενετικής ρύθμισης ενός περίπλοκου γονιδίου με αποτύπωμα, το οποίο έχει συσχετιστεί με την παθογένεια της έκτοπης οστεοποίησης. Απώτερος στόχος όλης της εργασίας είναι η κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης των παραπάνω διαταραχών και η συμβολή σε μια προσπάθεια βελτίωσης της θεραπείας ασθενειών που έχουν ως κοινή αιτία διαφορετικές μορφές στρες.



### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### 3.1 Πειραματόζωα

Για τα πειραματικά πρωτόκολλα που περιγράφονται παρακάτω χρησιμοποιήθηκαν μύες CD1 από το εκτροφείο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Εικόνα 3.1.1). Οι μύες διαβιούσαν ανά τέσσερις σε πλαστικούς κλωβούς (Plexiglas) διαστάσεων 43x27x15 εκ. (1290D001), σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας εσωτερικού χώρου ( $21\text{oC} \pm 1\text{oC}$ ) και σταθερό εναλλασσόμενο φωτισμό (07:00-19:00 φως και 19:00-07:00 σκοτάδι), έχοντας ελεύθερη πρόσβαση σε φαγητό και νερό. Σε ηλικία περίπου 2-3 μηνών τα ζώα ξεκινούσαν τη διαδικασία αναπαραγωγής σε ζεύγη δύο θηλυκών με ένα αρσενικό ανά κλωβό. Περίπου μια βδομάδα αργότερα τα θηλυκά ελέγχονταν οπτικά και εάν τα επινεφρίδια ήταν αρκετά διογκωμένα, τότε επιβεβαιώνονταν εγκυμοσύνη και τα αρσενικά ζώα απομακρύνονταν από τους κλωβούς. Μετά από 21 ημέρες περίπου από την έναρξη της αναπαραγωγής, τα θηλυκά ζώα ελέγχονταν δύο φορές ημερησίως (10:00 και 18:00) για την καταγραφή των γεννήσεων. Η ημερομηνία γέννησης του κάθε πειραματόζωου καταγράφεται ως postnatal day (PND) 0.

Ο χειρισμός των πειραματόζωων σε όλα τα πειραματικά στάδια έγινε σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των ΗΠΑ (NIH Publications No. 80-23, 1996) και τις ευρωπαϊκές οδηγίες για τη φροντίδα και τη χρησιμοποίηση των πειραματόζωων (EEC Council 86/609, No. 116, 1992) και κατεβλήθη προσπάθεια για την ελαχιστοποίηση κάθε επώδυνης διαδικασίας για τα ζώα αυτά.

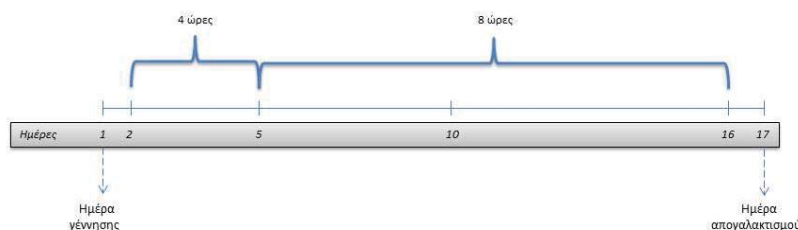


**Εικόνα 3.1.1:** Εργαστηριακός κλωβός διαβίωσης μύων



### 3.2 Μοντέλο μητρικής αποστέρησης

Ακολουθήσαμε ένα μοντέλο μητρικής αποστέρησης σχεδιασμένο σε μύες και δοκιμασμένο ως μοντέλο πρόκλησης στρες σε νεογνική ηλικία (223). Σύμφωνα με αυτό (Εικόνα 3.2.1), οι νεογέννητοι μύες απομακρύνονται καθημερινά από τη μητέρα τους από την 2<sup>η</sup> ημέρα μετά τη γέννησή τους (PND2) ως την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τη γέννησή τους (PND5) για 4 ώρες και στη συνέχεια από την 6<sup>η</sup> ημέρα (PND6) μέχρι την 16<sup>η</sup> ημέρα (PND16) για 8 ώρες ημερησίως. Η μεταφορά γίνεται αυστηρά χωρίς επαφή του ανθρώπινου χεριού με τα νεογνήματα και τοποθετούνται σε ξεχωριστό δωμάτιο από τη μητέρα τους τυλιγμένα με κουβέρτα ώστε να μην διαταραχθεί όσο είναι δυνατόν η θερμοκρασία τους. Την 17<sup>η</sup> ημέρα (PND17) πραγματοποιείται πρόωρος απογαλακτισμός των νεογνών και καταγραφή του βάρους τους, ενώ φροντίζουμε τη διατροφή τους με πολτοποιημένη τροφή έτσι ώστε να γίνει ομαλή η προσαρμογή τους από το θηλασμό στην ξηρή τροφή. Την 25<sup>η</sup> ημέρα (PND25) οι μύες ζυγίζονται ξανά και πλέον διαχωρίζονται τα θηλυκά από τα αρσενικά ζώα σε ξεχωριστούς κλωβούς. Αντίστοιχα, η ομάδες των «μαρτύρων» δεν αποχωρίζονται καθόλου από τη μητέρα τους, παρα μόνο για να ζυγιστούν την PND17 και την PND25 ομοίως με τα ζώα του πειράματος για να γίνει η σύγκριση μεταξύ τους. Ο απογαλακτισμός των «μαρτύρων» γίνεται μαζί με το διαχωρισμό του φύλου την PND25 και η διατροφή τους είναι απευθείας η ξηρή τροφή. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μόνο αρσενικοί μύες, δεδομένου ότι οι θηλυκές ορμόνες περιπλέκουν τα αποτελέσματα, και όλα τα πειράματα διεξήχθησαν μεταξύ PND49 και PND70.



**Εικόνα 3.2.1:** Μοντέλο μητρικού αποχωρισμού και πρόωρου απογαλακτισμού (MSEW)

### 3.3 Μελέτες συμπεριφοράς

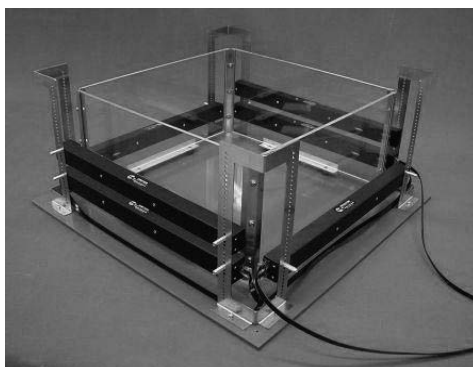
Η μελέτη της κινητικής δραστηριότητας, μας προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για διαταραχές ή παθήσεις με εμφανή συμπτώματα σχετιζόμενα με τη συμπεριφορά. Η καταγραφή της κίνησης πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση αυτοματοποιημένων προγραμμάτων ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Τα πειράματα συμπεριφοράς πραγματοποιούνται έτσι ώστε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της μητρικής αποστέρησης κατά την αναπτυξιακή φάση σε ενήλικες μύες. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η κινητικότητα των δύο ομάδων στο κέντρο του ανοιχτού πεδίου (OFT), δείκτης που έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί, για την προσέγγιση της κατάστασης άγχους στα πειραματόζωα. Συμπληρωματικά, εκτιμήθηκε η συμπεριφορά των δύο ομάδων κατά τη δοκιμασία υπερυψωμένου σταυροειδούς λαβυρίνθου (EPM), που αποτελεί επίσης έναν ευρέως διαδεδομένο δείκτη εκτίμησης μιας στρεσογόνου κατάστασης στα πειραματόζωα. Πρέπει να σημειωθεί ότι όλα τα πειράματα συμπεριφοράς πραγματοποιήθηκαν μεταξύ 09:00 και 14:00, ενώ τα ζώα μεταφέρονταν στο χώρο του πειράματος τουλάχιστον 24 ώρες νωρίτερα ώστε να εγκλιματιστούν. Για τις συμπεριφορικές δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 53 αρσενικοί μύες ηλικίας 6-8 εβδομάδων, 23 μάρτυρες και 30 μύες που υπέστησαν μητρική αποστέρηση.

#### 3.3.1 Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (open field test- OFT)

Κατά τη δοκιμασία του ανοιχτού πεδίου, το πειραματόζωο αφήνεται να εξερευνήσει ένα καινούργιο χώρο για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η καταγραφή της συμπεριφοράς του ζώου παρέχει πληροφορίες για την κινητικότητα, για την ικανότητα εξερεύνησης, καθώς και για τη συναισθηματική κατάστασή του, αξιολογώντας συμπεριφορές που σχετίζονται με το στρες (anxiety/stress related behaviors).

Ο χώρος της δοκιμασίας (ανοιχτό πεδίο) αποτελείται από ένα διαφανή κλωβό από Plexiglas, διαστάσεων 40 x 40 cm, ανοιχτό στο πάνω μέρος (Εικόνα 3.3.1). Το σύστημα καταγραφής αποτελείται από ηλεκτρονικό υπολογιστή συνδεδεμένο με 2 κλωβούς με φωτοκύτταρα (ENV515, Activity Monitor, version 5, Med Associates). Τα ζώα τοποθετούνται σε ζευγάρια ένα στο κέντρο κάθε κλωβού και η συμπεριφορά τους καταγράφεται από το αυτοματοποιημένο σύστημα το οποίο είναι εξοπλισμένο με οριζόντιες και κάθετες σειρές φωτοκυττάρων στις επιφάνειες των κλωβών. Η κίνηση του ζώου προκαλεί διακοπές στις δεσμίδες φωτός, οι οποίες καταγράφονται αυτόματα.



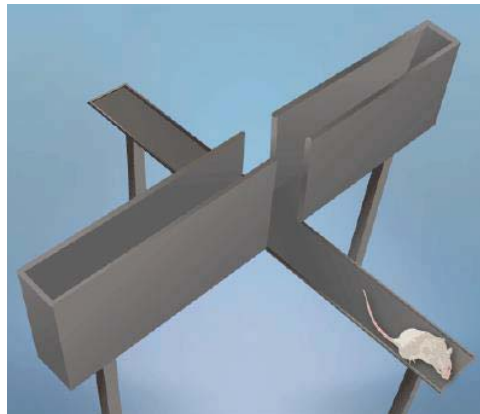
**Εικόνα 3.3.1: Δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (OFT)**

Το δάπεδο καθαρίζονταν επιμελώς με διάλυμα αιθανόλης και στη συνέχεια με νερό, πριν και μετά την εισαγωγή του κάθε πειραματόζωου στον κλωβό, για την επάλειψη των οσμών και των ακαθαρσιών από τα προηγούμενα ζώα. Η καταγραφή της κινητικότητάς τους γινόταν επί 30 λεπτά και στο διάστημα αυτό ο παρατηρητής απομακρύνονταν από το οπτικό πεδίο των πειραματόζωων ώστε να μην αποσπάται η προσοχή τους. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν οι εξής παράμετροι, ως δείκτες οριζόντιας κίνησης: απόσταση λόγω οριζόντιας κινητικότητας (ambulatory distance), διάρκεια οριζόντιας κινητικότητας (ambulatory time), συχνότητα εμφάνισης οριζόντιας κινητικότητας (ambulatory counts). Επιπλέον, ως δείκτες κατακόρυφης/κάθετης κίνησης, καταγράφηκαν η διάρκεια της κατακόρυφης κινητικότητας/ανόρθωσης (vertical time) και η συχνότητα της κατακόρυφης κινητικότητας/ανόρθωσης (vertical counts). Τέλος, καταγράφηκε η διάρκεια παραμονής στο κεντρικό τετράγωνο (zone time), και η συχνότητα διέλευσης από το κεντρικό τετράγωνο (zone counts), ως σημαντικός δείκτης αγχολυτικής συμπεριφοράς, καθώς επίσης η διάρκεια απραξίας (resting time), ως δείκτης αγχογόνου συμπεριφοράς αντίστοιχα.

Όλες οι παραπάνω παράμετροι καταμετρήθηκαν ξεχωριστά για το κεντρικό τετράγωνο του κλωβού (zone 1) και για την υπόλοιπη περιοχή περιμετρικά (residual area), καθώς και συνολικά (total). Επίσης, το χρονικό διάστημα των 30 λεπτών χωρίστηκε υπολογιστικά σε 6 μέρη, οπότε γίνονταν δυνατή η καταγραφή της κινητικότητας ανά πεντάλεπτο, ώστε να αξιολογηθούν οι πιθανές διαφορές στη συμπεριφορά των ζώων όσο συνήθιζαν τον καινούργιο χώρο όπου τοποθετούνταν.

### 3.3.2 Δοκιμασία υπερυψωμένου σταυροειδούς λαβυρίνθου (elevated plus maze- EPM)

Ο ανυψωμένος λαβύρινθος είναι ακόμα μια ευρέως χρησιμοποιούμενη συμπεριφορική δοκιμασία για τρωκτικά που διεξάγεται προκειμένου να προσδιοριστεί η απόκριση των πειραματόζωων σε χρόνια στρεσογόνα ερεθίσματα. Η διάταξη αυτή αποτελείται από τέσσερις βραχίονες (δύο ανοιχτούς χωρίς τοιχώματα και δυο κλειστούς με τοιχώματα ύψους 28 cm) μήκους 30 cm και πλάτους 6 cm. Κάθε βραχίονας της κατασκευής είναι συνδεδεμένος με μεταλλικό πόδι ούτως ώστε να ανυψώνεται τουλάχιστον 40 cm από το έδαφος (Εικόνα 3.3.2). Ο ανυψωμένος λαβύρινθος είναι τοποθετημένος σε χώρο με ημίφως.

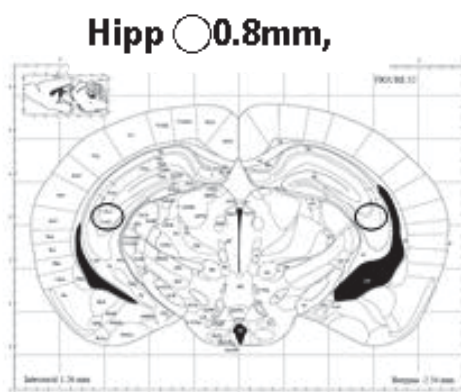


**Εικόνα 3.3.2: Δοκιμασία υπερυψωμένου σταυροειδούς λαβυρίνθου (EPM)**

Η συμπεριφορική δοκιμασία έλαβε χώρα ως εξής : τα πειραματόζωα τοποθετούνταν στο σημείο συνένωσης των τεσσάρων βραχιόνων, με κατεύθυνση προς έναν από τους ανοιχτούς, και η καταγραφή της συμπεριφοράς του πραγματοποιούνταν με βιντεοκάμερα για χρονικό διάστημα πέντε λεπτών. Κατά τη διάρκεια παραμονής του πειραματόζωου στον ανυψωμένο λαβύρινθο καθώς και κατά τη διάρκεια αναπαραγωγής της βιντεοσκοπημένης διαδικασίας, προσμετρήθηκε ο συνολικός αριθμός διελεύσεων του πειραματόζωου από τους ανοιχτούς και τους κλειστούς βραχίονες καθώς και ο χρόνος παραμονής του σε αυτούς. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ως χρόνος 0 στη διέλευση του ζώου σε κάποιον από τους βραχίονες, ορίζουμε τη στιγμή που θα περάσει και τα τέσσερα άκρα του σε αυτόν. Ακολούθησε συγκριτική στατιστική ανάλυση των ομάδων προκειμένου να διαπιστωθούν ενδεχόμενες διαφοροποιήσεις στη συμπεριφορά τους.

### 3.4 Θυσία των πειραματόζων- απομόνωση εγκεφαλικών δομών

Μετά την ολοκλήρωση του πειράματος και των συμπεριφορικών δοκιμασιών, κι ενώ οι μύες βρίσκονταν πλέον σε ενήλικη φάση ζωής, ακολούθησε θυσία των πειραματόζων με τη μέθοδο της αυχενικής μετατόπισης και κατόπιν αποκεφαλισμού. Απομονώθηκε ο εγκέφαλος από όλα τα ζώα και έγινε συλλογή των ακόλουθων εγκεφαλικών ιστών σε ξεχωριστά φιαλίδια: ιππόκαμπος, αμυγδαλή, υποθάλαμος, έσω προμετωπιαίος φλοιός. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με αποστειρωμένα χειρουργικά εργαλεία και οι ιστοί ψύχθηκαν ταχέως σε υγρό άζωτο μέχρι τη μεταφορά τους στους  $-80^{\circ}\text{C}$  όπου φυλάχθηκαν μέχρι την αξιοποίησή τους για τις μοριακές αναλύσεις και τους νευροβιολογικούς προσδιορισμούς. Για τη μεθοδολογία λήψης εγκεφαλικών μικροδομών εσωτερικά, κάποιοι παγωμένοι εγκέφαλοι χρησιμοποιήθηκαν για κρυτομές. Απομονώθηκαν συμμετρικά μέρη από τις εξής περιοχές: ραβδωτό σώμα (dlSTR), ωχρά σφαίρα (GP), μέλαινα ουσία (SNpc) με μία τεχνική λήψης ιστού “punching” ακολουθώντας τις στερεοτυπικές συντεταγμένες του εγκεφάλου που περιγράφονται στον οδηγό “The Mouse Brain in stereotaxic coordinates, G.Paxinos and K. B.J. Franklin”. Τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται είναι μικρής διαμέτρου, οπότε η ποσότητα του ιστού που λαμβάνεται είναι απειροελάχιστη (Εικόνα 3.4.1). Για το λόγο αυτό, συγκεντρώνονται τα αντίστοιχα τμήματα σε ζεύγη από εγκεφάλους πειραματόζων με παρόμοιες μετρήσεις συμπεριφοράς ώστε να απομονωθεί αξιόλογη ποσότητα πρωτεϊνών για περαιτέρω ανάλυση. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  έως ότου πραγματοποιηθούν τα μοριακά πειράματα.



Εικόνα 3.4.1: Η περιοχή του ιππόκαμπου σε εγκάρσια τομή εγκεφάλου μύος.

### 3.5 Κυτταροκαλλιέργεια

#### 3.5.1 Καλλιέργεια κυττάρων ([www.abcam.com](http://www.abcam.com))

Όλες οι διαδικασίες που σχετίζονται με την καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιούνται στο δωμάτιο κυτταροκαλλιεργειών σε θάλαμο νηματικής ροής, υπο ασηπτικές συνθήκες.

Τα νευροβλαστωματικά κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιλαμβάνει:

- DMEM
- 10% FBS
- 1% αντιβιοτικό (Antibiotic – Antimycotic)

Τα νευρικά βλαστικά κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιλαμβάνει:

- DMEM – Glutamax
- 2% B27
- 10% FBS
- 1% αντιβιοτικό (Antibiotic – Antimycotic)
- 20ng/ml bFGF και EGF

Απαραίτητη προϋπόθεση πριν τη χρήση του ορού (FBS) είναι η θέρμανσή του στους 56°C για 30min με σκοπό την αδρανοποίηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος του ορού. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες ενεργοποιούν την ανοσολογική απόκριση και η αδρανοποίησή τους θεωρείται απαραίτητη για την αποφυγή τυχόν λανθασμένων ανοσολογικών αποκρίσεων από το κύτταρο (Q&A, 2012). Ακόμη, η θέρμανση του ορού έχει συνδεθεί με την αδρανοποίηση μικροοργανισμών όπως το μυκόπλασμα (BIOCHROM AG, 2005).

Η καλλιέργεια γίνεται σε ειδικούς επωαστήρες στις ακόλουθες συνθήκες:

- Θερμοκρασία: 37°C
- Περιεκτικότητα σε CO<sub>2</sub>: 5%

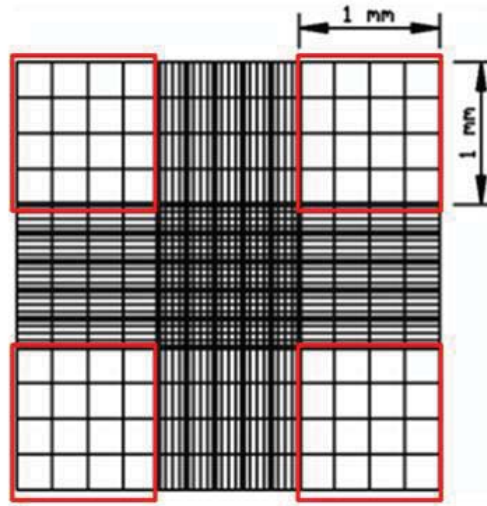
### **3.5.2 Ανακαλλιέργεια των νευροβλαστωματικών κυττάρων με τη χρήση θρυψίνης (www.abcam.com)**

Για να διατηρηθεί η κυτταροκαλλιέργεια των νευροβλαστωματικών κυττάρων (Neuro2A και SH-SY5Y), όταν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και καταλαμβάνουν το 80% - 90% της επιφάνειας του τρυβλίου, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια (ή passage) σε καινούριο τρυβλίο με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης, που είναι μια πρωτεάση η οποία προκαλεί διάσπαση των αμινοξικών δεσμών μεταξύ των κυττάρων και την αποκόλληση τους από την επιφάνεια του πιάτου. Πραγματοποιούνται συνήθως μέχρι 25 ανακαλλιέργειες περίπου καθώς από το σημείο αυτό κι έπειτα αρχίζει να φθίνει ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και να αυξάνεται ο κυτταρικός θάνατος. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας έχει ως εξής:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από το πιάτο κυτταροκαλλιέργειας.
2. Απομάκρυνση του εναπομείναντος θρεπτικού υλικού μέσω μιας πλύσης με διάλυμα PBS.
3. Αφαίρεση του PBS και προσθήκη 800μl θρυψίνης (για πιάτο διαμέτρου 100mm), επώαση στους 37°C για 3 min και αποκόλληση των κυττάρων από το υπόστρωμα του πιάτου με ελαφρά χτυπήματα.
4. Προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού και ανάδευση των κυττάρων, με πιπέτα μιας χρήσεως, ώστε να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα μεταξύ τους.
5. Μέτρηση κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.
6. Μεταφορά του επιθυμητού αριθμού κυττάρων σε νέο πιάτο με θρεπτικό υλικό.
7. Επώαση των κυττάρων στους 37°C, όπου προσκολλώνται ξανά στο υπόστρωμα του πιάτου.

### **3.5.3 Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer**

Ο αριθμός των κυττάρων που απαιτείται σε κάθε περίπτωση υπολογίζεται με την πλάκα Neubauer. Προστίθενται 10μl κυτταρικού εναιωρήματος στην πλάκα και μετράται ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκεται εντός των τεσσάρων μεγάλων τετραγώνων της πλάκας. Τα τετράγωνα αυτά βρίσκονται στις τέσσερις γωνίες της πλάκας και αποτελούνται από 16 μικρότερα τετράγωνα (Εικόνα 3.5.1). Ο συνολικός αριθμός των κυττάρων προκύπτει από το άθροισμα του αριθμού των κυττάρων που περιλαμβάνονται σε καθένα από τα τέσσερα μεγάλα τετράγωνα και διαιρείται δια του 4. Ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιάζεται x 10<sup>4</sup> και αποτελεί τον αριθμό των κυττάρων της καλλιέργειας ανά ml.



**Εικόνα 3.5.1:** Χώρος μέτρησης κυττάρων στην πλάκα Neubauer ([www.celeromics.com](http://www.celeromics.com)).

### 3.5.4 Αποθήκευση κυτταρικών σειρών

Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε ειδικά κρυοφιαλίδια για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε βαθιά κατάψυξη ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) με την παρακάτω διαδικασία:

8. Θρυψινοποίηση του πιάτου.
9. Φυγοκέντρηση του κυτταρικού εναιωρήματος σε θερμοκρασία δωματίου, για 5 min, στα 900rpm.
10. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 900μl θρεπτικού μέσου (900μl κυτταρικού εναιωρήματος αντιστοιχούν σε ένα κρυοφιαλίδιο)
11. Προσθήκη 900μl διαλύματος κατάψυξης (freezing mix) το οποίο περιλαμβάνει: 50% FBS, 20% DMSO και 30% θρεπτικού υλικού (χωρίς FBS).
12. Μεταφορά 1,8 ml αυτού του διαλύματος μαζί με τα κύτταρα σε ένα κρυοφιαλίδιο κατάψυξης.
13. Τοποθέτηση σε ειδικό δοχείο με ισοπροπανόλη (για αργό και σταδιακό πάγωμα) στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Το διάλυμα αποθήκευσης είναι τοξικό για τα κύτταρα, γι αυτό τα κρυοφιαλίδια πρέπει να ψύχονται κατευθείαν μετά την προσθήκη του στο κυτταρικό εναιώρημα.
14. Μετά από 12-24 ώρες, το κρυοφιαλίδιο φυλάσσεται στο υγρό άζωτο ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.5.5 Απόψυξη των κυττάρων

Η απόψυξη των κυττάρων περιλαμβάνει:

1. Άμεση μεταφορά του κρυοφιαλιδίου από το υγρό άζωτο στους  $37^{\circ}\text{C}$ , αφού πρώτα καθαριστεί με 70% αιθανόλη.



2. Μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε ένα σωλήνα φυγοκέντρωσης τύπου falcon που περιέχει 8,2ml πλήρους θρεπτικού μέσου και φυγοκέντρωση στα 900rpm για 5min.
3. Απομάκρυνση του υπερκειμένου, επαναιώρηση των κυττάρων σε νέο θρεπτικό μέσο και ανάδευση με πιπέτα μιας χρήσεως.
4. Μεταφορά των κυττάρων σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας και τοποθέτηση στους 37 °C μέχρι την επόμενη ανακαλλιέργεια.

### **3.5.6 Προέλευση, απομόνωση και καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων από ανθρώπινο υποδόριο λίπος (hAT-MSCs)**

Υποδόριο λίπος απομονώνεται από δότες σε ορθοπεδικά χειρουργεία με την έγκριση του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και επεξεργάζεται σε διάστημα 24 ωρών. Η καλλιέργεια hAT-MSCs επιτυγχάνεται με ενζυμική λύση. Συγκεκριμένα, ο ιστός απομονώνεται μηχανικά και υφίσταται πολλαπλή έκπλυση με διάλυμα PBS. Η περαιτέρω απομόνωση των μεσεγχυματικών κυττάρων πραγματοποιείται με τη χρήση 235U/ml κολλαγενάσης I (Worthington, New Jersey, USA) σε DPBS και 1% BSA (Sigma, Hertfordshire, UK) σε συνθήκες επώασης στους 37°C για 4 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα που προκύπτουν από την πέψη καταμετρώνται και επιστρώνονται  $1 \times 10^6$  σε τρυβλία 100mm σε καλλιεργητικό υλικό πολλαπλασιασμού ADSC (Lonza, Cambridge, UK). Η ικανότητα παραγωγής κλώνων των κυττάρων ελέγχεται με χρώση 1% w/v Crystal Violet (Sigma) την 14<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας. Διακριτές αποκίες καταμετρώνται με τη βοήθεια μικροσκοπίας σε μεγέθυνση (x40) και οι τιμές της δοκιμασίας σχηματισμού αποικιών (colony-forming unit-fibroblasts, CFU-F) αξιολογούνται σε συνάρτηση με την αρχική πυκνότητα επίστρωσης των

κυττάρων ( $1 \times 10^6$ ). Μόλις η πληρότητα του ταπητίου αγγίζει το 80% (στάδιο διέλευσης 0), τα κύτταρα θρυψινοποιούνται με διάλυμα trypsin/EDTA για 3-5 λεπτά, οπότε απενεργοποιείται με την προσθήκη θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένου με ορό (DMEM+10%FBS). Ακολουθούν ακόμα δύο στάδια διελεύσεων με θρυψινοποίηση 1:1 στα οποία ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων προσμετράται με 0.4% (w/v) Trypan Blue (Invitrogen).

Ο χαρακτηρισμός των MSCs πραγματοποιείται στο στάδιο διέλευσης 3, όπου ελέγχεται η έκφραση των ειδικών αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών δεικτών (Πίνακας

3.1). Πραγματοποιείται κυτταρομετρία ροής και τα νεκρά κύτταρα αποκλείονται με τη βοήθεια του διαλύματος χρώσης με 2  $\mu\text{g/ml}$  7-Amino-actinomycin D (7-AAD) (Invitrogen).

<b>Πίνακας 3.1:</b> PE-αντισώματα για το χαρακτηρισμό των κυττάρων hAT-MSCs			
<b>Αντίσωμα</b>	<b>Κλώνος</b>	<b>Διάλυμα αραιωμένο</b>	<b>Εταιρία</b>
CD14-PE	MEM-15	5 $\mu\text{l}$ neat	Immunotools, Friesoythe, Germany
CD15-PE	MEM-158	5 $\mu\text{l}$ neat	Immunotools, Friesoythe, Germany
CD29-PE	MEM-101A	5 $\mu\text{l}$ neat	Immunotools, Friesoythe, Germany
CD31-PE	MEM-05	5 $\mu\text{l}$ neat	Immunotools, Friesoythe, Germany
CD34-PE	4H11[APG]	5 $\mu\text{l}$ neat	Immunotools, Friesoythe, Germany
CD44-PE	MEM-85	5 $\mu\text{l}$ neat	Immunotools, Friesoythe, Germany
CD45-PE	MEM-28	5 $\mu\text{l}$ neat	Immunotools, Friesoythe, Germany
CD73-PE	AD2	5 $\mu\text{l}$ neat	Biolegend, San Diego, USA
CD90-PE	F15-42-1	5 $\mu\text{l}$ neat	AbD Serotec, Puchheim, Germany
CD105-PE	MEM-226	5 $\mu\text{l}$ neat	Immunotools, Friesoythe, Germany

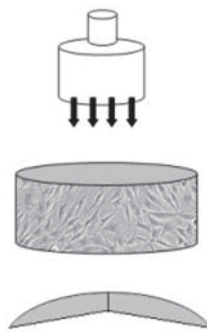
CD115-PE	9-4D2-1E4	5μl neat	Biolegend, San Diego, USA
CD140 $\alpha$ -PE	16A1	5μl neat	Biolegend, San Diego, USA
CD140 $\beta$ -PE	18A2	5μl neat	Biolegend, San Diego, USA
CD144-PE	BV9	5μl neat	Biolegend, San Diego, USA
CD146-PE	P1H12	5μl neat	BD Biosciences, Oxford, UK
CD201-PE	RCR-401	5μl neat	Biolegend, San Diego, USA
CD235 $\alpha$ -PE	AME-1	5μl neat	Immunotools, Friesoythe, Germany
CD324-PE	67A4	5μl neat	Biolegend, San Diego, USA
IgG1-PE	PPV-06	2.5μl neat	Immunotools, Friesoythe, Germany
IgG2-PE	PPV-04	2.5μl neat	Immunotools, Friesoythe, Germany

Τα κύτταρα καλλιεργούνται με θρεπτικό μέσο πολλαπλασιασμού σε συνθήκες συνθήκες καλλιέργειας μέχρι το 3<sup>ο</sup> στάδιο διέλευσης, στο οποίο η καλλιέργεια μεταπίπτει σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης με παράγοντες οστεογένεσης. Στην πορεία της διαφοροποίησης πραγματοποιείται ημι-ποσοτικός έλεγχος οστεοβλαστογένεσης και ασβεστοποίησης με τη βοήθεια του πρωτοκόλλου αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) και τη χρώση με Alizarin Red S (Sigma), αντίστοιχα. Η πορεία προς χονδρογένεση ανιχνεύεται

με τη χρώση Toluidine blue stain (Sigma) και προς λιπογένεση με τη χρήση 0.5% Oil Red (Sigma).

### 3.6 Μηχανικό στρες (cell stretching)

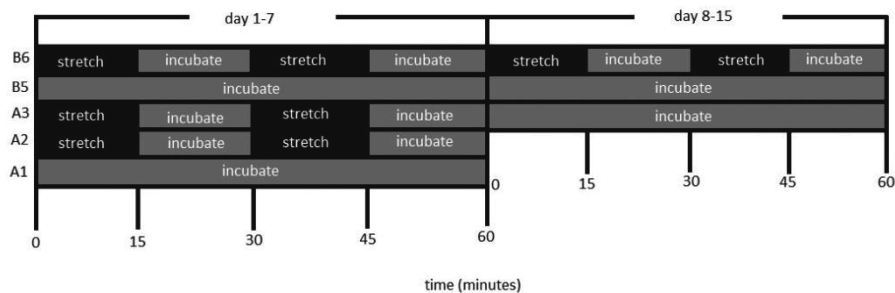
Για την επίδραση του μηχανικού στρες στα καλλιεργούμενα κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά κυκλικά τρυβλία με ελαστική μεμβράνη σιλικόνης σαν υπόστρωμα στο οποίο προσκολλώνται, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (hAT-MSCs). Η επιφάνεια του τρυβλίου είναι 50x12mm (Greiner bio-one dish-Lumox-96077303) και η κάτω επιφάνεια εφαρμόζεται πάνω σε plexiglass με κυρτή επιφάνεια. Στην άνω επιφάνεια του τρυβλίου εφαρμόζεται ένας μεταλλικός κύλινδρος που έχει υπολογιστεί να έχει τέτοιο βάρος ώστε να αντέχει η κάτω ελαστική μεμβράνη στην οποία δημιουργούν ταπτήριο τα κύτταρα. Το βάρος αυτό προκαλεί διάταση στα κύτταρα από το κέντρο του τρυβλίου προς την περιφέρεια (Εικόνα 3.6.1). Τα κύτταρα επιστρώνονται σε αυτού του είδους το τρυβλίο σε ποσοστό πληρότητας περίπου 70% (66000 κύτταρα).



**Εικόνα 3.6.1:** Σύστημα κυτταρικής διάτασης.

Για 24 ώρες καλλιεργούνται προς πολλαπλασιασμό, ενώ αμέσως μετά, το θρεπτικό μέσο αλλάζει σε θρεπτικό διαφοροποίησης εμπλουτισμένο με οστεοποιητικούς παράγοντες. Αυτή η μέρα ονομάζεται ημέρα διαφοροποίησης μηδέν (DAY0) και σηματοδοτεί την έναρξη του πειραματικού σχεδίου για το μηχανικό στρες. Το πρωτόκολλο βασίστηκε σε παρόμοιες μελέτες, όμως σχεδιάστηκε εκ νέου σε ένα χρονο- εξαρτώμενο πρότυπο (Εικόνα 3.6.2). Οι συνθήκες είναι πέντε: 1) κύτταρα υπό διάταση για 7 ημέρες, 2)

κύτταρα σε ηρεμία για 7 ημέρες, 3) κύτταρα υπό διάταση για 15 ημέρες, 4) κύτταρα σε ηρεμία για 15 ημερες και 5) κύτταρα υπό διάταση για 7 ημέρες και σε ηρεμία για ακόμα 7 ημέρες (ενδιάμεση συνθήκη). Τα υπό διάταση κύτταρα υποβάλλονται σε ένα καθημερινό πρόγραμμα 60 λεπτών μηχανικής πίεσης ανά 15 λεπτά (15 λεπτά διάταση, 15 λεπτά ηρεμία στον επωαστήρα, 15 λεπτά διάταση, 15 λεπτά ηρεμία).



**Εικόνα 3.6.2:** Σχεδιάγραμμα στο οποίο απεικονίζεται το πρωτόκολλο μηχανικού στρες που εφαρμόστηκε.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται κάθε δεύτερη ημέρα κατά το ήμισι, ώστε να διατηρείται μια ισορροπία στις ουσίες που παράγουν τα ίδια τα κύτταρα. Η μορφολογία των κυττάρων ελέγχεται συχνά στο μικροσκόπιο και τα κύτταρα φωτογραφίζονται αναδεικνύοντας την ορατή πορεία της ασβεστοποίησης.

### 3.7 In vitro φαρμακολογική επίδραση με δεξαμεθαζόνη

Η δεξαμεθαζόνη χρησιμοποιείται ως συνθετικό γλυκοκορτικοειδές με 25 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία από την κορτιζόλη για τη διερεύνηση της λειτουργίας των γλυκοκορτικοειδών σε κυτταρικό επίπεδο νευρογένεσης. Η ουσία που χρησιμοποιήθηκε αρχικά ήταν της εταιρίας VIANEX με τα εξής χαρακτηριστικά: Cat.No. 41003010/2, 2ml, 4mg/ml, Mr=516,41. Έγιναν δοκιμές με εκθετικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις της παραπάνω ουσίας (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64μM) στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y για 3 και 6 ημέρες χωρίς ουσιαστική φαινοτυπική απόκριση. Στην πορεία έγιναν δοκιμές και στις κυτταρικές σειρές Neuro2a και BE2C με τις μικρότερες συγκεντρώσεις (0, 0.1, 0.5, 1, 10μM) αλλά και μεγαλύτερες (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1mM) σε συνδυασμό με διαβάθμιση συγκέντρωσης ορού (0, 0.5, 1, 10% FBS) για 24 και 48 ώρες. Μετά από τις παραπάνω δοκιμές, επιλέξαμε να δοκιμάσουμε την ίδια ουσία από την εταιρία SIGMA (D4902-25MG, Mr=392,46). Ελέγχθηκε η δράση της ουσίας με δοσοεξαρτώμενο και

χρονοεξαρτώμενο τρόπο (Πίνακας 3.2) στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές με στόχο τη μελέτη σε μακροσκοπικό επίπεδο (πολλαπλασιασμός, κυτταροτοξικότητα), τον εντοπισμό των μορίων ki67, p21, p53 σε απόκριση στα γλυκοκορτικοειδή και τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων του HPA άξονα.

<b>Πίνακας 3.2:</b> δοσοεξαρτώμενο πρόγραμμα χορήγησης δεξαμεθαζόνης στις κυτταρικές σειρές							
Κυτταρική σειρά	Συγκέντρωση ουσίας (μM)				Διάρκεια	Μέθοδος	
	0	10	50	100			
SH-SY5Y	0	10	50	100	3 ημέρες	Western blot	
BE2C	0	10	50	100	3 ημέρες	Western Blot	
N2A	0	10	50	100	3 ημέρες	Western Blot	ICC
HCN	0	1	10	+/- GF	2-4 ημέρες		ICC

### 3.8 In vivo φαρμακολογική επίδραση με δέλτα-9-τετραϋδροκανναβινόλη ( $\Delta_9$ -THC)

Η δέλτα-9-τετραϋδροκανναβινόλη χρησιμοποιήθηκε ως συνθετικό κανναβινοειδές για τη διέγερση του νευρικού συστήματος και τη διερεύνηση του άξονα του στρες σε πειραματόζωα Sprague Dawley. Η χορήγηση γινόταν σε ενέσιμη μορφή ενδοπεριτοναϊκά, δύο φορές την ημέρα, για διάστημα 10 ημερών σε αρσενικούς έφηβους επίμυες (35<sup>η</sup>-45<sup>η</sup> ημέρα ζωής) σε χαμηλές αυξανόμενες συγκεντρώσεις σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3):

<b>Πίνακας 3.3:</b> δοσοεξαρτώμενο πρόγραμμα χορήγησης $\Delta_9$ -THC στους επίμυες						
Δόση	0,3mg/kg	1mg/kg	3mg/kg	0	Συμπεριφορικά Τεστ	Απομόνωση Ιστού
Ημέρες	35-37	38-41	42-45	46-75	75	>75 (ενήλικα)

Το ¼ της ιπποκάμπιας δομής χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση RNA και έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων *Nr3c1*, *Nr3c2*, *Ube3a*, *Gilz*, *Pomc*, *Bdnf*.

### **3.9 Μοριακή ανάλυση δειγμάτων εγκεφαλικού ιστού**

Εγκεφαλικές περιοχές που εμπλέκονται άμεσα με την παθοφυσιολογία του στρες, όπως ο υπόκαμπος, η αμυγδαλή, ο έσω προμετωπιαίος φλοιός και ο υποθάλαμος, απομονώθηκαν και ομογενοποιήθηκαν για ταυτόχρονη απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (RNA/DNA) και πρωτεϊνών. Η τελική επαναδιάλυση έγινε σε όγκο 30μl, 100μl και 200μl για RNA, DNA και πρωτεΐνες αντίστοιχα. Η φωτομέτρηση για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων πραγματοποιήθηκε με NanoDrop (ND) Spectrophotometer 1000 (ThermoScientific).

#### **3.9.1 Απομόνωση γενετικού υλικού και πρωτεϊνών**

Η απομόνωση νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών από εγκεφαλικό ιστό έγινε με τη χρήση του πακέτου προϊόντων Allprep DNA/RNA/Protein (Qiagen #80004). Η διαδικασία έχει ως εξής: ο εγκεφαλικός ιστός μεταφέρεται από τους -80° C απευθείας στο υγρό άζωτο ώστε να μην ξεπαγώσει καθόλου και ο μισός απομονωμένος ιστός (από το ένα ημισφαίριο) μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο 1,5ml το οποίο ζυγίζεται και υπολογίζεται η μάζα του ιστού από τον οποίο απομονώνεται το υλικό. Στον παγωμένο και ζυγισμένο ιστό (20-25mg) προστίθεται 350μl διάλυμα λύσης (RLT + β-μερκαπτοαιθανόλη 100:1) και πραγματοποιείται ομογενοποίηση με τη βοήθεια ειδικού εργαλείου που εφαρμόζει στη βάση του μικροφυγοκεντρικού σωληναρίου και χρησιμεύει σαν «γουδοχέρι» σε μικρότερη κλίμακα. Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά για να απαλαγούμε από τα υπολείμματα της κυτταρικής λύσης. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε στήλη AllPrep DNA spin column που βρίσκεται προσαρμοσμένη σε σωληνάριο συλλογής 2ml και φυγοκεντρείται στις 10.000rpm για 30 δευτερόλεπτα. Το DNA κατακρατείται στη στήλη η οποία μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο συλλογής και φυλάσσεται στους 4° C για μεταγενέστερη απομόνωση του DNA.

### 3.9.1.1 Απομόνωση ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) από εγκεφαλικό ιστό

Το εκχύλισμα που προκύπτει από τη φυγοκέντρηση περιέχει το RNA και τις πρωτεΐνες. Προστίθεται 250μl αιθανόλης (96-100%) και μετά από καλή ανάδευση το διάλυμα μεταφέρεται σε στήλη RNeasy spin column που βρίσκεται προσαρμοσμένη σε σωληνάριο συλλογής 2ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 15 δευτερόλεπτα και το εκχύλισμα μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο το οποίο φυλάσσεται στους 4° C για μεταγενέστερη απομόνωση πρωτεϊνών. Στη στήλη προστίθεται 700μl διαλύματος καθαρισμού RW1 και φυγοκεντρείται στις 10.000 rpm για 15 δευτερόλεπτα. Το εκχύλισμα απορρίπτεται και ακολουθεί διπλή πλύση της μεμβράνης με 500μl διαλύματος καθαρισμού RPE (1<sup>η</sup> πλύση: 10.000 rpm/15sec, 2<sup>η</sup> πλύση: 10.000 rpm/2min). Ακολουθεί μία τελευταία φυγοκέντρηση σε υψηλότερη ταχύτητα για 1 λεπτό χωρίς διάλυμα για να απαλλαγούμε από τυχόν υπολείμματα. Τέλος, μεταφέρουμε προσεκτικά τη στήλη στο τελικό σωληνάριο 1.5ml και προσθέτουμε στη μεμβράνη της στήλης 30μl RNase-free H<sub>2</sub>O. Η στήλη φυγοκεντρείται στις 10.000rpm για 1 λεπτό και το προϊόν της έκλουσης επαναφορτώνεται στη στήλη για επανάληψη της φυγοκέντρησης για όσο το δυνατόν μεγαλύτερη συγκέντρωση RNA. Το RNA φυλάσσεται αυστηρά στους -80° C.

### 3.9.1.2 Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα

Ολικό RNA απομονώνεται από τα κύτταρα με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIZOL. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε καθαρό απαγωγό και με ιδιαίτερη προσοχή λόγω τοξικών αντιδραστηρίων και με ξεχωριστό εξοπλισμό για αποφυγή δράσης RNασών. Τα κύτταρα ξεπλένονται με διάλυμα PBS και αμέσως μετά προστίθεται διάλυμα TRIZOL απευθείας στο καλλιεργητικό τρυβλίο (300μl για τρυβλίο 60mm, 1ml για τρυβλίο 10cm). Τα κύτταρα αποξύνονται και μεταφέρονται σε σωληνάρια eppendorf. Το αντιδραστήριο TRIZOL (Invitrogen, Life Technologies) είναι ένα μονοφασικό διάλυμα ισοθειοκυανικής φαινόλης και γουανιδίνης, το οποίο προκαλεί λύση των κυττάρων και διαχωρισμό των κυτταρικών στοιχείων από το πυρηνικό οξύ, διατηρώντας ακέραιο το RNA. Για την πλήρη ομογενοποίηση του δείγματος και τη διάρρηξη του γενωμικού DNA από το οποίο θέλουμε να απαλλαγούμε χρησιμοποιείται σύριγγα ινσουλίνης διαμέτρου 0.9mm, απ' όπου το διάλυμα κυττάρων- TRIZOL περνάει 15-20 φορές. Το δείγμα επωάζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται χλωροφόρμιο (60μl και 200μl αντίστοιχα) και γίνεται έντονη ανάδευση. Το χλωροφόρμιο χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό του διαλύματος σε 3 φάσεις. Η άνω φάση περιέχει



αποκλειστικά το RNA, η ενδιάμεση περιέχει το DNA και κάτω η ανόργανη φάση φαινόλης χλωροφορμίου. Το δείγμα επώάζεται για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 12000xg για 15min στους 4° C. Αναρροφάται προσεκτικά η άνω φάση και μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorf. Στη συνέχεια ακολουθεί η κατακρήμνιση του RNA με την προσθήκη ισοπροπανόλης (150μl και 500μl αντίστοιχα) και επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Το δείγμα έπειτα φυγοκεντρείται στις 12000xg για 10min στους 4° C. Αφαιρείται το υπερκείμενο. Το RNA σχηματίζει ένα διάφανο ίζημα στο κατώτερο τοίχωμα του erpendorf. Τέλος γίνεται έκπλυση του RNA με 1ml 75% αιθανόλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 7500xg για 5min στους 4° C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και στεγνώνεται το ίζημα. Το RNA επαναδιαλύεται σε RNase-free H<sub>2</sub>O ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος το οποίο κρίνουμε οπτικά (10-50μl). Το ολικό RNA διατηρείται στους -80° C.

### **3.9.1.3 Απομόνωση δεσοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA)**

Στη στήλη που έχει κατακρατηθεί το DNA από το αρχικό υλικό, προστίθεται 500μl διαλύματος καθαρισμού AW1 και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 15 δευτερόλεπτα. Το εκλούμενο προϊόν απορρίπτεται και στη στήλη προστίθεται 500μl διαλύματος καθαρισμού AW2. Η στήλη επαναφυγοκεντρείται σε υψηλότερη ταχύτητα για 2 λεπτά και μεταφέρεται σε τελικό σωληνάριο 1,5ml για τη συλλογή του καθαρού DNA. Στη μεμβράνη της στήλης προστίθεται 100μl διαλύματος έκλυσης EB, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 1 λεπτό. Το εκλούμενο προϊόν επαναφορτώνεται στη στήλη για ακόμα μία φυγοκέντρηση και συλλέγεται το DNA σε τελικό όγκο 100μl το οποίο φυλάσσεται στους -80° C.

### **3.9.1.4 Απομόνωση πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ιστό**

Στο διάλυμα που έχει φυλαχτεί από την αρχική απομόνωση του ιστού, προστίθεται ίσος όγκος (1:1) διαλύματος APP, γίνεται καλή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά ώστε να επιτευχθεί κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στην υψηλότερη ταχύτητα για 10 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου. Στη συνέχεια, προστίθεται 500μl αιθανόλης 70% στο πρωτεϊνικό ίζημα και το διάλυμα φυγοκεντρείται σε υψηλή ταχύτητα για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απαλλαγούμε από τα

υπολείμματα αιθανόλης. Τέλος, προστίθεται 100-200μl διαλύματος ALO + DTT και το ίζημα επαναδιαλύεται με τη βοήθεια πιπέτας. Το διάλυμα ALO περιέχει χρωστική βρωμοφαινόλης (Laemmli) και προσφέρει σταθερότητα και καλύτερη διατήρηση των πρωτεϊνών που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για ανοσοκατακρήμνιση κατά Western. Για την εξ ολοκλήρου διάλυση του ιζήματος και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών το διάλυμα επωάζεται σε θερμοκρασία 95° C για 5 λεπτά και μετά από μία τελική φυγοκέντρηση σε υψηλή ταχύτητα για 1 λεπτό, το υπερκείμενο φυλάσσεται στους -80° C μέχρις ότου χρησιμοποιηθεί για ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

### **3.9.2 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)**

Το συμπληρωματικό DNA (complementary DNA- cDNA) συντίθεται από ώριμο mRNA το οποίο είναι ένα μόριο RNA έτοιμο προς μετάφραση. Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται με το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση και αποτελεί το εκμαγείο για τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης.

Από τα νουκλεϊκά οξέα που απομονώθηκαν, χρησιμοποιήθηκε 0,5-1μg RNA για τη σύνθεση cDNA τελικού όγκου 20μl με το πακέτο προϊόντων PrimeScript 1<sup>st</sup> strand cDNA synthesis (Takara #6110). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής: σε μικροσωληνάριο των 200μl αναμιγνύονται 1μl Oligo dT Primer (50μM), 1μl dNTP Mixture (10mM each), RNA (0,5-1μg), RNase- free H<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 10μl. Το διάλυμα αναδεύεται προσεκτικά με πιπέτα και επωάζεται στους 65° C για 5 λεπτά και εν συνεχεία στους 4° C για 2 λεπτά. Ακολουθεί η προσθήκη 4μl (5X) PrimeScript Buffer, 0,5 μl (20 units) RNase Inhibitor (40 U/μl), 1μl (200 units) PrimeScript RTase (200 U/μl), RNase- free H<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 20μl. Το διάλυμα αναμιγνύεται ενδελεχώς και επωάζεται για την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταγραφής σε θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα: 30° C/10min, 42° C/45min, 95° C/5min, 4° C. Το cDNA φυλάσσεται στους -20° C.

### **3.9.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη απλή μέθοδος με πολλές δυνατότητες. Αναπτύχθηκε το 1983 από τον Mullis (224) και έκτοτε εφαρμόζεται κατα κόρον, καθώς δίνει τη δυνατότητα επιλεκτικού πολλαπλασιασμού ενός τμήματος DNA ή RNA κατά

εκατομμύρια φορές και αποτελεί βασική μέθοδο μοριακής διάγνωσης. Η PCR βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA, εκατέρωθεν του οποίου βρίσκονται δύο εκκινητές, δηλαδή δύο μικρές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που υβριδοποιούνται ειδικά στις συμπληρωματικές αλυσίδες της αλληλουχίας- στόχου. Οι εκκινητές, το μέγεθος των οποίων φτάνει συνήθως τις 20-35 βάσεις νουκλεοτιδίων, συντίθενται χημικά.

Στο παρόν πείραμα, το cDNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για τον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων που μελετήσαμε σε επίπεδο mRNA. Η διαδικασία της PCR είχε ως εξής: αρχικά, οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται με εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (94° C/3min). Έπειτα, επιτρέπεται στους εκκινητές, οι οποίοι βρίσκονται σε περίσσεια, να βρουν τη συμπληρωματική αλληλουχία-στόχο στο αποδιατεταγμένο DNA και να υβριδοποιηθούν (59° C/30sec). Η θερμοκρασία υβριδοποίησης ( $T_{annealing}$ ) είναι ειδική για το ζεύγος των εκκινητών και εξαρτάται από την αλληλουχία τους. Τέλος, με τη βοήθεια της Taq DNA πολυμεράσης πραγματοποιείται η επιμήκυνση των εκκινητών (72° C/1min) χρησιμοποιώντας το γενωμικό DNA ως εκμαγείο. Το ένζυμο Taq πολυμεράση έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, εμφανίζει ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες και πολυμερίζει νουκλεοτίδια με κατεύθυνση 5' προς 3', επιμηκώνοντας τον ήδη προσκολλημένο εκκινητή. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για περίπου 27-35 κύκλους και τα προϊόντα του προηγούμενου κύκλου αποτελούν υποστρώματα για τον επόμενο, επομένως ο αριθμός αντιγράφων αυξάνεται εκθετικά. Το τελικό στάδιο (72°C/7min) της αντίδρασης αποτελεί η επιμήκυνση του τμήματος DNA και η επαναδιάταξη των αλυσίδων για τη δημιουργία ξανά ενός δίκλωνου μορίου. Για την ενίσχυση των τμημάτων των γονιδίων ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω αλληλουχίες εκκινητών (Πίνακας 3.4).

**Πίνακας 3.4:** εκκνηριές που χρησιμοποιήθηκαν για την περική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Γ ΟΝΙΜΙΟ	Ε ΚΚΙΝΗΤΗ Ε F'	ΕΚΚΙΝΗΤΗ Ε R'	T <sub>m</sub>		F' CG%	R' CG%	ΙΠΡΩΝ
			F'	R'			
G APDH	G TGGTCCTCTGACTTCAACA	ACCACCCCTGTGCTGTAGCC	59.63	62.41	50.00	60.00	134bp
β-actin	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	58.18	59.67	50.00	55.00	141bp
18S rRNA	GCTGCTGGACCCAGACTT	CGGCTACCACATCCAAGG	56.32	57.46	58.82	61.11	180bp
Nβe1(GR)	TGAAA TGGGCAAAGGGATACC	GGTCATACATGCAGGGTAGAGT	61.53	59.30	50.00	50.00	201bp
Nβe2 (MR)	G TGTCCTCAACAATTCGGGCAG	GACTCCACCTTGGCCAGCT	61.98	61.90	54.55	63.16	192bp
Ube3a	GGCTTTTCGGAGAGGTTTCAT	CAGAGTCCCCTGGTA TAGCCACC	59.18	61.61	45.45	59.09	161bp
Drd1a	CGAGGCTCCATCTCCAAGGA	TGGGTAACGGGTGGATCTT	61.05	58.64	60.00	50.00	188bp
GLZ	CAAGATGAGCAGGCCATGGA	TGGCTCTTCAGGGCTCAGC	60.68	61.96	52.38	63.16	199bp
POMC	G ACCTCACACGGAAAGCAA	AAAGTGACCCATGACGTACT	60.53	55.66	55.00	47.37	140bp
BDNF	TGAGTCTCCAGGACAGCAAAGC	G TGGACGTTTACTTCTTTCATGG	62.51	57.97	54.55	43.48	131bp
FZD4 (Frizzled4)	TTTCACACCCGCTCATCCAG	TGACTGAAAGACACATGCCCG	57.77	58.49	52.63	50.00	131bp
FRZB (Frizzled related protein)	C ACTGTCAACCTCTATACCAGC	G TCGATCCCTCCACTTCTCAG	58.21	57.84	50.00	52.38	146bp
OMD (Osteomodulin)	ACGATGATCCTGACAATGCTC	G TATAGGTTTTGTGAAGTCGTAAGTG	58.17	58.27	47.62	38.46	135bp
BGLAP (Osteocalcin)	CAGCGAGGTAGTAAGAGAC	TGAAAGCCGATGTGGTCAG	57.45	57.77	55.00	52.63	144bp

### **3.9.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative real-time PCR- qPCR)**

Για την ποσοτικοποιημένη διερεύνηση της έκφρασης μεταγράφων πραγματοποιείται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με τη χρήση του αντιδραστήριου Sso Advanced SYBR Green supermix (BioRad). Προηγουμένως, γίνονται οι κατάλληλες δοκιμές για την επιλογή των σωστών αραιώσεων των δειγμάτων για την ικανοποιητική απορρόφηση των εκκινητών. Ακολουθείται το πρωτόκολλο της εταιρίας για την προετοιμασία των δειγμάτων στην ειδική πλακέτα σάρωσης από το λογισμικό της εταιρίας (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System). Οι τιμές που δίνονται σαν αποτέλεσμα αντιπροσωπεύουν την ποσοτικοποιημένη έκφραση των γονιδίων που έχουν ελεγχθεί. Όλα τα δείγματα αναλύονται ανά γονίδιο δύο φορές και η ειδική πλακέτα περιλαμβάνει πάντα εκτός των γονιδίων ελέγχου και ένα γονίδιο αναφοράς, καθώς επίσης και αρνητικά δείγματα ελέγχου για κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Έτσι, η έκφραση υπολογίζεται βάση της κανονικοποίησης με το γονίδιο αναφοράς και οι σχετική έκφραση του κάθε μετάγραφου υπολογίζεται με τη φόρμουλα  $2^{-\Delta Ct}$ .

### **3.9.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης**

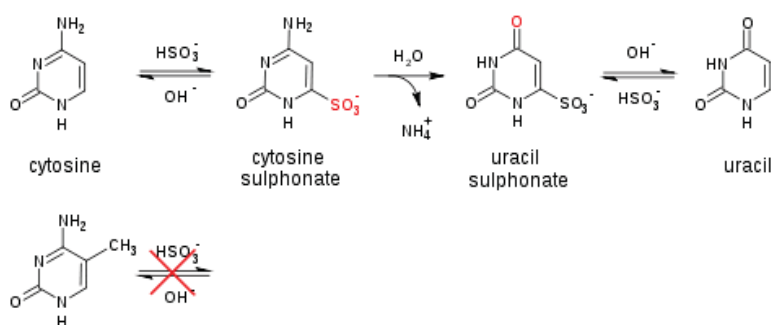
Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μέθοδο διαχωρισμού μορίων νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθος και το φορτίο τους. Για τον διαχωρισμό μεγάλων μορίων (>100bp) χρησιμοποιείται η πηκτή αγαρόζης και όσο μεγαλύτερο το μέγεθος των μορίων που θέλουμε να διακρίνουμε, τόσο μικρότερη η συγκέντρωση παρασκευής του πηκτώματος. Στη μελέτη μας το μέγεθος των μορίων δεν ξεπερνούσε τις 300bp, επομένως παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,5-2% με την προσθήκη διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) το οποίο χρησιμοποιείται κατά κόρον ως χρωστική, απαραίτητη για την εμφάνιση σήματος στην έκθεση σε υπεριώδες φως (UV). Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε τάση 50-100 Volt για 20-30 λεπτά.

### **3.9.6 Ανάλυση μεθυλίωσης**

#### **3.9.6.1 Χημική τροποποίηση γενωμικού DNA με NaHSO<sub>3</sub>**

Η δυνατότητα χημικής τροποποίησης των βάσεων του DNA με NaHSO<sub>3</sub> είναι γνωστή από τη δεκαετία του '70 (225, 226). Παρόλα αυτά, εφαρμόστηκε ευρέως από τις

αρχές της δεκαετίας το '90 και αποτέλεσε μια καινοτόμα τεχνική για τη μελέτη της μεθυλίωσης μεμονωμένων νησίδων CpG του γονιδιώματος (227). Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνταν μέχρι τότε ήταν πολύ λίγες και οι περισσότερες από αυτές απαιτούσαν σχετικά μεγάλες ποσότητες DNA (της τάξης των 10 µg). Με την τεχνική αυτή επιδρούμε με NaHSO<sub>3</sub> στις κυτοσίνες μορίων DNA που έχουν προηγουμένως υποστεί αποδιάταξη. Ακολουθούν διαδοχικές αντιδράσεις σουλφονυλίωσης, απαμίνωσης και αποσουλφονυλίωσης που οδηγούν στη μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες, ενώ οι 5-μεθυλοκυτοσίνες (5-mC) παραμένουν ως έχουν (Εικόνα 3.9.1). Συγκεκριμένα, αρχικά πραγματοποιείται προσθήκη HSO<sup>-3</sup> στον 5,6-διπλό δεσμό του δακτυλίου κυτοσίνης (σουλφονυλίωση), ακολουθεί απελευθέρωση NH<sub>4</sub> με υδρόλυση (υδρολυτική απαμίνωση) και, τέλος, απελευθέρωση HSO<sup>-3</sup> (αλκαλική αποσουλφονυλίωση). Αποτέλεσμα αυτής της σειράς αντιδράσεων είναι η μετατροπή της κυτοσίνης σε ουρακίλη. Στις 5-mC, η μεθυλομάδα δυσχεραίνει την προσθήκη του HSO<sup>-3</sup> στο διπλό δεσμό, αφενός λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης και, αφετέρου, μέσω επαγωγικού φαινομένου. Επιπλέον, η υδρολυτική απαμίνωση πραγματοποιείται πιο αργά (η αντίδραση αυτή έχει υποδιπλάσια απόδοση). Επομένως, μετά από την επίδραση με NaHSO<sub>3</sub> οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες, ενώ οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες δεν υφίστανται τροποποίηση.



**Εικόνα 3.9.1:** Χημική τροποποίηση μη μεθυλιωμένων κυτοσινών με το άλας δισουλφιδίου.

Η χημική τροποποίηση του DNA που πρόκειται να αναλυθεί περαιτέρω με pyrosequencing γίνεται αποκλειστικά με το πακέτο της QIAGEN (EpiTect Bisulfite kit-QIAGEN). Για το πρωτόκολλο αυτό απαιτούνται 2µg γενωμικού DNA το οποίο επωάζεται σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης άλατος δισουλφιδίου με ταυτόχρονη υψηλή θερμοκρασία και χαμηλό pH. Ακολουθούν διαδοχικές αντιδράσεις PCR στις οποίες τα

κατάλοιπα ουρακίλης μετατρέπονται σε θυμίνες. Έτσι προκύπτει το τροποποιημένο DNA το οποίο χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την περαιτέρω ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης με τη μέθοδο Pyrosequencing.

### 3.9.6.2 Ειδική μέθοδος ανάλυσης μεθυλίωσης- Pyrosequencing

Η ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης επιλεγμένων περιοχών για τη λεπτομερή αναγνώριση των σημειακών αλλαγών πραγματοποιείται με τη μέθοδο αυτή σύμφωνα με το πακέτο αντιδραστηρίων της QIAGEN (PyroMark Q24 MDx technology & PyroMark PCR kit- QIAGEN). Αυτή η νεότερης γενιάς μέθοδος έχει αντικαταστήσει τα τελευταία χρόνια την κλασική, πλην προβληματική τεχνική MS-PCR (Methylation- Specific PCR) λόγω πολύ μεγαλύτερης ευαισθησίας και αξιοπιστίας της πρώτης. Η τεχνική απαιτεί την πραγματοποίηση τουλάχιστον διπλών αντιδράσεων ανά δείγμα για την εξασφάλιση της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων και επιτυχίας της μεθόδου. Αρχικά, πραγματοποιείται μια αντίδραση PCR στην οποία χρησιμοποιείται ένας βιοτινυλιωμένος εκκινητής στο 5' άκρο ώστε να γίνει σήμανση βιοτίνης στη μία εκ των δύο αλυσίδων DNA. Στη συνέχεια, οι βιοτινυλιωμένες μονόκλωνες αλυσίδες DNA κατακρατούνται και ξεχωρίζονται για να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγείο για τις αντιδράσεις pyrosequencing με ειδικούς εκκινητές ανίχνευσης μεθυλίωσης (Πίνακας 3.5) οι οποίοι σχεδιάζονται με ειδικό λογισμικό της εταιρίας (PyroMark Assay Design Software- QIAGEN). Η ανάλυση γίνεται ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρίας με την ταυτόχρονη χρήση θετικών δειγμάτων ελέγχου (μεθυλιωμένα και μη-μεθυλιωμένα, χημικά τροποποιημένα και φυσιολογικά μη-μεθυλιωμένα ανθρώπινα δείγματα DNA) που προτείνονται από την εταιρία για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων (EpiTect Control DNAs-QIAGEN #59695). Τα αποτελέσματα παρατίθενται αριθμητικά για τις σημειακές μετρήσεις που γίνονται και αξιολογούνται συνήθως με διαγράμματα μέσω των όρων. Στον παρακάτω πίνακα συγκεντρώνονται οι περιοχές ανάλυσης και οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 3.5).

<b>Πίνακας 3.5:</b> <i>GNAS</i> transcript primers, <i>UBE3A</i> promoter primers and CpG location according to UCSC Genome Browser			
<b>Transcripts</b>	<b>Location</b>	<b>Sequences</b>	<b>Primers</b>
NESP CpG24	chr20:57414596- 57414896, 301bp	5'-AAGTATTGGATTGGGGTTAGT-3' 5'-AACTCCTCTCACTAAATCTTAAATTC-3'	F'/Pyro R'-5'biotin labeled
NESP CpG177	chr20:57415136- 57417153, 2018bp	5'-GAAGGAGTTTAAGGAGGAGAAGTA-3' 5'-CACCAACTCAAAAACCTCAAATTATCTC-3' 5'-GAGTTTAAGGAGGAGAAGTA-3'	F' R'-5'biotin labeled Pyro

GNASXL CpG26	chr20:57426730- 57427047, 318bp	5'-GTTAATTTGTTTTATTGGTGAGA-3' 5'-ACCTCACAAAACAACCTCAAAAT-3' 5'-ATTTTTGGTTAGTTTTGAGT-3' 5'-GGGGTTAAAGGAGTTGA-3'	F' R'-5'biotin labeled Pyro (1st) Pyro (2nd)
GNASXL CpG27	chr20:57427692- 57427995, 304bp	5'-GATTTAGAGTTTATAGGGGTATTTG-3' 5'-TCTCTTCTTTTTACTCCAAACC-3' 5'-AGGGTTTTAGTTTTGTATTTTA-3' 5'-GTTTATTAGTTTTTTTATTTAAAGT-3'	F' R'-5'biotin labeled Pyro (1st) Pyro (2nd)
GNASXL CpG190	chr20:57429025- 57431239, 2215bp	5'-GGTAGTTTATTTAAGAGGTTGTTAGAT-3' 5'-ACCCCAAAAAAATACTTTTCTCCCT-3' 5'-AGTTTTTGGATGGAGAT-3'	F' R'-5'biotin labeled Pyro
UBE3A 1 <sup>ST</sup>		5'-GGTTTATAGATTGAGTAAAAGGAGTAGA-3' 5'-AACCTATCCTCTCCTAAAATCACCC-3' 5'-AGTTAGAGGAGGGTTTTATA-3'	F' R'-5'biotin labeled Pyro
UBE3A 2 <sup>ND</sup>		5'-GATGGTGGAGTTTTTTTTTGGGTGATTTAGG-3' 5'-ACCCCAACAACACTAACCTATCCT-3' 5'-AGTTTTAGTTAGGTAGGGTTGG-3'	F' R'-5'biotin labeled Pyro
UBE3A 3 <sup>RD</sup>		5'-AGGGAGATAAGGATTAGTGAGG-3' 5'-CAACCCACTAAACACACATCTAAATAT-3' 5'-TGGGTGATTTTAGGAG-3'	F' R'-5'biotin labeled Pyro
UBE3A 4 <sup>TH</sup>		5'-GTTTTTTTTTAGGAGTTGT-3'	Pyro
UBE3A 5 <sup>TH</sup>		5'-GTTTTTTGAGGAGAAGAGAGGGT-3'	Pyro
UBE3A 6 <sup>TH</sup>		5'-GGGGGAGAGGATAGGTTA-3'	Pyro
UBE3A 7 <sup>TH</sup>		5'-TGTTAGTGTTGGTTGGA-3'	Pyro

### 3.9.7 In situ υβριδοποίηση σε κρυοτομές εγκεφάλου με σήμανση <sup>35</sup>S

Η χρήση ραδιενεργών στοιχείων απαιτεί την αυστηρή τήρηση των κανόνων ασφαλείας του εργαστηρίου. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν δείκτες RNA (riboprobes) και η σήμανση έγινε με τη χρήση του ραδιοϊσότοπου <sup>35</sup>S. Τα βασικά στάδια του πρωτοκόλλου είναι τα εξής:

1. προετοιμασία δεικτών για την υβριδοποίηση: PCR για ενίσχυση των RNA δεικτών CB1/c-fos με ειδικούς εκκινητές ακολουθώντας το παρακάτω πρόγραμμα:

Master Mix	CB1	C-fos	
H <sub>2</sub> O	13,2x5=66ul	66ul	
Buffer	2x5=10ul	10ul	PCR program BIO-RAD (2h)



10x				} X35 cycles
MgCl <sub>2</sub>	1,5x5=7,5ul	7,5ul	94°C/5min	
dNTPs	0,5x5=2,5ul	2,5ul	94°C/30sec	
Primer AS	0,5x5=2,5ul	2,5ul	57°C/30sec	
Primer S	0,5x5=2,5ul	2,5ul	72°C/1min	
Taq (1:100)	1,5ul	1,5ul	72°C/5min	
			12°C/∞	

- Καθαρισμός προϊόντων PCR με τη χρήση του πακέτου αντιδραστηρίων της QIAGEN (QIAquick PCR purification kit, #28106)
- Ηλεκτροφόρηση των καθαρών προϊόντων PCR σε γέλη αγαρόζης 2% για επιβεβαίωση επιτυχίας ενίσχυσης των δεικτών
- Σήμανση των δεικτών CB1 και c-fos με <sup>35</sup>S, καταστροφή DNA και απομόνωση RNA με τη χρήση του πακέτου προϊόντων της QIAGEN (RNeasy kit, #74106)

## 2. μονιμοποίηση των δειγμάτων σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Fixation	10min	4%PFA/PBS-DEPC (1x) <b>160ml PBS-DEPC (1x)+40ml PFA (20%)</b>
2. Rinse	3x5min	PBS-DEPC (1x)
3. TEA	10min	0.1M triethanolamine-HCl pH: 8.0 (TEA) <b>180ml PBS-DEPC (1x)+20ml TEA (10x)+600ul acetic anhydrite <u>*just before use*</u></b>
4. Rinse	2x5min	(2x) SSC/DEPC
5. Dehydration	1min	60% EtOH
	1min	75% EtOH
	1min	95% EtOH
	1min	100% EtOH (before)

	1min	CHCl <sub>3</sub> (chloroform)
	1min	100% EtOH (after)
6. Air dry	3hours	Leave the slides drying in hood

### 3. υβριδισμός

- Υπολογίζουμε την ποσότητα των δεικτών που θα χρειαστούμε ανά αντικειμενοφόρο πλάκα και ετοιμάζουμε τα διαλύματα δεικτών- μίγμα υβριδοποίησης
- Ακολουθεί αποδιάταξη των δεικτών σε θερμοκρασία 90°C για 2 λεπτά και μεταφορά σε πάγο.
- Τα δείγματα επωάζονται με τον δείκτη για υβριδοποίηση στους 55-60°C σε σκοτεινό μέρος μέχρι την επόμενη ημέρα.

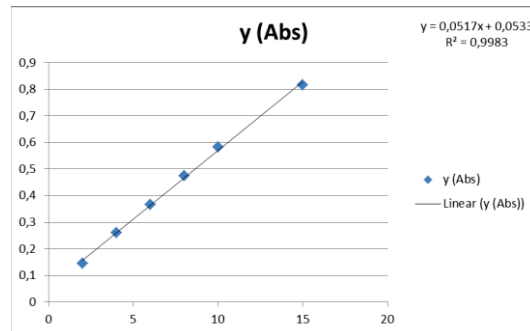
### 4. μετα- υβριδοποίηση

- Ετοιμάζονται διαλύματα πλύσης οι οποίες πραγματοποιούνται σταδιακά σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. (4x5min)	RT	(4x) SSC  <b>200ml (20x) SSC+800ml H<sub>2</sub>O</b>  *first 2 washes in hotlab because radioactivity still exists-radioactivity liquid waste
2. (20min)	37°C	NTE (20ug/ml RNase A)-NTE stock (10x): make (1x)  <b>Add 500ul RNaseA (10mg/ml)/250ml NTE (1x)</b>
3. (2x5min)	RT	(2x) SSC + 1mM DTT  <b>Add 50ul 5M DTT/250ml SSC (2x)</b>
4. (10min)	RT	(1x) SSC + 1mM DTT  <b>Add 50ul 5M DTT/250ml SSC (1x)</b>
5. (10min)	RT	(0.5x) SSC + 1mM DTT  <b>Add 50ul 5M DTT/250ml SSC (0.5x)</b>
6. (2x30min)	64°C	(0.1x) SSC + 1mM DTT  <b>Add 50ul 5M DTT/250ml SSC (0.1x)</b>



Αναλόγως φωτομετρούνται και τα δείγματα προς ποσοτικοποίηση και με βάση την καμπύλη υπολογίζονται οι ποσότητες που θα χρησιμοποιηθούν για την ισοφόρτωση στην ηλεκτροφόρηση.



### 3.9.8.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός πρωτεϊνών, υπό μετουσιωτικών συνθηκών, πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση μίας διαστάσεως σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS, σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli. Παρασκευάζονται δύο πηκτές πολυακρυλαμιδίου:

1. Η πηκτή επιστοιβάξης, με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 5% [H<sub>2</sub>O, 30% Acrylamide mix, 1M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED] με μεγάλο μέγεθος πόρων και
2. Η πηκτή διαχωρισμού, με τελική συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου 12% [H<sub>2</sub>O, 30% Acrylamide mix, 1.5M Tris-HCl pH 8.8, 10% SDS, 10% APS, TEMED] με μικρότερο μέγεθος πόρων.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου-SDS σύμφωνα με τη μέθοδο Laemmli (228). Χρησιμοποιήθηκε σύστημα δύο κάθετων γυάλινων πλακών, μεταξύ των οποίων στοιβάζεται η πηκτή πολυακρυλαμιδίου η οποία χωρίζεται σε δύο μέρη, την πηκτή επιστοιβάξης και την πηκτή διαχωρισμού.

Τα μίγματα των δύο πηκτών, μετά την παρασκευή τους, πολυμερίζονται με προσθήκη διαλύματος TEMED (Sigma). Ο πολυμερισμός της πηκτής γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά. 50μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος ισοφορτώνονται στην πηκτή και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τάση 100V σε κατάλληλο διάλυμα ηλεκτροφόρησης [25mM Tris- HCl, 192mM Glycine, 0.1% (w/v)

SDS, pH 8.3] μεχρις ότου διαχωριστούν ικανοποιητικά οι πρωτεΐνες με βάση το μάρτυρα μεγεθών.

### **3.9.8.3 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης και εφόσον λάβει χώρα η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα μεταφοράς [0.58% (w/v) Tris- HCl, 0.292% Glycine, 20% (v/v) Methanol] για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στο ίδιο διάλυμα καταβυθίζονται και 2 σφουγγαράκια συσκευής, 4 κομμάτια απορροφητικού χαρτιού Whatmann 3MM, καθώς και ένα κομμάτι μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, τα οποία έχουν ακριβώς τις ίδιες διαστάσεις με αυτές της πηκτής (10x8cm). Στη συνέχεια τα κομμάτια μεταφέρονται στην επιφάνεια του ακίνητου ηλεκτροδίου συσκευής υγρής πρωτεϊνικής ηλεκτρομεταφοράς με την ακόλουθη σειρά: 1 σφουγγαράκι, 2 κομμάτια χαρτιού Whatmann- μεμβράνη νιτροκυτταρίνης- πηκτή- 2 κομμάτια χαρτιού Whatmann, 1 σφουγγαράκι. Με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur, απομακρύνουμε τις φυσαλίδες μεταξύ των κομματιών και εν συνεχεία εφαρμόζουμε στην επιφάνειά τους το δεύτερο ηλεκτρόδιο της συσκευής (αρνητικός πόλος). Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται σε σταθερή τάση 220mA για 2 ώρες.

### **3.9.8.4 Κάλυψη μη ειδικών θέσεων μεμβράνης (Blocking)**

Στη συνέχεια, η μεμβράνη μεταφέρεται σε διάλυμα PBS-T (1x) παρουσία σκόνης μη λιπαρού γάλακτος [10% (w/v)], και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1 ώρα προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές συνδέσεις της μεμβράνης. Η καζεΐνη του γάλακτος μπλοκάρει τις θέσεις πρωτεϊνών. Ακολούθως, η μεμβράνη υφίσταται 2 διαδοχικές εκπλύσεις, διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία, με 100ml διαλύματος PBS-T (1x).

### **3.9.8.5 Επώαση με ειδικά αντισώματα**

Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το ειδικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε σε 1ml διαλύματος PBS-T (1x), παρουσία BSA [3% (w/v)], σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1 ώρα υπό ανακίνηση ή στους 4° C για 16-18 ώρες (overnight) υπό ανακίνηση, ανάλογα με την ισχύ πρόσδεσης του αντισώματος.

Μετά το τέλος της επώασης, η μεμβράνη υφίσταται 4 διαδοχικές εκπλύσεις, διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία σε διάλυμα PBS-T (1x), παρουσία σκόνης μη λιπαρού γάλακτος [2.5% (w/v)] για να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτοταγούς αντισώματος. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται εκ νέου με αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών του είδους προέλευσης του πρωτοταγούς αντισώματος για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση. Ακολουθούν 2 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα γάλακτος και ακόμα 2 με διάλυμα PBS-T (1x), παρουσία Tween-20 [0.05% (w/v)], προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του δευτεροταγούς αντισώματος. Το δευτεροταγές αντίσωμα φέρει συζευγμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανίου (HRP), το οποίο είναι υπεύθυνο για την αντίδραση χημειοφωταύγειας. Μετά το τέλος και της δεύτερης επώασης ακολουθεί η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL) και η ανίχνευση της πρωτεΐνης. Στον πίνακα που ακολουθεί συγκεντρώνονται όλα τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά μας (Πίνακας 3.7).

<b>Πίνακας 3.7:</b> αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά western και ανοσοφθορισμό (ICC)		
<b>Αντίσωμα</b>	<b>Cat.No</b>	<b>Εταιρία</b>
Tubulin-a	T5168	Sigma- Aldrich
Actin-b	13E5 (4970)	Cell signaling
Ki67	ab15580	Abcam
p21	sc-397	Santa-Cruz
p53	sc-126	Santa-Cruz
GR	D6H2L (12041)	Cell signaling
pGR	Ser211 (4161)	Cell signaling
MCR	sc- 53000	Santa-Cruz
UBE3A	ab183869	Abcam
Total OXPHOS Rodent WB Ab cocktail	ab110413	Abcam
Cytochrome C	ab13575	Abcam
SLC25A22	ab60332	Abcam
Ca <sub>v</sub> 1.2	no	Lab constructed
NMDA NR2A	sc-1468	Santa-Cruz
NMDA NR2B	sc-1469	Santa-Cruz

### **3.9.8.6 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot)**

Η διαδικασία εμφάνισης που ακολουθείται είναι αυτή που συνιστάται από την κατασκευάστρια εταιρία στο φύλλο οδηγιών του αντιδραστηρίου ECL. Η μέθοδος ECL είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης της υπεροξειδάσης του ραπανιού (HRP) σε συνθήκες ανοσοαποτύπωσης. Η ικανότητα ανίχνευσης ενός αντιγόνου με τη μέθοδο αυτή αγγίζει την τάξη του πικογραμμαρίου. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην ανάμιξη ίσων ποσοτήτων δύο αντιδραστηρίων, ενός υπεροξειδίου και ενός ενισχυτή σήματος. Το μίγμα των δύο αυτών αντιδραστηρίων αποχύνεται ομοιόμορφα πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επωάζεται για 5 λεπτά, οπότε και πραγματοποιείται η αντίδραση χημειοφωταύγειας μεταξύ του υπεροξειδίου και της HRP. Ακολούθως, αποστραγγίζεται η περίσσεια του μίγματος ECL και τοποθετείται η μεμβράνη στην ειδική κασέτα έκθεσης. Πάνω σε αυτή εφαρμόζεται ένα ισομεγέθες κομμάτι X-ray film και κλείνεται η κασέτα για χρόνους έκθεσης από 30sec έως 60min. Στη συνέχεια, το film τοποθετείται σε ειδικό μηχάνημα εμφάνισης μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες. Μετά το πέρας της εμφάνισης, η μεμβράνη εκπλένεται από το ECL με Tween 20, όπως και πριν, και είτε φυλάσσεται για μελλοντική άμεση χρήση σε PBS 1x στους 4° C, είτε για περισσότερο χρονικό διάστημα στους -20° C, είτε επωάζεται αμέσως με νέο αντίσωμα (reprobing).

### **3.10 Έμμεσος ανοσοφθορισμός (ICC) σε νευρικά κύτταρα**

Κύτταρα νευροβλαστώματος που αναπτύχθηκαν προσκολλούμενα σε καλυπτρίδες εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS και μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεϋδης 3,7% για 10 λεπτά. Τα μονιμοποιηθέντα κύτταρα εκπλύθηκαν τρεις φορές με PBS και στη συνέχεια επώστηκαν με διάλυμα χρώσης A σε θερμοκρασία δωματίου για 45-60 λεπτά. Το διάλυμα χρώσης A αποτελείται από ισοτονικό διάλυμα PBS 1x που περιέχει 1% Triton X-100 και 1% ορό όνου. Για τη συνταγή επαρκούς ποσότητας διαλύματος A απαιτούνται 50ml PBS 1x, 500μl 1% Triton X-100, 500μl 1% donkey serum. Το Triton X-100 διαλυτοποιεί τα μεμβρανικά λιπίδια και χρησιμοποιείται για να γίνουν τα κύτταρα διαπερατά στα αντισώματα. Ακολούθησε η προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος σε κατάλληλη αραιώση (1:100 για p21/p53) σε διάλυμα χρώσης A και επώαση σε θερμοκρασία 4°C σε σκοτεινό μέρος με υγρασία για 12-24 ώρες. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα χρώσης A και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα

(anti-rabbit 1:1000) σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος για 1 ώρα. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα PBS 1x και ακολούθησε η χρώση των πυρήνων με DAPI (40ng/ml σε PBS) σε αραιώση με PBS (1:1000). Προστέθηκαν 50-60μl DAPI στις καλυπτρίδες και τα κύτταρα επώστηκαν για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος τα κύτταρα εκπλύθηκαν 3 φορές με PBS και οι καλυπτρίδες επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με τη χρήση 10μl διαλύματος 1 mg/ml p-φαινυλενεδιαμίνης (Aqua- Poly/Mount), αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του φθορισμού. Οι καλυπτρίδες παρέμειναν μέχρι να στεγνώσουν σε σκοτεινό μέρος και παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο φθορισμού την επόμενη ημέρα.

### 3.11 Στατιστική και βιοπληροφορική ανάλυση

Τα αποτελέσματα τόσο των πειραμάτων *in vivo* όσο και *in vitro* αναλύθηκαν με κάποια στατιστική μέθοδο. Το λογισμικό GraphPad Prism χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή του μη- παραμετρικού Mann Whitney t-test κατά τη σύγκριση ομάδων μεταξύ τους για διαφορετικές παραμέτρους. Αυτό το τεστ χρησίμευσε στο πείραμα ανάλυσης μεθυλίωσης για το γονίδιο *GNAS* μετά την επίδραση της μηχανικής διάτασης στα κύτταρα, καθώς επίσης και στη σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα ομαδοποιημένα πειραματόζωα HAB, NAB, LAB στη μελέτη της ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών του φάσματος των μιτοχονδρίων και των πρωτεϊνικών διάλυτων ιόντων. Σε αντίθεση με τις παραπάνω περιπτώσεις, η σύγκριση των αποτελεσμάτων του στρες μητρικής αποστέρησης απαιτεί τη χρήση πιο περίπλοκων μεθόδων στατιστικής ανάλυσης δεδομένου ότι τα δείγματα δεν μπορούν να ομαδοποιηθούν σε stressed και non-stressed. Στην περίπτωση αυτή, που η σύγκριση πρέπει να γίνει για ένα προς ένα δείγμα ανά παράμετρο ή για ένα προς ένα δείγμα με ταυτόχρονη σύγκριση παραμέτρων, χρησιμοποιούνται τεστ πολλαπλής σύγκρισης, Pearson και two-way ANOVA.

Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μας με την αντίστοιχη βιβλιογραφία ή αντίστοιχα αποτελέσματα σε όλο το γένωμα, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση με τη βοήθεια του UCSC Genome Browser ([genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu)), της βάσης δεδομένων ENCODE και του GEO2 analyser (Gene Expression Omnibus) από τη βάση δεδομένων NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>). Με τον τρόπο αυτό, έγινε αντιπαραβολή των αποτελεσμάτων του προτύπου μεθυλίωσης για το γονίδιο *GNAS* με τα αντίστοιχα



σημεία μεθυλιωτικών αλλαγών σε όλο το γονιδίωμα και σε αντίστοιχες πειραματικές μελέτες οστεογένεσης από MSCs, για τον εντοπισμό σημαντικών σημείων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στην αναλυόμενη περιοχή.

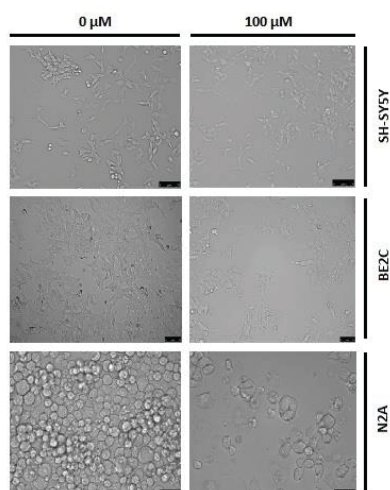


## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

#### 4.1 Επίδραση της δεξαμεθαζόνης στη μορφολογία, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των νευρικών κυττάρων

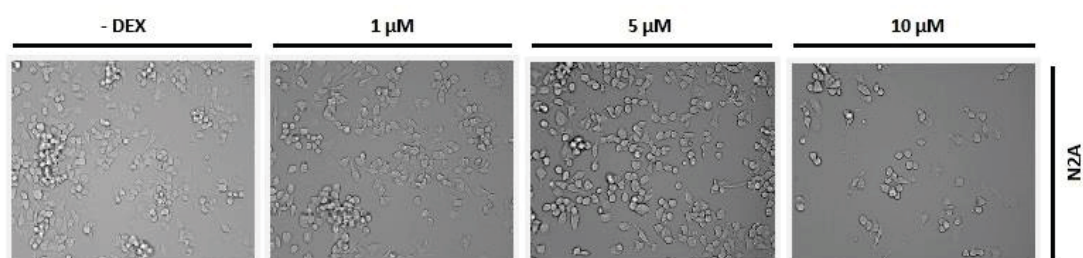
Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε επίπεδο κυτταροκαλλιέργειας σειρών νευροβλαστώματος υπό την επίδραση της ουσίας δεξαμεθαζόνης ως συνθετικό γλυκοκορτικοειδές. Τα αποτελέσματα διακρίνονται περαιτέρω σε φαινοτυπικά και μοριακά. Αρχικά παρουσιάζονται οι αλλαγές που επιφέρει το φάρμακο στη μορφολογία, το ρυθμό πολλαπλασιασμού ή/και διαφοροποίησης των κυττάρων. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται κάποια ενδεικτικά αποτελέσματα της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων GR και UBE3A σε επίπεδο mRNA και του ποσοτικού προσδιορισμού των μορίων p21 και p53 τα οποία ενέχονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, σε επίπεδο πρωτεΐνης. Επιπλέον, απεικονίζεται ενδεικτικά ο εντοπισμός των μορίων p21 και p53, καθώς και του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67, στο εσωτερικό των κυττάρων.

Αρχικά ελέγχθηκε η επίδραση ενός εύρους υψηλών συγκεντρώσεων του φαρμάκου (10, 50, 100μM) ως μια πρώτη προσπάθεια ανάδειξης της ενεργοποίησης του GR σε αυτές τις κυτταρικές σειρές. Τα κύτταρα SH-SY5Y δεν επηρεάζονται σημαντικά σε μορφολογικό επίπεδο, ενώ τα BE2C εμφανίζουν αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τα N2A έντονο κυτταρικό θάνατο στην υψηλότερη συγκέντρωση της ουσίας (Εικόνα 4.1.1).

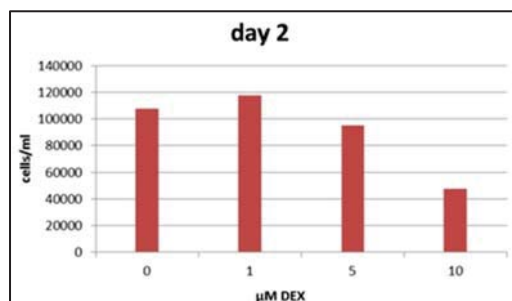


**Εικόνα 4.1.1:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες οπτικής μικροσκοπίας. Παρουσιάζεται η μορφολογική απόκριση των τριών κυτταρικών σειρών σε υψηλή συγκέντρωση δεξαμεθαζόνης (100 μM) ύστερα από έξι ημέρες καλλιέργειας με ανά δύο ημέρες ανανέωση του φαρμάκου.

Με βάση την πρώτη αυτή παρατήρηση, προχωρήσαμε στη μελέτη κάθε κυτταρικής σειράς ξεχωριστά, παρατηρώντας την απόκριση των νευροβλαστωματικών κυττάρων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης. Δεδομένου ότι η συνθήκη των 100  $\mu\text{M}$  αποδείχθηκε τοξική για τα N2A κύτταρα, προχωρήσαμε στην καλλιέργεια λιγότερων ημερών υπό την επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων της ουσίας (1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ). Ύστερα από επαναλαμβανόμενα πειράματα με τις παραπάνω συνθήκες, διαπιστώσαμε ότι η χορήγηση 10  $\mu\text{M}$  δεξαμεθαζόνης οδήγησε σε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μετά από δύο ημέρες καλλιέργειας (Εικόνα 4.1.2).



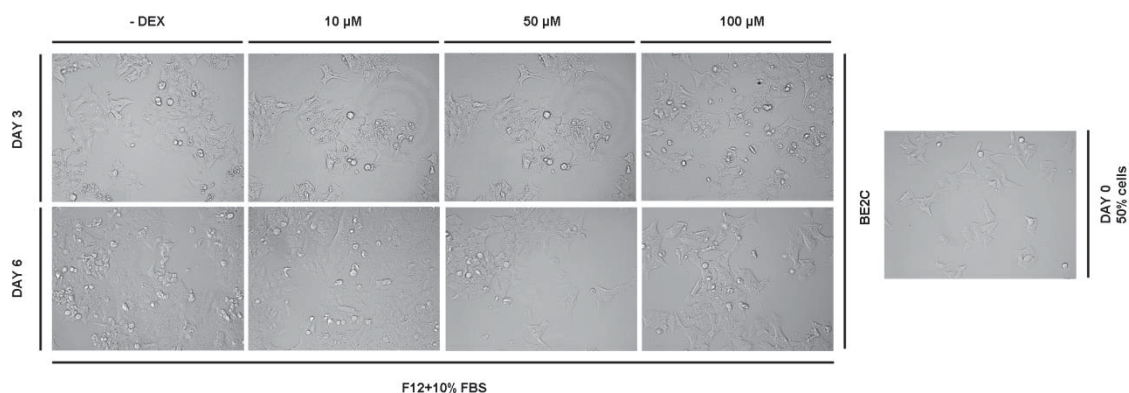
**Εικόνα 4.1.2:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες οπτικής μικροσκοπίας όπου φαίνεται η μορφολογική απόκριση των κυττάρων N2A. Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν σε συνθήκες χαμηλών συγκεντρώσεων δεξαμεθαζόνης (1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) ύστερα από δύο ημέρες καλλιέργειας.



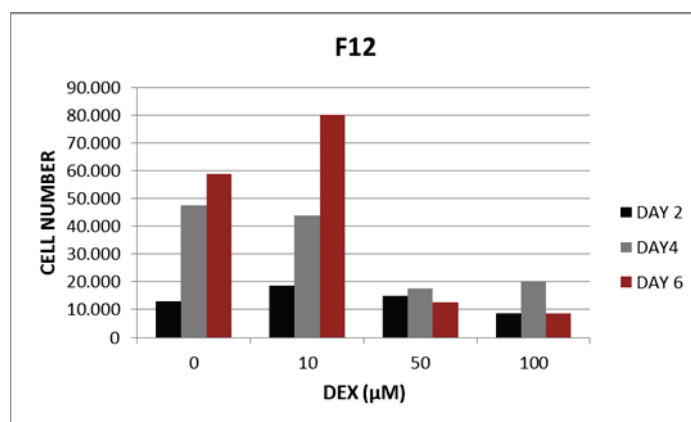
**Εικόνα 4.1.3:** Γραφική παράσταση καταμέτρησης αριθμού κυττάρων σε όλες τις συνθήκες την δεύτερη ημέρα του πειράματος. Μετά από δύο ημέρες χορήγησης 10  $\mu\text{M}$  δεξαμεθαζόνης εμφανίζεται το φαινόμενο αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Βασει της ίδιας λογικής μελετήθηκε η επίδραση ενδιάμεσων συγκεντρώσεων δεξαμεθαζόνης της τάξεως των 100  $\mu\text{M}$  στην κυτταρική σειρά BE2C, εφόσον τα κύτταρα αυτά αποκρίθηκαν στην αρχική συνθήκη (Εικόνα 4.1.4). Επιπλέον, διερευνήθηκε η μορφολογία των κυττάρων παρουσία του παράγοντα B27 ταυτόχρονα με τη χορήγηση δεξαμεθαζόνης (Εικόνα 4.1.6). Μετά από τρεις ημέρες καλλιέργειας παρατηρήσαμε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού υπό την επίδραση 50 και 100  $\mu\text{M}$

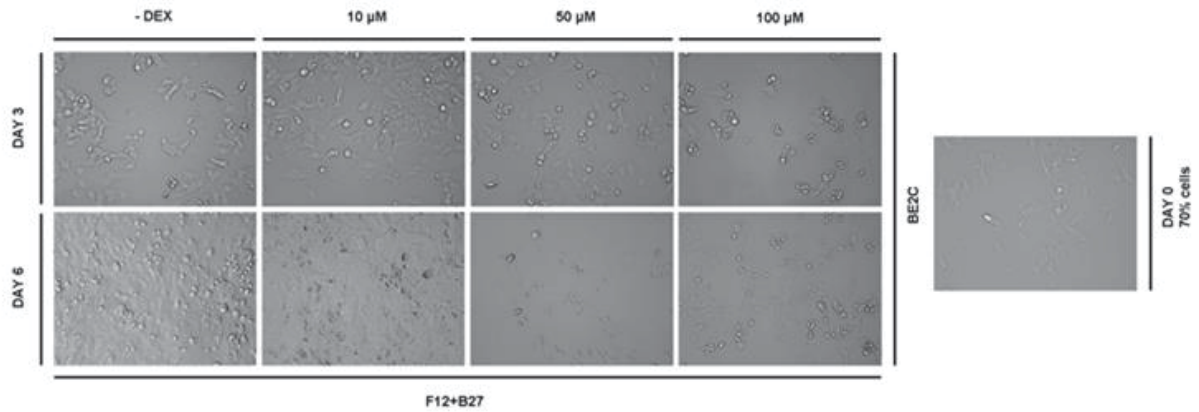
δεξαμεθαζόνης, φαινόμενο που παρατηρήθηκε ακόμα πιο έντονα παρουσία του παράγοντα B27.



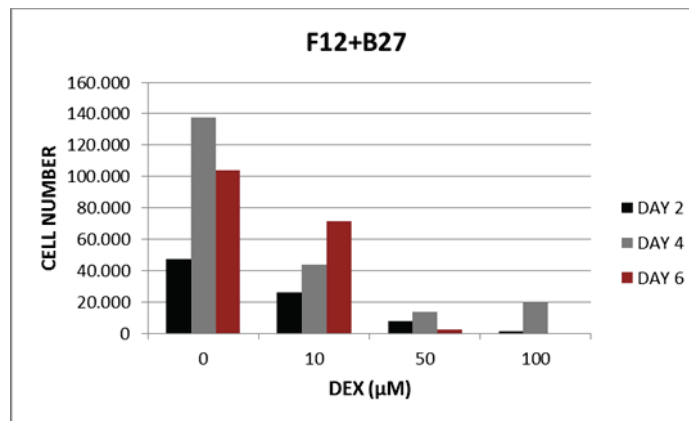
**Εικόνα 4.1.4:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες οπτικής μικροσκοπίας όπου φαίνεται η μορφολογική απόκριση των κυττάρων BE2C. Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν σε συνθήκες επίδρασης δεξαμεθαζόνης (10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) ύστερα από τρεις ημέρες καλλιέργειας σε τυπικό θρεπτικό μέσο πολλαπλασιασμού. Κατά την έναρξη του πειράματος τα κύτταρα βρίσκονταν σε πληρότητα 50%.



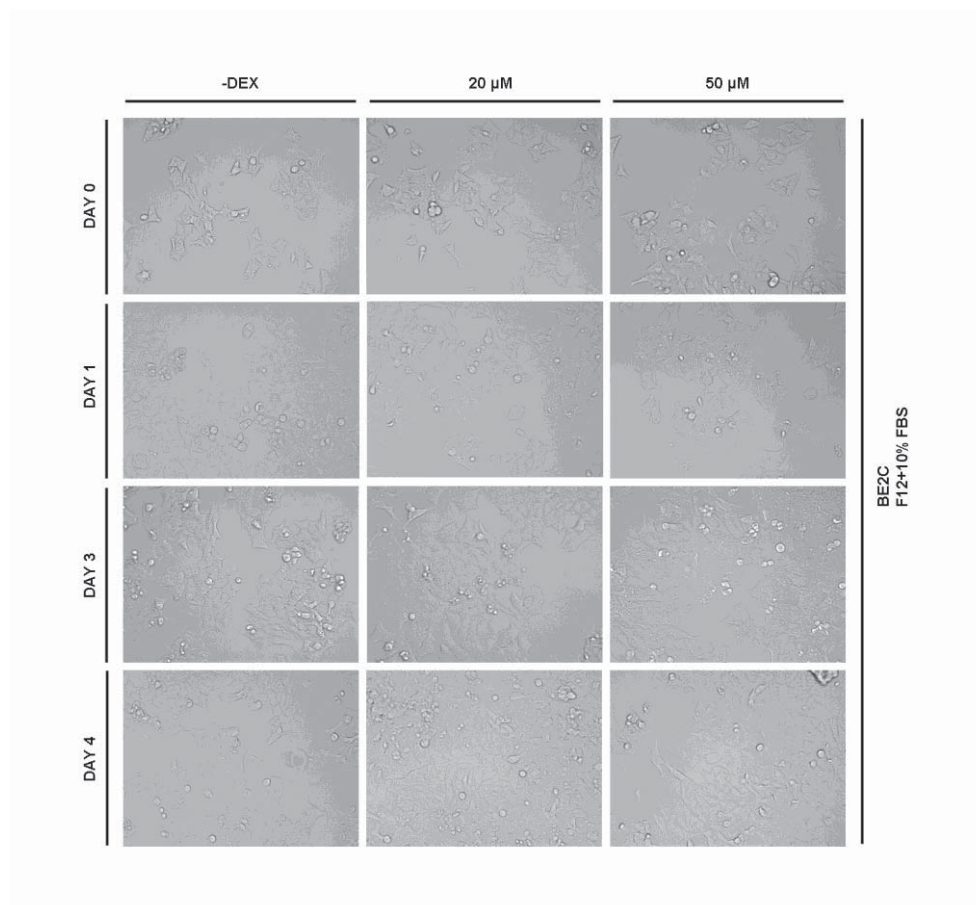
**Εικόνα 4.1.5:** Γραφική παράσταση καταμέτρησης αριθμού κυττάρων σε όλες τις συνθήκες του πειράματος. Την 6<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας σε τυπικό μέσο πολλαπλασιασμού (F12) είναι εμφανές το φαινόμενο αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις συνθήκες των 50  $\mu\text{M}$  και 100  $\mu\text{M}$  δεξαμεθαζόνης.



**Εικόνα 4.1.6:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες οπτικής μικροσκοπίας όπου φαίνεται η μορφολογική απόκριση των κυττάρων BE2C. Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν σε συνθήκες επίδρασης δεξαμεθαζόνης (10, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) παρουσία του παράγοντα B27 ύστερα από τρεις ημέρες καλλιέργειας. Κατά την έναρξη του πειράματος τα κύτταρα βρίσκονταν σε πληρότητα 70%.



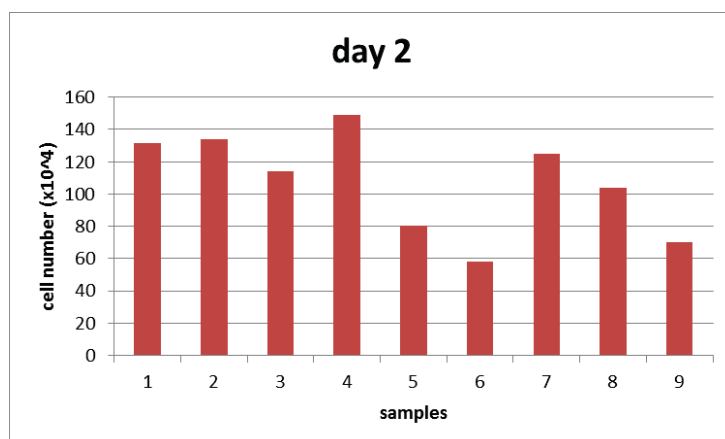
**Εικόνα 4.1.7:** Γραφική παράσταση καταμέτρησης αριθμού κυττάρων σε όλες τις συνθήκες του πειράματος. Την 6η ημέρα καλλιέργειας σε τυπικό μέσο πολλαπλασιασμού (F12+B12) είναι εμφανές το φαινόμενο αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στις συνθήκες των 50  $\mu\text{M}$  και 100  $\mu\text{M}$  δεξαμεθαζόνης.



**Εικόνα 4.1.8:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες οπτικής μικροσκοπίας όπου φαίνεται η μορφολογική εξέλιξη των κυττάρων BE2C. Οι φωτογραφίες αντιστοιχούν σε μία, τρεις και τέσσερις ημέρες καλλιέργειας υπό την επίδραση ενδιάμεσων συγκεντρώσεων δεξαμεθαζόνης (20, 50  $\mu$ M) σε τυπικές συνθήκες θρεπτικού μέσου.

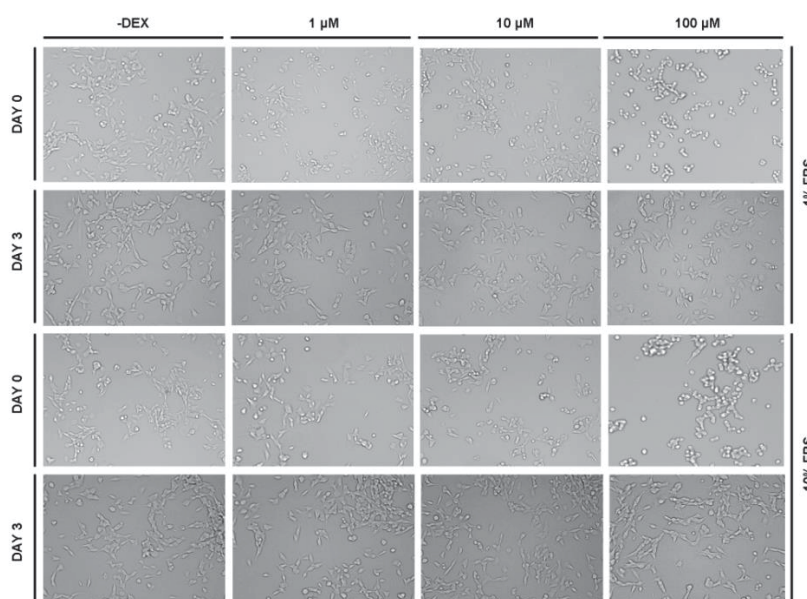
Η κυτταρική σειρά SH-SY5Y δεν αποκρίθηκε σημαντικά κατά την πρώτη δοκιμή ελέγχου της ουσίας. Το γεγονός αυτό μας οδήγησε στη διερεύνηση της απόκρισης των κυττάρων κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Αρχικά ελέγξαμε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων για διάστημα δύο ημερών υπό την επίδραση εύρους συγκεντρώσεων δεξαμεθαζόνης με σκοπό να επικεντρωθούμε στις πιο λειτουργικές συνθήκες (Εικόνα 4.1.9).



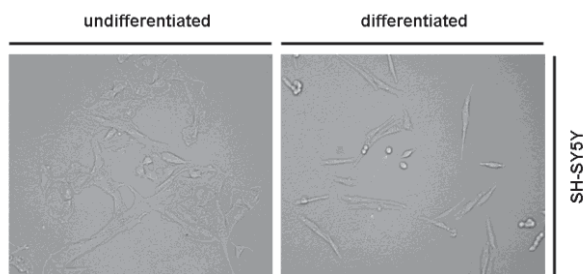


**Εικόνα 4.1.9:** Γραφική παράσταση καταμέτρησης αριθμού κυττάρων σε όλες τις συνθήκες τη δεύτερη ημέρα του πειράματος. Τα δείγματα αντιστοιχούν αριθμητικά στις διαφορετικές συγκεντρώσεις δεξαμεθαζόνης: 1=0, 2=0.5μM, 3=1μM, 4=2μM, 5=4μM, 6=8μM, 7=16μM, 8=32μM, 9=64μM.

Ακολούθως, μελετήθηκε μορφολογικά η επίδραση συγκεντρώσεων της ουσίας (1, 10, 100 μM) σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας, καθώς επίσης και σε συνθήκες χαμηλής περιεκτικότητας του θρεπτικού μέσου σε ορό. Μετά από τρεις ημέρες τα κύτταρα δεν έδειξαν σημαντική απόκριση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού αλλά μία μικρή αλλαγή στη μορφολογία τους. Σε συνθήκες χαμηλού ποσοστού ορού στο θρεπτικό μέσο (1% FBS) και υψηλής συγκέντρωσης δεξαμεθαζόνης (100 μM) παρατηρούμε μορφολογία έναρξης διαφοροποίησης των κυττάρων νευροβλαστώματος προς νευρικά κύτταρα (Εικόνα 4.1.10).

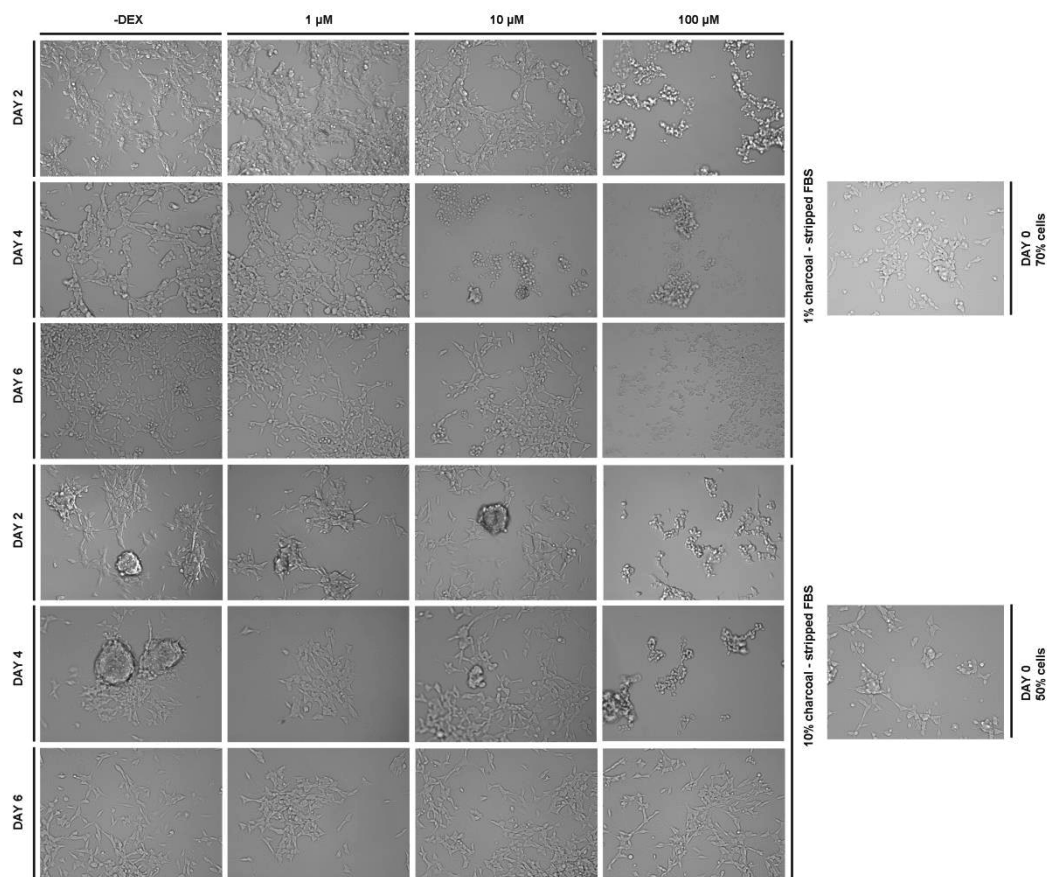


**Εικόνα 4.1.10:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες οπτικού μικροσκοπίου στις οποίες παρουσιάζεται η μορφολογία των κυττάρων SH-SY5Y στις διαφορετικές συνθήκες του πειράματος. Ο φαινότυπος των κυττάρων σε συνθήκες χαμηλού ποσοστού ορού και υψηλής συγκέντρωσης δεξαμεθαζόνης παραπέμπει στην έναρξη διαφοροποίησης.



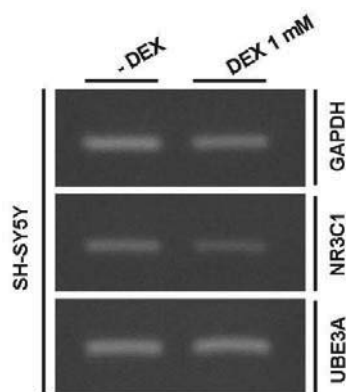
**Εικόνα 4.1.11:** Χαρακτηριστική μορφολογία μη διαφοροποιημένων και διαφοροποιημένων κυττάρων SH-SY5Y κατά την παρατήρηση με οπτική μικροσκοπία. Κατά τη διαφοροποίηση προς νευρικά κύτταρα χάνουν την πεπλατυσμένη μορφή τους και τη δημιουργία νευριτών αποκτώντας μια ραβδοειδή εικόνα με κατ' επέκταση δημιουργία σφαιριδίων.

Μια επιπλέον προσπάθεια αποτέλεσε η μελέτη της επίδρασης των ίδιων συγκεντρώσεων της ουσίας σε συνθήκες χαμηλού και υψηλού ποσοστού ορού απουσία στεροειδών. Στις συνθήκες αυτές παρατηρείται η δημιουργία συστάδων με τη μορφή χαρακτηριστικών σφαιρών στο ταπήτιο. Ο φαινότυπος αυτός αποτελεί ένδειξη ενεργοποίησης της πορείας διαφοροποίησης προς νευρικά κύτταρα μετά από δύο και τέσσερις ημέρες καλλιέργειας (Εικόνα 4.1.12).



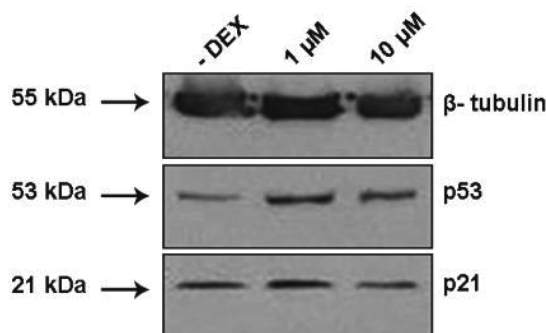
**Εικόνα 4.1.12:** Αντιπροσωπευτικές εικόνες οπτικού μικροσκοπίου στις οποίες παρουσιάζεται ο φαινότυπος των κυττάρων SH-SY5Y στις διαφορετικές συνθήκες του πειράματος. Η μορφολογία των κυττάρων σε συνθήκες καλλιέργειας απουσία στεροειδών παραπέμπει στην έναρξη διαφοροποίησης. Κατά την έναρξη του πειράματος τα κύτταρα βρίσκονται σε πληρότητα 70% και 50% για τις συνθήκες χαμηλού και υψηλού ποσοστού ορού αντίστοιχα.

Δεδομένου ότι η δεξαμεθαζόνη σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 100 μM δεν οδήγησε σε σημαντικές αλλαγές στη μορφολογία των κυττάρων SH-SY5Y, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε καλλιέργεια υπό την επίδραση ακραίας συγκέντρωσης δεξαμεθαζόνης (1 mM) για τον έλεγχο του ορίου αντοχής τους και δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή μορφολογικά. Παρόλα αυτά, μοριακά παρατηρήθηκε επαναλήψιμη μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *NR3C1* (GR) και αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *UBE3A* (Εικόνα 4.1.13).

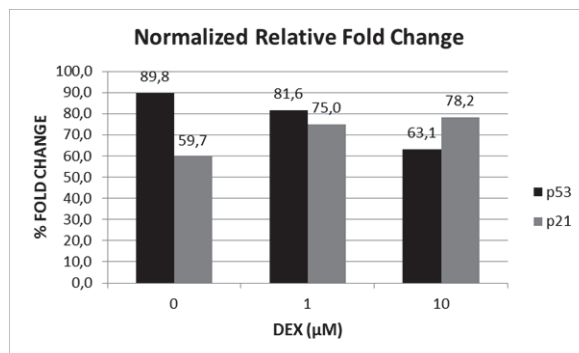


**Εικόνα 4.1.13:** Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον έλεγχο της έκφρασης των μορίων GR και UBE3A. Η ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *UBE3A* και *NR3C1* (GR) σε κύτταρα SH-SY5Y ύστερα από την επίδραση της υψηλότερης επιτρεπτής συγκέντρωσης δεξαμεθαζόνης (1 mM) έδειξε ότι το φάρμακο ενεργοποιεί τον GR αλλά και έναν από τους παράγοντες ρύθμισης της μεταγραφής του μορίου αυτού.

Προχωρώντας στα μοριακά πειράματα αυτής της ενότητας, παρατίθενται τα αποτελέσματα της διερεύνησης της πρωτεϊνικής έκφρασης των μορίων p21 και p53 ως δείκτες ενεργοποίησης του GR κατά τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ο έλεγχος της έκφρασης σε επίπεδο πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε μετά από δύο ημέρες καλλιέργειας των κυττάρων N2A υπό την επίδραση χαμηλών συγκεντρώσεων δεξαμεθαζόνης (1, 10  $\mu$ M). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης p21 δεν μεταβάλλονται σημαντικά, ωστόσο και στις δύο συνθήκες χορήγησης της ουσίας η πρωτεΐνη p53 έχει αντίθετη απόκριση με τα επίπεδά της να αυξάνουν με τη χορήγηση της ουσίας (Εικόνα 4.1.14), γεγονός που είναι σε συμφωνία με την παρατηρούμενη αναστολή του κυτταρικού κύκλου.

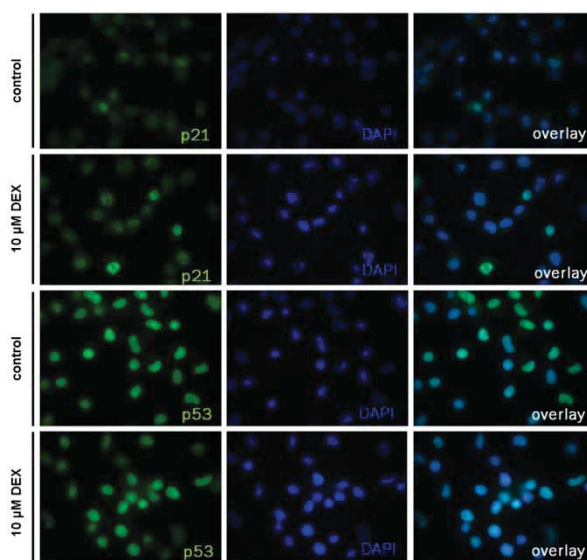


**Εικόνα 4.1.14:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο έκφρασης δεικτών λειτουργίας του κυτταρικού κύκλου. Σύγκριση των επιπέδων των πρωτεϊνών p21 και p53 κατά την ενεργοποίηση του GR στα κύτταρα N2A μετά από δύο ημέρες χορήγησης χαμηλών δόσεων δεξαμεθαζόνης. Για τον έλεγχο ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ - τουμπουλίνη.



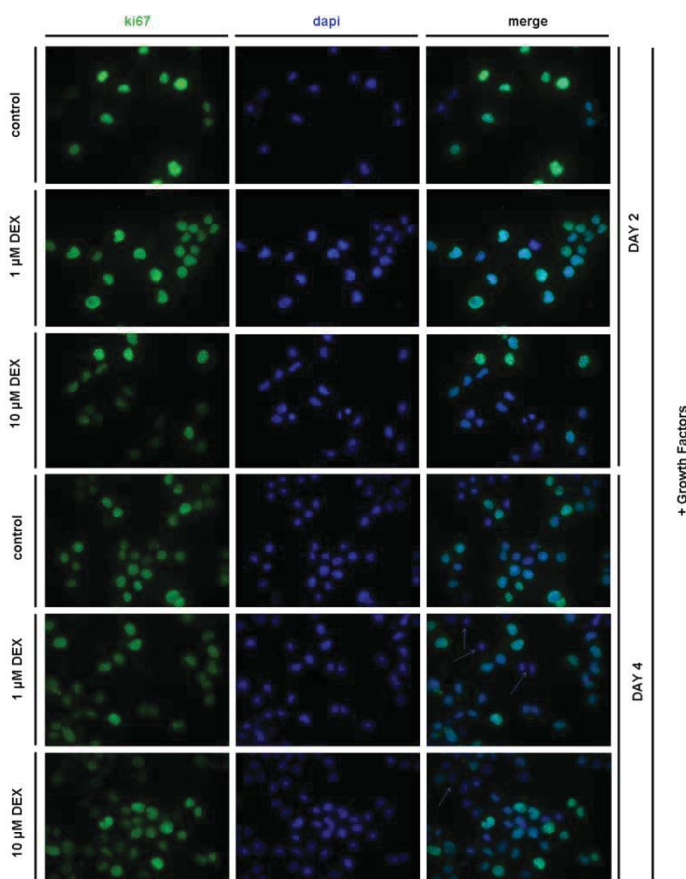
**Εικόνα 4.1.15:** Γραφική παράσταση ποσοτικοποίησης της έκφρασης των πρωτεϊνών p53 και p21. Οι τιμές αναφέρονται σε ποσοστά επί τοις εκατό κατά τον υπολογισμό της πυκνότητας των ζωνών ηλεκτροφόρησης σε σύγκριση με τις τιμές αναφοράς της β- τουμπουλίνης. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρόγραμμα imagej.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια επιβεβαίωσης του παραπάνω αποτελέσματος σε επίπεδο πρωτεϊνικής ρύθμισης με την ανίχνευση της κατανομής των μορίων p21 και p53 στο εσωτερικό των κυττάρων. Παρατηρούμε ότι η ενεργοποίηση του GR κατά τη χορήγηση δεξαμεθαζόνης οδηγεί σε ενεργοποίηση μορίων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 4.1.16).



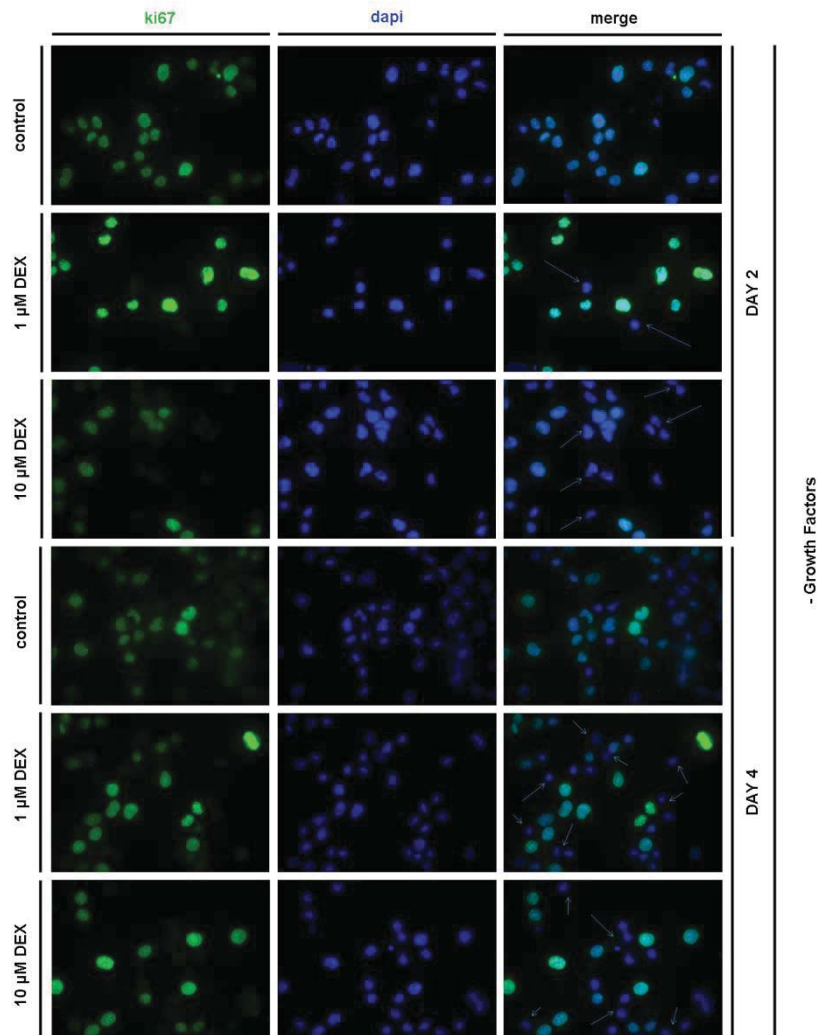
**Εικόνα 4.1.16:** Ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση της έκφρασης και κατανομής πρωτεϊνών-ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος των πρωτεϊνών p21 και p53 σε κύτταρα N2A σε απόκριση του υποδοχέα GR στη δεξαμεθαζόνη. Η επεξεργασία των κυττάρων με τα αντίστοιχα αντισώματα πραγματοποιήθηκε μετά από δύο ημέρες καλλιέργειας με 10 μM DEX.

Βασιζόμενοι στο παραπάνω αποτέλεσμα οδηγηθήκαμε σε μια προσπάθεια διερεύνησης της κατανομής των μορίων ki67, p53 και p21 σε μια μη καρκινική σειρά νευρικής προέλευσης (HCN) μετά από την επίδραση χαμηλών δόσεων δεξαμεθαζόνης (1, 10  $\mu\text{M}$ ) σε συνθήκες καλλιέργειας παρουσία και απουσία αυξητικών παραγόντων. Διαπιστώσαμε ότι παρουσία αυξητικών παραγόντων το ki67 εντοπίζεται σχεδόν εξ' ολοκλήρου στον πυρήνα την 2<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος ενώ την 4<sup>η</sup> ημέρα εντοπίζονται ορισμένα Ki67 κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν το μόριο στον πυρήνα τους, ένα χαρακτηριστικό που παρατηρείται σε κύτταρα τα οποία εξέρχονται του κυτταρικού κύκλου (Εικόνα 4.1.17).



**Εικόνα 4.1.17:** Άνοσοφθορισμός για την ανίχνευση της έκφρασης και κατανομής της πρωτεΐνης ki67 παρουσία αυξητικών παραγόντων. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος κατανομής του μορίου σε κύτταρα HCN σε απόκριση στη δεξαμεθαζόνη μετά από καλλιέργεια παρουσία αυξητικών παραγόντων. Η επεξεργασία των κυττάρων με το αντίσωμα πραγματοποιήθηκε μετά από δύο και τέσσερις ημέρες χορήγησης 1  $\mu\text{M}$  και 10  $\mu\text{M}$  της ουσίας.

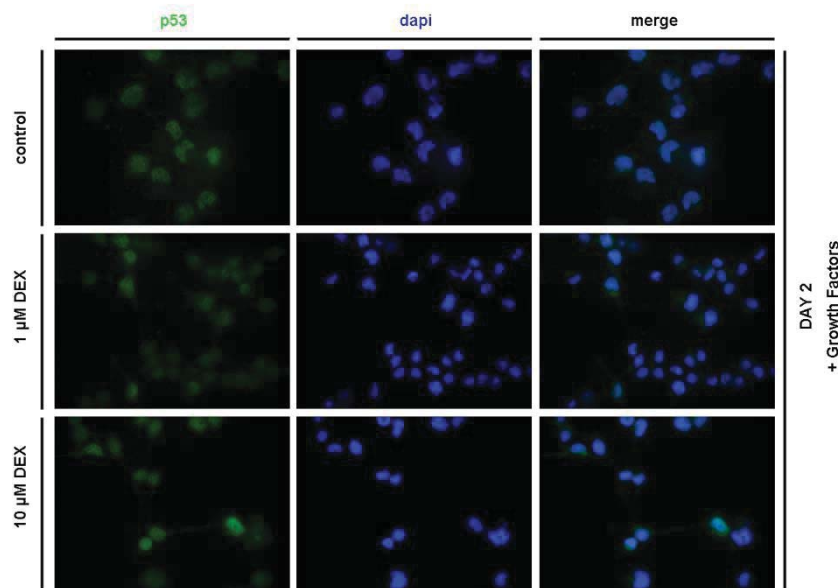
Αντίστοιχα, η καλλιέργεια των κυττάρων απουσία αυξητικών παραγόντων οδήγησε σε διαφορετική κατανομή του μορίου ki67. Πιο συγκεκριμένα, η καταμέτρηση Ki67 κυττάρων αυξάνεται αναλογικά με τη συγκέντρωση δεξαμεθαζόνης και τη διάρκεια του πειράματος (Εικόνα 4.1.18).



**Εικόνα 4.1.18:** Ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση της έκφρασης και κατανομής της πρωτεΐνης ki67 απουσία αυξητικών παραγόντων. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος κατανομής του μορίου σε κύτταρα HCN σε απόκριση στη δεξαμεθαζόνη μετά από καλλιέργεια απουσία αυξητικών παραγόντων. Η επεξεργασία των κυττάρων με το αντίσωμα πραγματοποιήθηκε μετά από δύο και τέσσερις ημέρες χορήγησης 1 μM και 10 μM της ουσίας.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μελέτη για την ανίχνευση της κατανομής πρωτεϊνών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας. Η

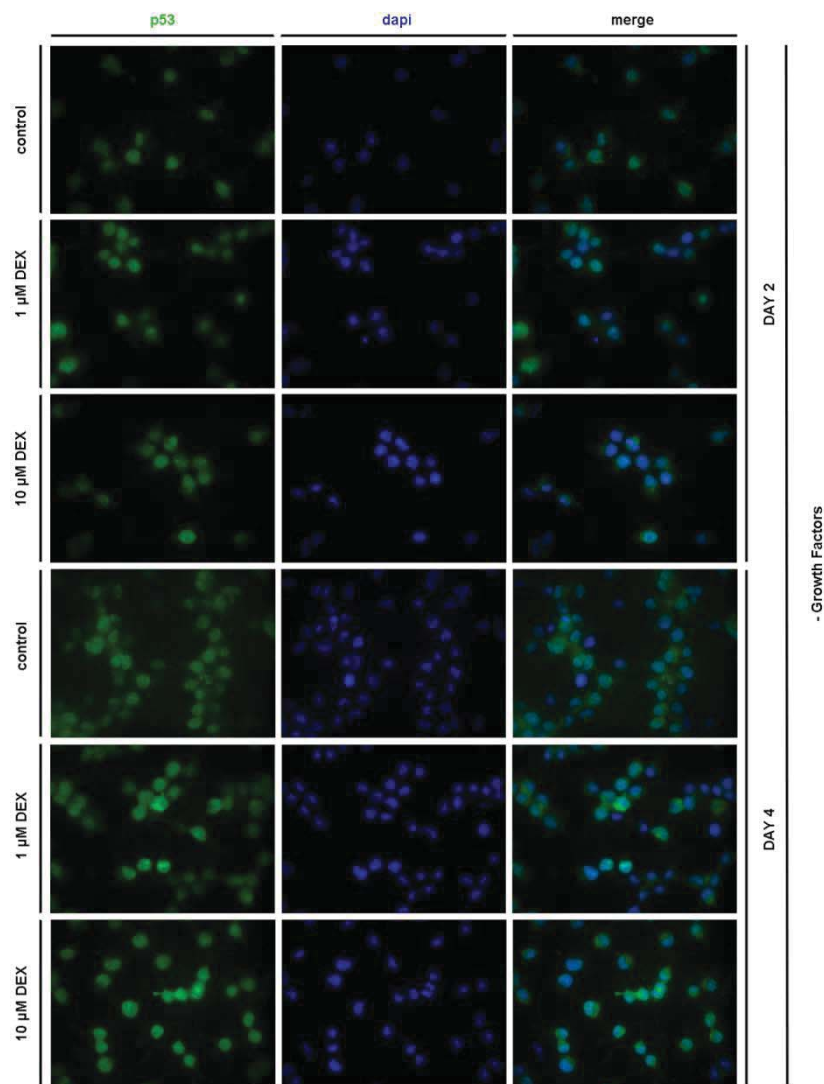
πρωτεΐνη p53 εντοπίζεται στον πυρήνα και η έκφρασή της αυξάνει αναλογικά με τη δεξαμεθαζόνη τόσο παρουσία όσο και απουσία αυξητικών παραγόντων (Εικόνα 4.1.19).



**Εικόνα 4.1.19: Ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση της έκφρασης και κατανομής της πρωτεΐνης p53 παρουσία αυξητικών παραγόντων.** Πραγματοποιήθηκε έλεγχος κατανομής του μορίου σε κύτταρα HCN σε απόκριση στη δεξαμεθαζόνη μετά από καλλιέργεια παρουσία αυξητικών παραγόντων. Η επεξεργασία των κυττάρων με το αντίσωμα πραγματοποιήθηκε μετά από δύο ημέρες χορήγησης 1  $\mu\text{M}$  και 10  $\mu\text{M}$  της ουσίας. Ο φθορισμός αυξάνει ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης δεξαμεθαζόνης.

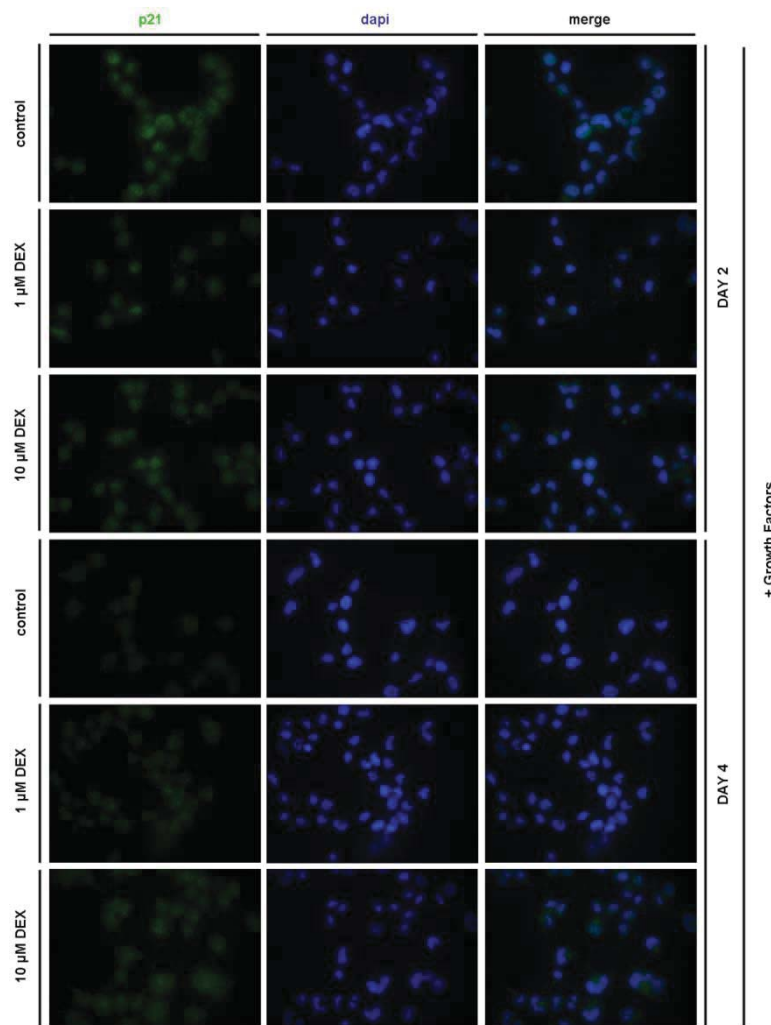
Αντίστοιχα, απουσία αυξητικών παραγόντων στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας η έκφραση της πρωτεΐνης αυξάνει ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης δεξαμεθαζόνης και τη χρονική διάρκεια της επίδρασης του φαρμάκου. Η p53 μετατοπίζεται όλο και περισσότερο από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα με το πέρας του χρόνου δράσης του φαρμάκου (Εικόνα 4.1.20).



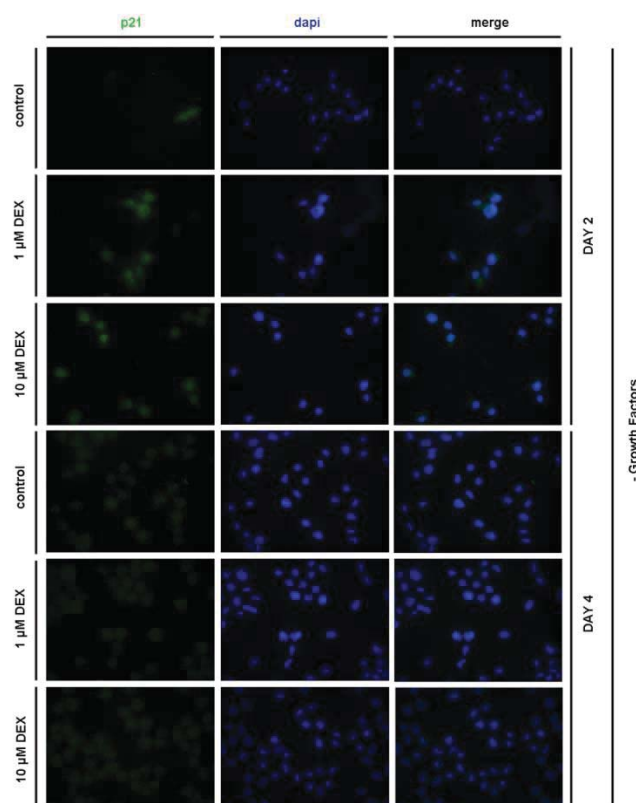


**Εικόνα 4.1.20: Ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση της έκφρασης και κατανομής της πρωτεΐνης p53 απουσία αυξητικών παραγόντων.** Πραγματοποιήθηκε έλεγχος κατανομής του μορίου σε κύτταρα HCN σε απόκριση στη δεξαμεθαζόνη μετά από καλλιέργεια απουσία αυξητικών παραγόντων. Η επεξεργασία των κυττάρων με το αντίσωμα πραγματοποιήθηκε μετά από δύο και τέσσερις ημέρες χορήγησης 1 μM και 10 μM της ουσίας. Ο φθορισμός αυξάνει ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης δεξαμεθαζόνης και τη χρονική διάρκεια της επίδρασης του φαρμάκου. Η p53 μετατοπίζεται όλο και περισσότερο από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα με τη δράση της δεξαμεθαζόνης.

Τέλος, διερευνήθηκε η κατανομή της πρωτεΐνης p21 κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες και παρατηρήθηκε ότι το μόριο εντοπίζεται στον πυρήνα σε όλες τις συνθήκες παρουσία και απουσία αυξητικών παραγόντων. Παρόλα αυτά, παρουσία αυξητικών παραγόντων η έκφραση της πρωτεΐνης αυξάνεται αναλογικά με τη συγκέντρωση της δεξαμεθαζόνης και τη διάρκεια δράσης αυτής (Εικόνα 4.1.21).



**Εικόνα 4.1.21: Ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση της έκφρασης και κατανομής της πρωτεΐνης p21 παρουσία αυξητικών παραγόντων.** Πραγματοποιήθηκε έλεγχος κατανομής του μορίου σε κύτταρα HCN σε απόκριση στη δεξαμεθαζόνη μετά από καλλιέργεια παρουσία αυξητικών παραγόντων. Η επεξεργασία των κυττάρων με το αντίσωμα πραγματοποιήθηκε μετά από δύο και τέσσερις ημέρες χορήγησης 1 μM και 10 μM της ουσίας. Ο φθορισμός αυξάνει ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης δεξαμεθαζόνης και τη χρονική διάρκεια της επίδρασης του φαρμάκου.



**Εικόνα 4.1.22: Ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση της έκφρασης και κατανομής της πρωτεΐνης p21 απουσία αυξητικών παραγόντων.** Πραγματοποιήθηκε έλεγχος κατανομής του μορίου σε κύτταρα HCN σε απόκριση στη δεξαμεθαζόνη μετά από καλλιέργεια απουσία αυξητικών παραγόντων. Η επεξεργασία των κυττάρων με το αντίσωμα πραγματοποιήθηκε μετά από δύο και τέσσερις ημέρες χορήγησης 1 μM και 10 μM της ουσίας. Ασθενής φθορισμός με κατά τόπους «στίγματα» χρώσης.

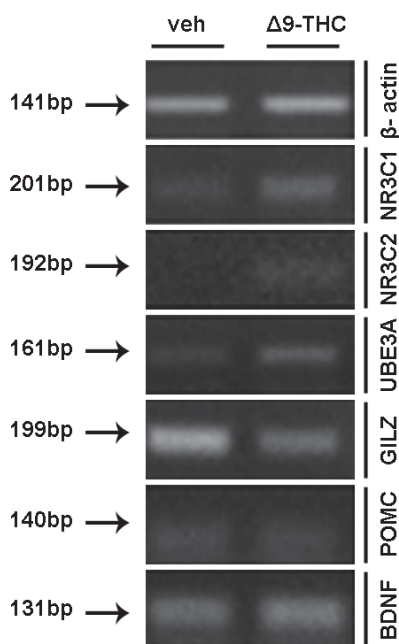
## 4.2 Εγκέφαλος, σύστημα ενδοκανναβινοειδών και άξονας HPA

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μοριακών πειραμάτων ελέγχου έκφρασης μορίων που συμμετέχουν με άμεσο ή έμμεσο τρόπο στη ρύθμιση του άξονα HPA κατά την απόκριση του οργανισμού σε σταθερά αυξανόμενες συγκεντρώσεις συνθετικών κανναβινοειδών. Συγκεκριμένα, τα μοριακά αποτελέσματα ισχυροποίησαν προηγούμενα αποτελέσματα συμπεριφορικών δοκιμασιών που πραγματοποιήθηκαν στα ζώα που υπεβλήθησαν στο πρωτόκολλο χορήγησης Δ<sub>9</sub>-THC. Η επιλογή ανάλυσης της δομής του ιππόκαμπου βασίζεται στον απεικονιστικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε για τον εντοπισμό του υποδοχέα ενδοκανναβινοειδών CB1 σε τομές εγκεφάλου μυών (Εικόνα 4.2.1).



**Εικόνα 4.2.1:** *In situ* υβριδοποίηση για τον εντοπισμό του υποδοχέα CB1. Εντοπίζεται σημαντικά στην ιπποκάμπεια περιοχή.

Ο συγκριτικός έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων *Nr3c1*, *Nr3c2*, *Ube3a*, *Gilz*, *Pomc* και *Bdnf* έδειξε ότι η επίδραση του φαρμάκου οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του GR, MR και UBE3A, ενώ αντίθετα προκαλεί μια σχετική ελάττωση στην έκφραση των μορίων GILZ και POMC. Ο BDNF δεν φαίνεται να επηρεάζεται σε επίπεδο mRNA.

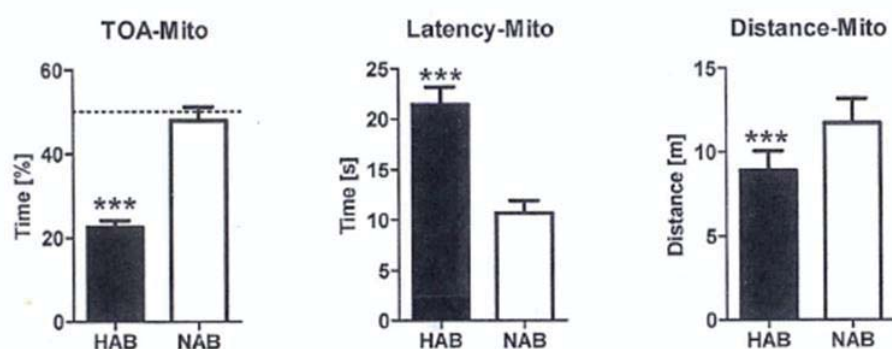


**Εικόνα 4.2.2:** Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τον έλεγχο της έκφρασης των μορίων του άξονα HPA. Επίπεδα έκφρασης mRNA των μορίων που συμμετέχουν στον άξονα του στρες στον ιππόκαμπο επίμυων μετά τη λήψη Δ<sub>9</sub>-THC συγκριτικά με δείγματα μαρτύρων (vehicle).

### 4.3 Στρες, εγκέφαλος, μιτοχόνδρια και υποδοχείς ασβεστίου

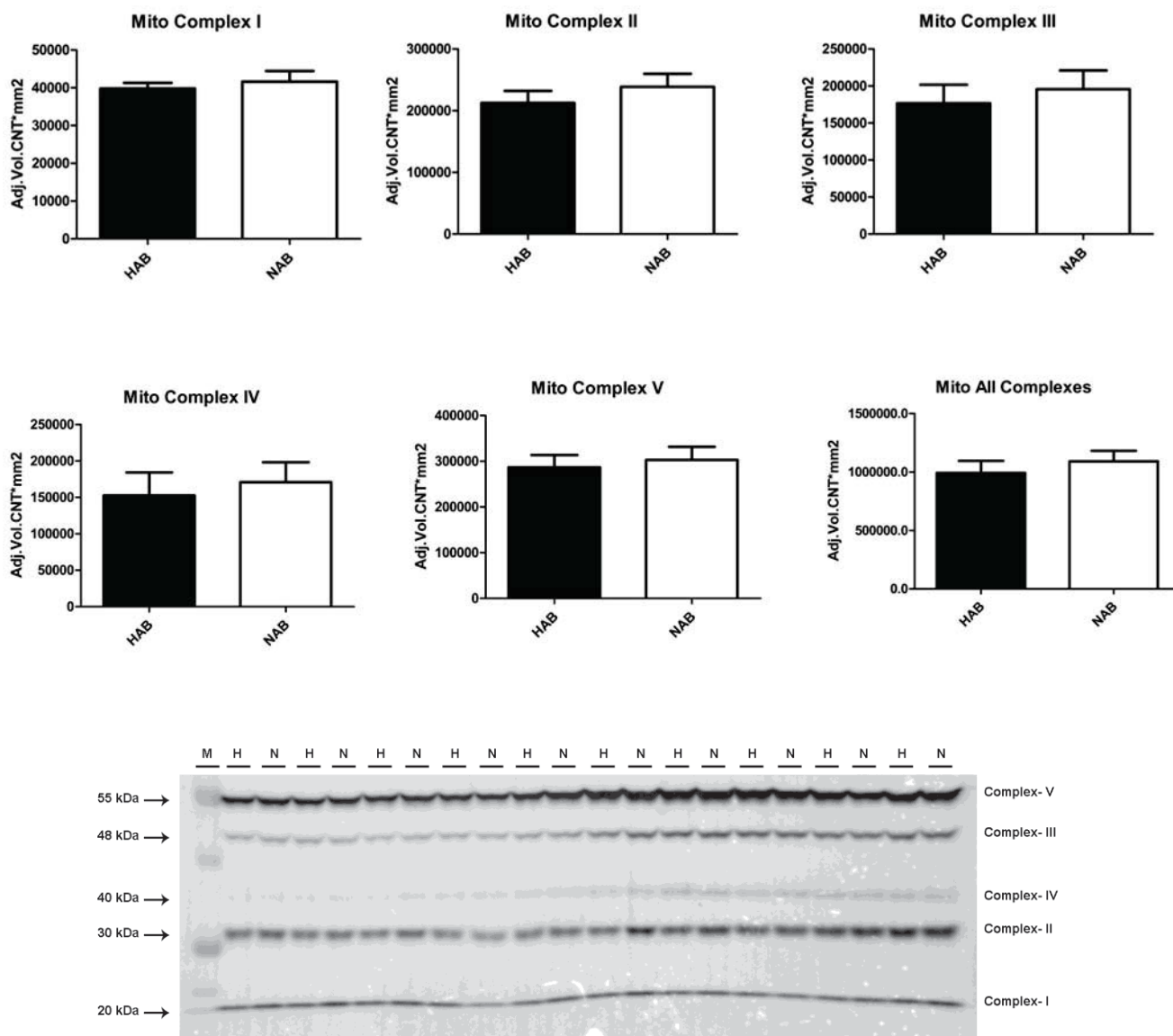
Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διενεργήθηκαν σε εγκεφάλους συμπεριφορικά χαρακτηρισμένων μύων. Η

κατηγοριοποίηση των πειραματόζων αφορά το βαθμό εκδήλωσης αγχογόνου συμπεριφοράς σε συμπεριφορικά τεστ και η ομαδοποίηση έγινε σε τρεις κατηγορίες (HAB-NAB-LAB). Για τη διερεύνηση του μιτοχονδριακού προφίλ έκφρασης πρωτεϊνών της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (σύμπλοκα I-V) καθώς και των υποδοχέων γλουταμινικού, NMDAR αλλά και δύο ακόμα πρωτεϊνών που συνδέονται στενά με τη λειτουργία των μιτοχονδρίων (Cytochrome C, SLC25A22), μελετήθηκαν 10 ζώα HAB και 10 NAB (Εικόνα 4.3.1).



**Εικόνα 4.3.1:** Διαχωρισμός των πειραματόζων με βάση την απόδοσή τους σε συμπεριφορικές δοκιμασίες. TOA (Time Open Arms)= χρόνος που διήνυσαν στους ανοιχτούς βραχίονες της κατασκευής του υπερυψωμένου σταυροειδούς λαβυρίνθου, Latency= χρόνος απραξίας/ ακινητοποίησης, Distance= συνολική απόσταση που διήνυσαν κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της δοκιμασίας. Τα παραπάνω διαγράμματα αντιστοιχούν στους μέσους όρους των τιμών μέτρησης των τριών παραμέτρων που συγκρίθηκαν με βάση το μη- παραμετρικό στατιστικό τεστ Mann- Whitney test (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

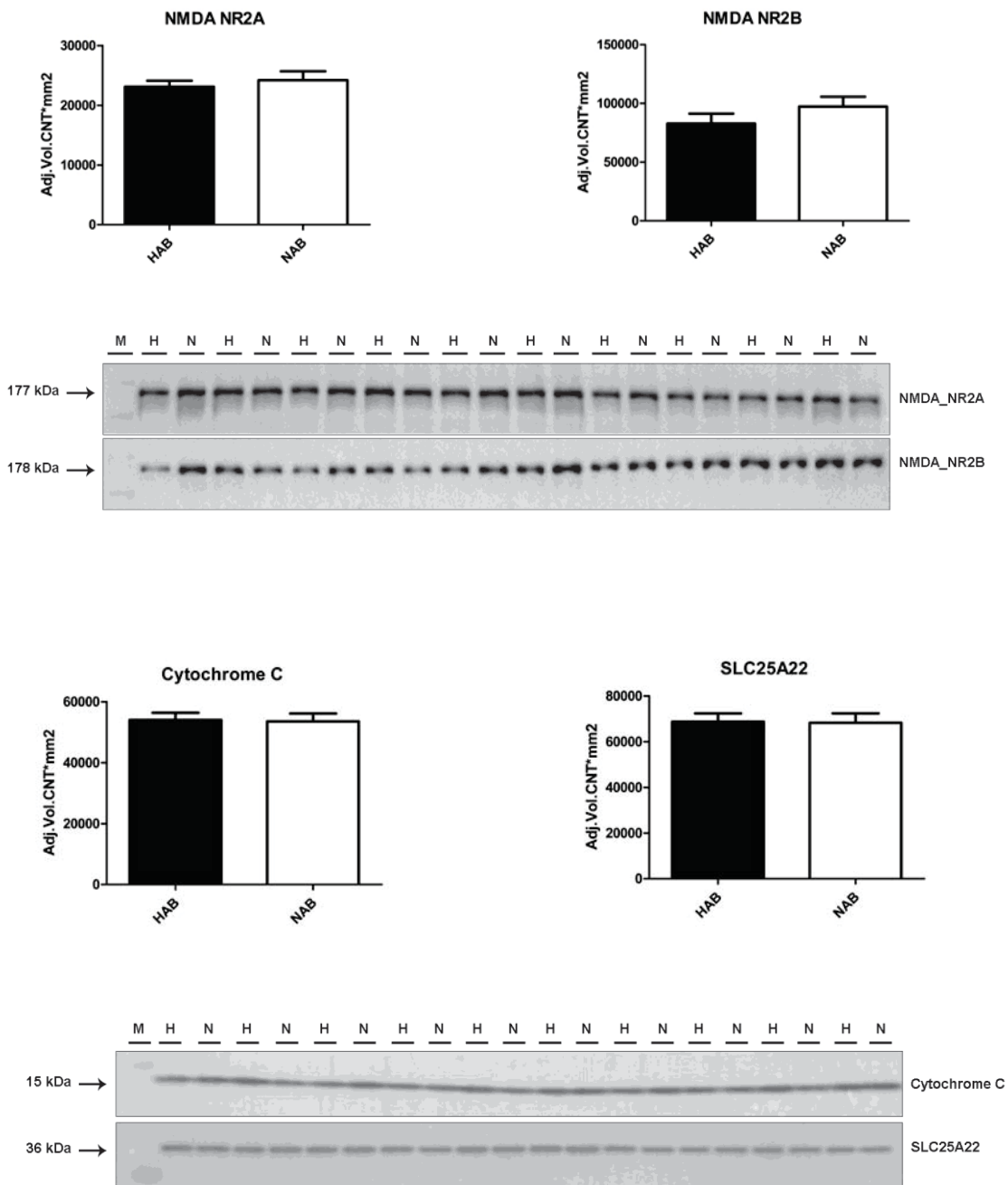
Από τα παραπάνω ζώα απομονώθηκε ο ιππόκαμπος ο οποίος ομογενοποιήθηκε και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με ανοσοαποτύπωση κατά Western για την ποσοτική σύγκριση των επιπέδων έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών μεταξύ των δύο ομάδων που αντιπροσωπεύουν τις διαφορετικές καταστάσεις άγχους. Η πρωτεϊνική ανάλυση για τα μιτοχονδριακά σύμπλοκα I-V δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών μεταξύ των δύο ομάδων όπως φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνα 4.3.2).



**Εικόνα 4.3.2: Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο έκφρασης μιτοχονδριακών πρωτεϊνών.**

Σύγκριση των ποσοτικοποιημένων επιπέδων των πρωτεϊνών (σύμπλοκα I, II, III, IV, V, I-V) μεταξύ των ομάδων HAB και NAB. Το στατιστικό τεστ που χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση του μέσου όρου των τιμών είναι το μη- παραμετρικό Mann- Whitney test και οι τιμές του άξονα Y αντιπροσωπεύουν την πυκνότητα των ζωνών της ηλεκτροφόρησης που μετρήθηκε με το ειδικό λογισμικό Quantity- One (BioRad). M= μάρτυρας, H= HAB, N= NAB.

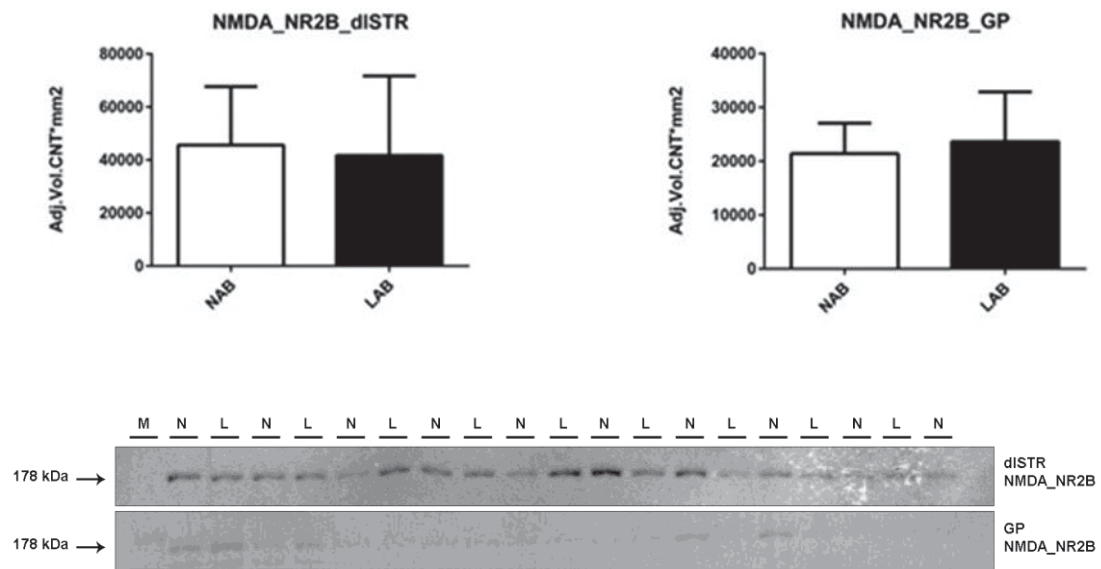
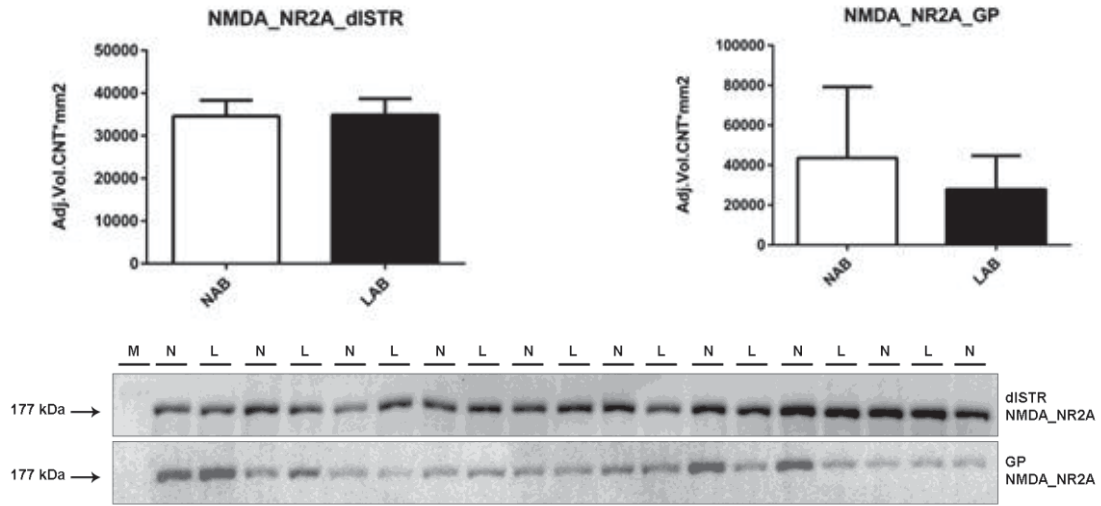
Τα αποτελέσματα για τα πρωτεϊνικά επίπεδα των NMDAR, SLC25A22 και κυτόχρωμα C ήταν επίσης ανάλογα. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών μεταξύ των δύο ομάδων σύγκρισης (Εικόνα 4.3.3).

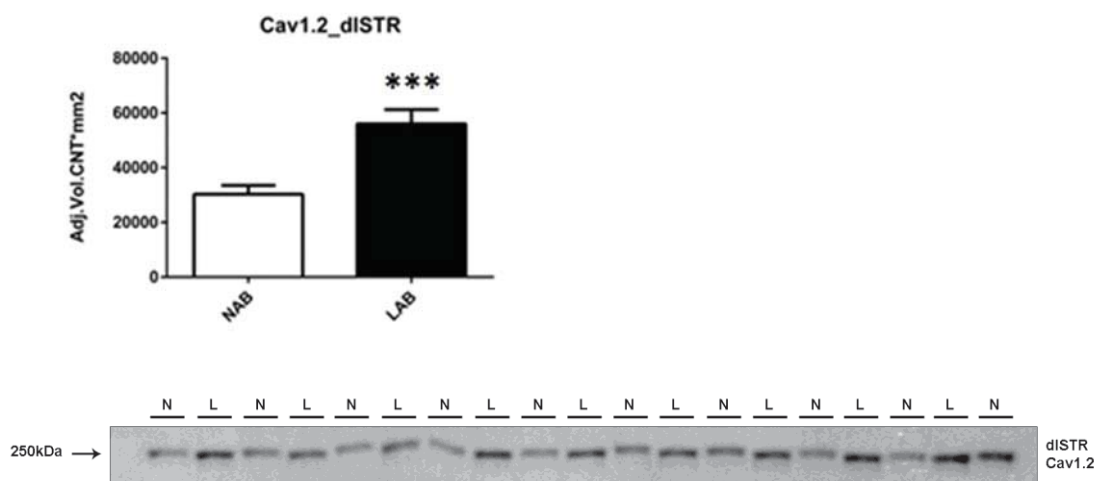


**Εικόνα 4.3.3:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο έκφρασης πρωτεϊνών του μιτοχondριακού προφίλ. Σύγκριση των ποσοτικοποιημένων επιπέδων των πρωτεϊνών (NMDA NR2A, NMDA NR2B, Cytochrome C, SLC25A22) μεταξύ των ομάδων HAB και NAB. Το στατιστικό τεστ που χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση του μέσου όρου των τιμών είναι το μη- παραμετρικό Mann-Whitney test και οι τιμές του άξονα Y αντιπροσωπεύουν την πυκνότητα των ζωνών της ηλεκτροφόρησης που μετρήθηκε με το ειδικό λογισμικό Quantity- One (BioRad). M= μάρτυρας, H= HAB, N= NAB.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μια αντίστοιχη σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων αντίθετης συμπεριφορικής απόκρισης (LAB- NAB) με στόχο τη διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα N-μεθυλο-D-ασπαρτικού οξέος (NMDAR) σε συνάρτηση με τα επίπεδα έκφρασης του τασεο- εξαρτώμενου διαύλου ασβεστίου τύπου L ( $Ca_v1.2$ ) που κωδικοποιείται από το γονίδιο *casna1c*. Για την παραπάνω ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 18 LAB και 20 NAB πειραματόζωα από τα οποία απομονώθηκαν με κρυστομές οι εξής εγκεφαλικές δομές: ραχιαίο ραβδωτό σώμα (dorsal striatum, dlSTR) και ωχρά σφαίρα (globus pallidus, GP). Εξαιτίας της μικρής ποσότητας ιστού ενώθηκαν οι αντίστοιχες δομές ανά ζεύγη ζώων με βάση τις τιμές των συμπεριφορικών δοκιμασιών από τις οποίες επιλέχθηκαν. Η πρωτεϊνική ανάλυση για τους υποδοχείς N-μεθυλο-D-ασπαρτικού οξέος (NMDA NR2A/NR2B) δεν αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών μεταξύ των δύο ομάδων και για τις δύο δομές που εξετάστηκαν. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα για τον τασεο- εξαρτώμενο δίαυλο ασβεστίου τύπου L ( $Ca_v1.2$ ) αποκάλυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων διαφορετικών καταστάσεων άγχους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνα 4.3.4).







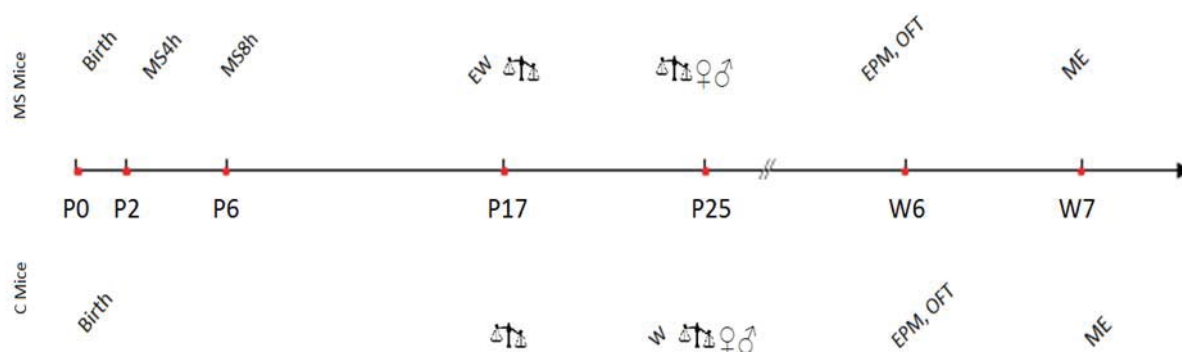
**Εικόνα 4.3.4:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο έκφρασης πρωτεϊνών του μιτοχondριακού προφίλ. Σύγκριση των ποσοτικοποιημένων επιπέδων των πρωτεϊνών (NMDA NR2A, NMDA NR2B, Ca<sub>v</sub>1.2) μεταξύ των ομάδων NAB και LAB. Το στατιστικό τεστ που χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση του μέσου όρου των τιμών είναι το μη- παραμετρικό Mann- Whitney test και οι τιμές του άξονα Y αντιπροσωπεύουν την πυκνότητα των ζωνών της ηλεκτροφόρησης που μετρήθηκε με το ειδικό λογισμικό Quantity- One (BioRad); (\*\*\*)  $p < 0.001$ ). M= μάρτυρας, N= NAB, L= LAB.

#### 4.4 Μητρική αποστέρηση, πρόωρος απογαλακτισμός και άξονας HPA

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διενεργήθηκαν στα πλαίσια του πρωτοκόλλου Μητρικού Αποχωρισμού και Πρόωρου Απογαλακτισμού (Maternal Separation with Early Weaning, MSEW) των μυών. Τα αποτελέσματα διακρίνονται περαιτέρω σε: Α) μορφολογικά, με την καταμέτρηση της αλλαγής βάρους που παρατηρείται κατά την ανάπτυξη των νεογνών, Β) συμπεριφορικά, κατά την ενηλικίωση των μυών για τη διερεύνηση των επιπτώσεων ψυχογενούς φύσεως που είχε ο μητρικός αποχωρισμός και Γ) μοριακά, για τον έλεγχο της γενετικής και επιγενετικής σύστασης μορίων που συμμετέχουν ενεργά στην απόκριση του HPA άξονα στο στρες.

Στην Εικόνα 4.4.1 απεικονίζονται με τη μορφή χρονοδιαγράμματος, τα σημαντικότερα σημεία του χειρισμού των μυών. Συγκεκριμένα, ως «ημέρα 0» (P0), ορίζεται η ημερομηνία γέννησης των μυών. Ο χειρισμός για τους μύες που αποτέλεσαν δείγματα απόκρισης στο στρες κατά τη νεαρή ηλικία, διενεργείται τις ημέρες P2-P5 με

απομάκρυνση από τη μητέρα για 4 ώρες, ενώ τις ημέρες P6-P16 η απομάκρυνση διαρκεί 8 ώρες. Την P17 γίνεται ο πρόωρος απογαλακτισμός και οι μύες, αφού ζυγιστούν και καταμετρηθεί το βάρος τους, εισάγονται σε καθαρό κλωβό με πολτοποιημένη τροφή και νερό. Την P25 οι μύες ζυγίζονται ξανά και γίνεται ο φυλετικός διαχωρισμός. Οι μύες διαβιούν σε κλωβούς με μέγιστο αριθμό 3-4 πειραματόζωων ανά κλωβό. Για τα δείγματα ελέγχου (μάρτυρες), γίνεται μία πρώτη καταμέτρηση βάρους την P17, ενώ την P25 συμβαίνει ο απογαλακτισμός, ο φυλετικός διαχωρισμός και η δεύτερη καταμέτρηση βάρους. Την 6<sup>η</sup> εβδομάδα διενεργούνται οι συμπεριφορικές δοκιμασίες, δηλαδή η Δοκιμασία Υπερψωμένου Σταυροειδούς Λαβυρίνθου (EPM) και η Δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου (OFT). Τέλος, την 7<sup>η</sup> εβδομάδα, τα πειραματόζωα θανατώνονται, απομονώνονται οι επιθυμητές εγκεφαλικές δομές και διενεργούνται τα μοριακά πειράματα.



**Εικόνα 4.4.1: Σχηματική αναπαράσταση του πρωτοκόλλου στρες μητρικού αποχωρισμού και πρόωρου απογαλακτισμού κατά την πρώιμη μεταγεννητική ηλικία.** Στην επάνω πλευρά του χρονοδιαγράμματος, φαίνονται οι χειρισμοί των δειγμάτων απόκρισης στο στρες ενώ στην κάτω πλευρά οι χειρισμοί των δειγμάτων ελέγχου (μαρτύρων). Το εικονίδιο του ζυγού αντιπροσωπεύει την καταμέτρηση βάρους, ενώ τα εικονίδια του φύλου αντιπροσωπεύουν το φυλετικό διαχωρισμό. Οι συντομογραφίες της εικόνας εξηγούνται παρακάτω: MS Mice: Maternally Separated Mice, C Mice: Control Mice, P: Post-natal day, W6: Week 6, W7: Week 7, MS4h: Maternal Separation for 4 hours, MS8h: Maternal Separation for 8 hours, EW: Early Weaning, W: Weaning, EPM: Elevated-Plus Maze, OFT: Open Field Test, ME: Molecular Experiments.

#### 4.4.1 Καταμέτρηση βάρους

Κατά την ανάπτυξη των πειραματόζωων και την εφαρμογή του πρωτοκόλλου Μητρικού Αποχωρισμού και Πρόωρου Απογαλακτισμού (MSEW), έγινε μέτρηση του βάρους των μυών στο σύνολό τους, τις P17 και P25. Η διαφορά στην πρόσληψη βάρους μεταξύ των μυών που υπέστησαν μητρική αποστέρηση και των μυών που αποτέλεσαν

δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ως ένας πρώτος δείκτης ελέγχου για το αποτέλεσμα που είχε το στρεσογόνο ερέθισμα στην ανάπτυξη των πειραματόζωων. Στους πίνακες παρακάτω, παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές των μετρήσεων και της καταγραφής του φύλου. Η ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε ανάλογα με το φύλο και υπολογίστηκε ο μέσος όρος αύξησης βάρους των αρσενικών και θηλυκών μυών. Ακολουθεί απεικόνιση των πινάκων σε γραφήματα. Το βάρος καταμετρήθηκε σε γραμμάρια (g) και αναγράφεται στους πίνακες και τα γραφήματα ως Body Mass.

- Πρώτη πειραματική ομάδα (Biological Replicate 1):

Group A (MS)	Gender	Body Mass diff.	Average Gain
1	M	9	
2	M	11	
3	M	7	
4	M	9	
5	M	9	
6	M	9	
7	M	11	
9	M	10	9.38
8	F	10	10.00

**Πίνακας 4.4.1: Καταμέτρηση βάρους (g) των 9 μυών της ομάδας Α «στρες».** Καταμετράται το βάρος των μυών τις ημέρες P17 και P25 και υπολογίζεται η πρόσληψη βάρους (Body Mass difference). Υπολογίζεται ο μέσος όρος αύξησης (Average Gain) του βάρους (g) 8 αρσενικών μυών και 1 θηλυκού μύ. M= Male, F= Female.

Group B (MS)	Gender	Body Mass diff.	Average Gain
1	M	6	
3	M	6	
4	M	8	
7	M	3	
8	M	10	
10	M	7	
11	M	9	7.00
2	F	6	
5	F	11	
6	F	3	
9	F	7	
12	F	4	6.20

**Πίνακας 4.4.2: Καταμέτρηση βάρους (g) των 12 μυών της ομάδας Β «στρες».** Καταμετράται το βάρος των μυών τις ημέρες P17 και P25 και υπολογίζεται η πρόσληψη βάρους (Body Mass difference). Υπολογίζεται ο μέσος όρος αύξησης (Average Gain) του βάρους (g) 7 αρσενικών μυών και 5 θηλυκών μυών. M= Male, F= Female.

Group C (MS)	Gender	Body Mass diff.	Average Gain
3	M	7	
4	M	10	
5	M	7	
9	M	6	7.50
1	F	8	
2	F	5	
6	F	8	
7	F	5	
8	F	5	
10	F	3	
11	F	6	
12	F	10	6.25

**Πίνακας 4.4.3: Καταμέτρηση βάρους (g) των 12 μυών της ομάδας Γ «στρες».** Καταμετράται το βάρος των μυών τις ημέρες P17 και P25 και υπολογίζεται η πρόσληψη βάρους (Body Mass difference). Υπολογίζεται ο μέσος όρος αύξησης (Average Gain) του βάρους (g) 4 αρσενικών μυών και 8 θηλυκών μυών. M= Male, F= Female.

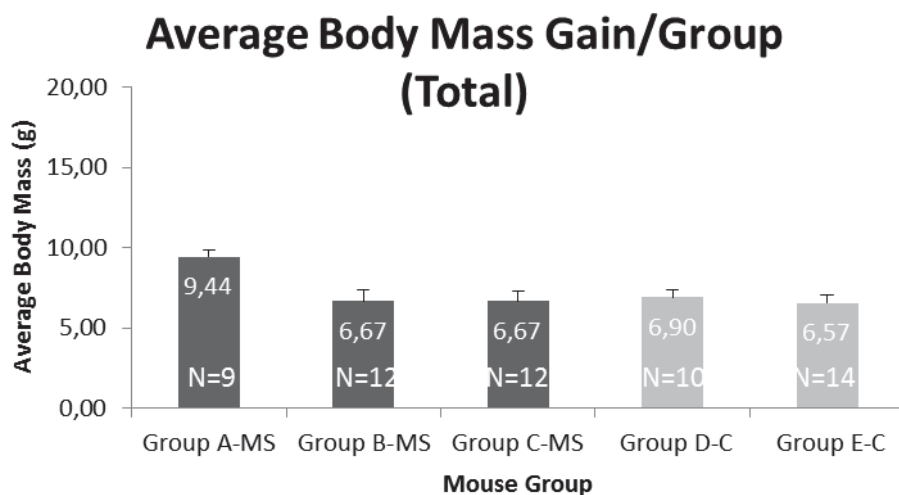
Group D (C)	Gender	Body Mass diff.	Average Gain
1	M	7	
4	M	10	
7	M	9	
9	M	6	
10	M	5	7.40
2	F	6	
3	F	6	
5	F	7	
6	F	6	
8	F	7	6.40

**Πίνακας 4.4.4: Καταμέτρηση βάρους (g) των 10 μυών της ομάδας Δ «ελέγχου».** Καταμετράται το βάρος των μυών τις ημέρες P17 και P25 και υπολογίζεται η πρόσληψη βάρους (Body Mass difference).

Υπολογίζεται ο μέσος όρος αύξησης (Average Gain) του βάρους (g) 5 αρσενικών μυών και 5 θηλυκών μυών.  
M= Male, F= Female.

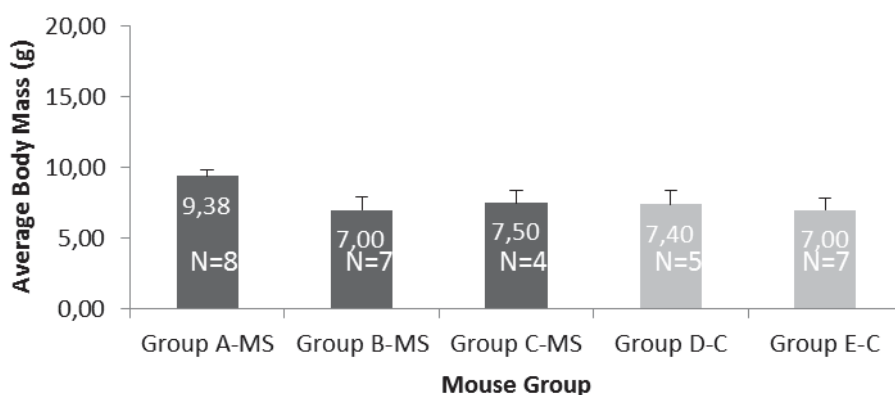
Group E (C)	Gender	Body Mass diff.	Average Gain
2	M	8	
3	M	7	
4	M	8	
5	M	7	
6	M	3	
13	M	6	
14	M	10	7.00
1	F	8	
7	F	4	
8	F	5	
9	F	6	
10	F	8	
11	F	6	
12	F	6	6.14

**Πίνακας 4.4.5: Καταμέτρηση βάρους (g) των 14 μυών της ομάδας E «ελέγχου».** Καταμετράται το βάρος των μυών τις ημέρες P17 και P25 και υπολογίζεται η πρόσληψη βάρους (Body Mass difference). Υπολογίζεται ο μέσος όρος αύξησης (Average Gain) του βάρους (g) 7 αρσενικών μυών και 7 θηλυκών μυών.  
M= Male, F= Female.



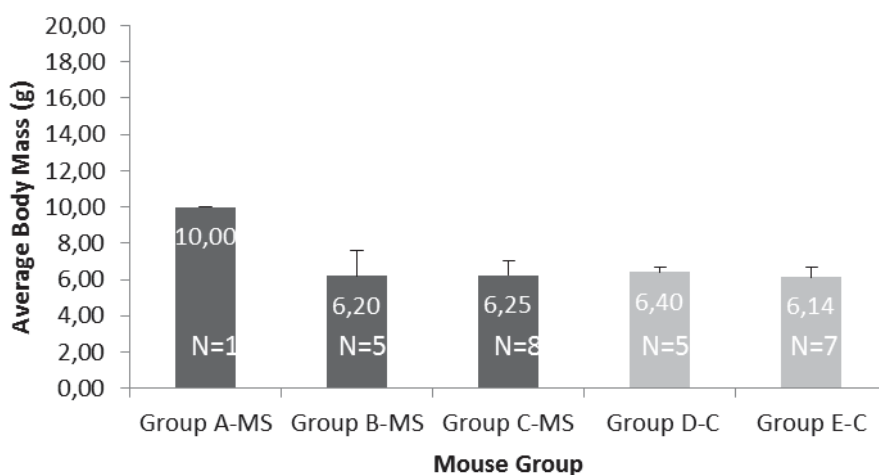
**Εικόνα 4.4.2: Γραφική παράσταση απεικόνισης του μέσου όρου πρόσληψης βάρους των πειραματόζωων.** Κάθε στήλη αντιστοιχεί σε μια ομάδα, καθεμία απ' τις οποίες αποτελείται από αρσενικούς και θηλυκούς μύες. Ο αριθμός σε κάθε στήλη αντιστοιχεί στο μέσο όρο αύξησης του βάρους. N= αριθμός μυών κάθε ομάδας, P(T≤t) two-tail= 0.53, (+SEM). MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

### Average Body Mass Gain/Group (Male Mice)



**Εικόνα 4.4.3:** Γραφική παράσταση απεικόνισης του μέσου όρου πρόσληψης βάρους των πειραματόζωων. Κάθε στήλη αντιστοιχεί σε μια ομάδα, καθεμία απ' τις οποίες αποτελείται μόνο από αρσενικούς μύες. Ο αριθμός σε κάθε στήλη αντιστοιχεί στο μέσο όρο αύξησης του βάρους. N= αριθμός μυών κάθε ομάδας,  $P(T \leq t)$  two-tail= 0.48, (+SEM). MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

### Average Body Mass Gain/Group (Female Mice)



**Εικόνα 4.4.4:** Γραφική παράσταση απεικόνισης του μέσου όρου πρόσληψης βάρους των πειραματόζωων. Κάθε στήλη αντιστοιχεί σε μια ομάδα, καθεμία απ' τις οποίες αποτελείται μόνο από θηλυκούς μύες. Ο αριθμός σε κάθε στήλη αντιστοιχεί στο μέσο όρο αύξησης του βάρους. N= αριθμός μυών κάθε ομάδας,  $P(T \leq t)$  two-tail= 0.51, (+SEM). MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

Για τα δείγματα που απεικονίζονται στις παραπάνω γραφικές παραστάσεις εφαρμόστηκε στατιστικός έλεγχος με F-Test και t-Test. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε σε κάθε περίπτωση η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ των μέσων όρων αύξησης του βάρους των μυών που αποτέλεσαν δείγματα απόκρισης στο στρες (Ομάδα Α, Β, Γ) και μυών που αποτέλεσαν δείγματα ελέγχου (Ομάδα Δ, Ε). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων αύξησης του βάρους των ομάδων «στρες» και «ελέγχου».

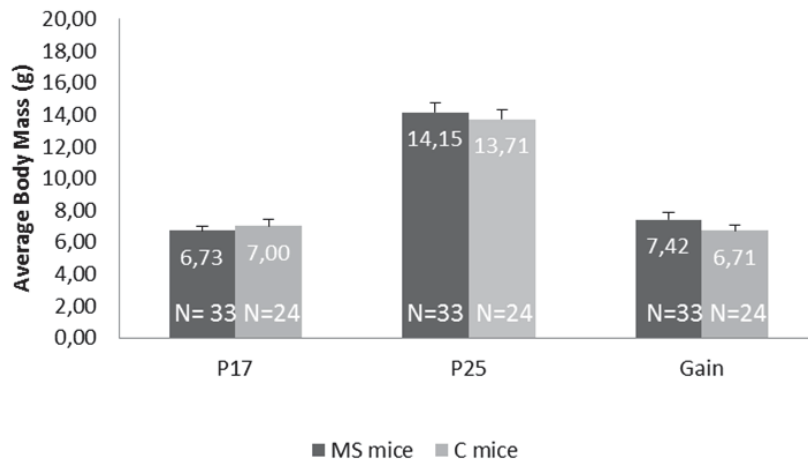
Έπειτα, έγινε μία δεύτερη ομαδοποίηση των πειραματόζωων σε δείγματα τα οποία υπέστησαν μητρικό αποχωρισμό (MS) και σε δείγματα ελέγχου (C). Έγινε καταμέτρηση του μέσου όρου βάρους τις ημέρες P17, P25 και καταμέτρηση για τις διαφορές μεταξύ των ημερών αυτών, για τους αρσενικούς «στρες», τους θηλυκούς «στρες» και τους «στρες» μύες συνολικά. Ομοίως, υπολογίστηκαν οι παραπάνω τιμές για τα δείγματα «ελέγχου».

<b>Average Body Mass</b>			
<b>Total</b>	<b>P17</b>	<b>P25</b>	<b>Gain</b>
<b>MS</b>	6.73	14.15	7.42
<b>C</b>	7.00	13.71	6.71
<b>Male</b>			
<b>MS</b>	7.32	15.42	8.11
<b>C</b>	7.25	14.42	7.17
<b>Female</b>			
<b>MS</b>	5.93	12.43	6.50
<b>C</b>	6.75	13.00	6.25

**Πίνακας 4.4.6: Καταγραφή των μέσων όρων του βάρους όλων των πειραματόζωων «στρες» και «ελέγχου», ανά φύλο και συνολικά.** Οι μετρήσεις έγιναν για τα δεδομένα των ημερών P17 και P25 και για τις διαφορές των τιμών αυτών μεταξύ τους (Gain). MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

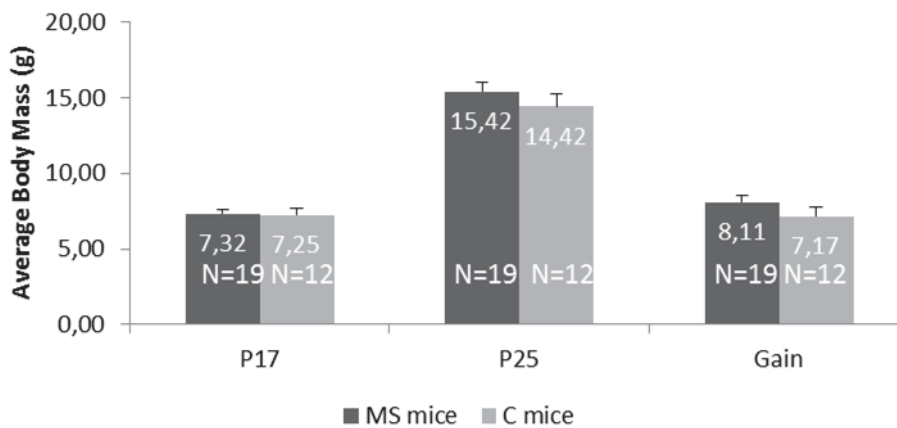


### Average Body Mass (Total)



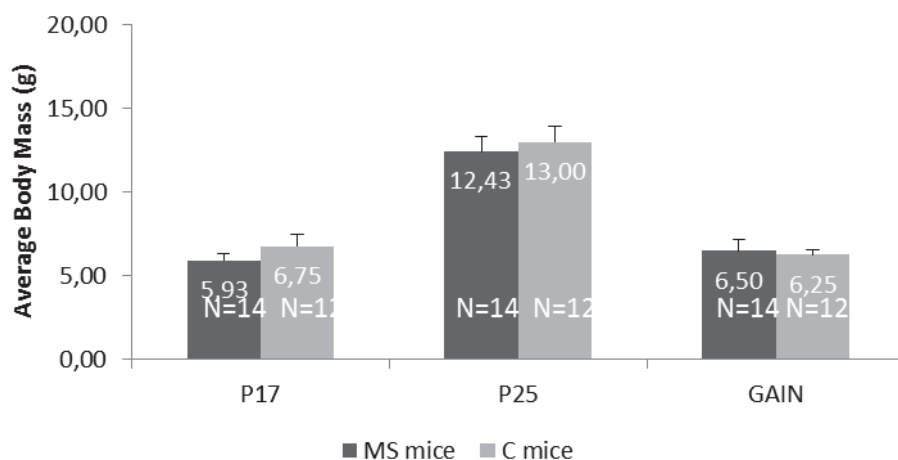
**Εικόνα 4.4.5:** Γραφική παράσταση απεικόνισης του μέσου όρου βάρους των πειραματόζωων για τις ημέρες καταμέτρησης P17 και P25, καθώς και της διαφοράς των τιμών τους. Στις ομάδες «στρες» και «ελέγχου» συμπεριλαμβάνονται αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα. Η τιμή που αναγράφεται σε κάθε στήλη αποτελεί το μέσο όρο που υπολογίστηκε. N= αριθμός μυών κάθε ομάδας.  $P(T \leq t)$  two-tail= 0.93, (+SEM). MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

### Average Body Mass (Male Mice)



**Εικόνα 4.4.6:** Γραφική παράσταση απεικόνισης του μέσου όρου βάρους των πειραματόζωων για τις ημέρες καταμέτρησης P17 και P25, καθώς και της διαφοράς των τιμών τους. Στις ομάδες «στρες» και «ελέγχου» συμπεριλαμβάνονται μόνο αρσενικά πειραματόζωα. Η τιμή που αναγράφεται σε κάθε στήλη αποτελεί το μέσο όρο που υπολογίστηκε. N= αριθμός μυών κάθε ομάδας.  $P(T \leq t)$  two-tail= 0.86, (+SEM). MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

### Average Body Mass (Female Mice)



**Εικόνα 4.4.7:** Γραφική παράσταση απεικόνισης του μέσου όρου βάρους των πειραματόζωων για τις ημέρες καταμέτρησης P17 και P25, καθώς και της διαφοράς των τιμών τους. Στις ομάδες «στρες» και «ελέγχου» συμπεριλαμβάνονται μόνο θηλυκά πειραματόζωα. Η τιμή που αναγράφεται σε κάθε στήλη αποτελεί το μέσο όρο που υπολογίστηκε. N= αριθμός μυών κάθε ομάδας.  $P(T \leq t)$  two-tail= 0.91, (+SEM). MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

Για τις τιμές των παραπάνω γραφικών παραστάσεων έγινε στατιστική ανάλυση με F-Test και t-Test, για να διαπιστωθεί η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν οι μέσοι όροι του βάρους των πειραματόζωων «στρες» και «ελέγχου» κατά τις ημέρες P17, P25 και οι μέσοι όροι της αύξησης βάρους μεταξύ των ημερών αυτών. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του βάρους των δειγμάτων απόκρισης στο στρες και των δειγμάτων ελέγχου.

Ομοίως πραγματοποιήθηκαν οι υπολογισμοί και για τη δεύτερη πειραματική ομάδα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες και γραφήματα.

- Δεύτερη πειραματική ομάδα (Biological Replicate 2):

Group A (MS)	Gender	Body Mass diff.	Average Gain
2	M	10	
4	M	6	
9	M	6	
10	M	6	7.00
1	F	5	
3	F	10	

5	F	4	
6	F	7	
7	F	6	
8	F	6	6.33

**Πίνακας 4.4.7: Καταμέτρηση βάρους (g) των 10 μυών της ομάδας A «στρες».** Καταμετράται το βάρος των μυών τις ημέρες P17 και P25 και υπολογίζεται η πρόσληψη βάρους (Body Mass difference). Υπολογίζεται ο μέσος όρος αύξησης (Average Gain) του βάρους (g) 4 αρσενικών μυών και 6 θηλυκών μυών. M= Male, F= Female.

Group B (MS)	Gender	Body Mass diff.	Average Gain
2	M	6	
3	M	13	
6	M	9	
7	M	7	
8	M	4	
9	M	9	
10	M	9	8.14
1	F	7	
4	F	8	
5	F	6	7.00

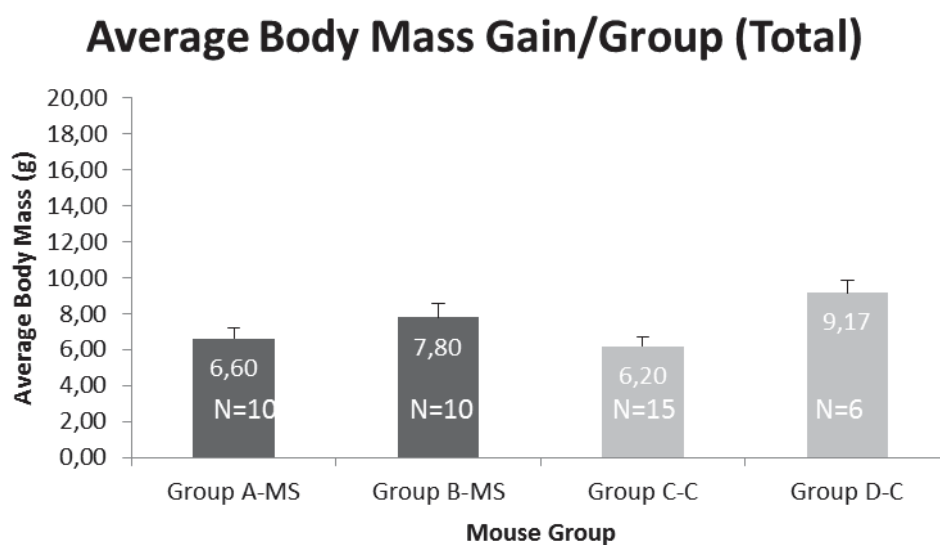
**Πίνακας 4.4.8: Καταμέτρηση βάρους (g) των 10 μυών της ομάδας B «στρες».** Καταμετράται το βάρος των μυών τις ημέρες P17 και P25 και υπολογίζεται η πρόσληψη βάρους (Body Mass difference). Υπολογίζεται ο μέσος όρος αύξησης (Average Gain) του βάρους (g) 7 αρσενικών μυών και 3 θηλυκών μυών. M= Male, F= Female.

Group C (C)	Gender	Body Mass diff.	Average Gain
1	M	6	
4	M	4	
5	M	8	
7	M	7	
8	M	9	
9	M	6	
10	M	10	
12	M	6	
14	M	5	6.78
2	F	6	
3	F	5	
6	F	6	
11	F	3	
13	F	7	
15	F	5	5.33

**Πίνακας 4.4.9: Καταμέτρηση βάρους (g) των 15 μυών της ομάδας Γ «ελέγχου».** Καταμετράται το βάρος των μυών τις ημέρες P17 και P25 και υπολογίζεται η πρόσληψη βάρους (Body Mass difference). Υπολογίζεται ο μέσος όρος αύξησης (Average Gain) του βάρους (g) 9 αρσενικών μυών και 6 θηλυκών μυών. M= Male, F= Female.

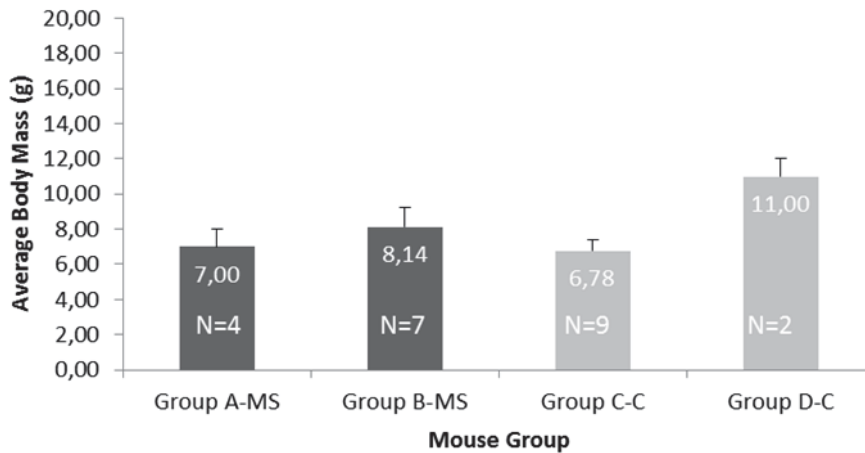
Group D (C)	Gender	Body Mass diff.	Average Gain
2	M	12	11.00
3	M	10	
1	F	9	8.25
4	F	8	
5	F	9	
6	F	7	

**Πίνακας 4.4.10: Καταμέτρηση βάρους (g) των 6 μυών της ομάδας Δ «ελέγχου».** Καταμετράται το βάρος των μυών τις ημέρες P17 και P25 και υπολογίζεται η πρόσληψη βάρους (Body Mass difference). Υπολογίζεται ο μέσος όρος αύξησης (Average Gain) του βάρους (g) 2 αρσενικών μυών και 4 θηλυκών μυών. M= Male, F= Female.



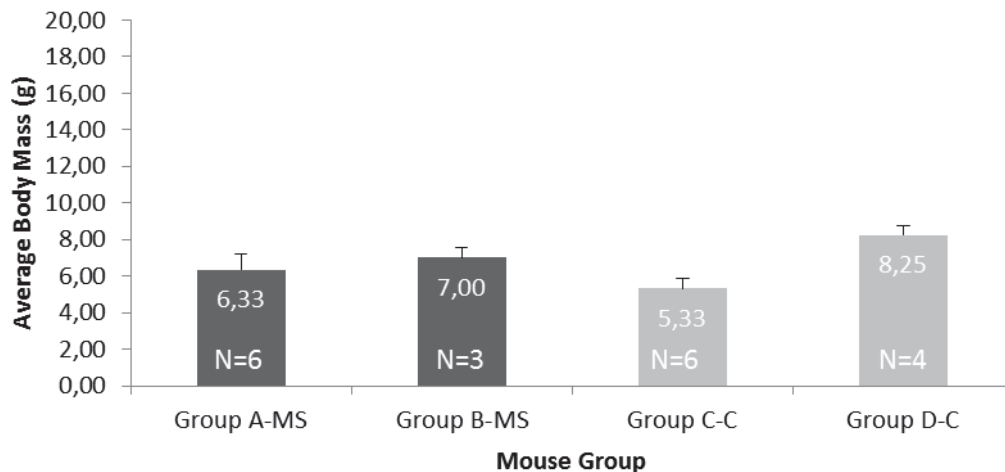
**Εικόνα 4.4.8: Γραφική παράσταση απεικόνισης του μέσου όρου πρόσληψης βάρους των πειραματόζωων.** Κάθε στήλη αντιστοιχεί σε μία ομάδα και καθεμία αποτελείται από αρσενικούς και θηλυκούς μύες. Ο αριθμός σε κάθε στήλη αντιστοιχεί στο μέσο όρο αύξησης του βάρους. N= αριθμός μυών κάθε ομάδας.  $P(T \leq t) \text{ two-tail} = 0.79, (+SEM)$ . MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

### Average Body Mass Gain/Group (Male Mice)



**Εικόνα 4.4.9:** Γραφική παράσταση απεικόνισης του μέσου όρου πρόσληψης βάρους των πειραματόζωων. Κάθε στήλη αντιστοιχεί σε μία ομάδα και καθεμία αποτελείται μόνο από αρσενικούς μύες. Ο αριθμός σε κάθε στήλη αντιστοιχεί στο μέσο όρο αύξησης του βάρους. N= αριθμός μυών κάθε ομάδας.  $P(T \leq t)$  two-tail= 0.61, (+SEM). MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

### Average Body Mass Gain/Group (Female Mice)



**Εικόνα 4.4.10:** Γραφική παράσταση απεικόνισης του μέσου όρου πρόσληψης βάρους των πειραματόζωων. Κάθε στήλη αντιστοιχεί σε μία ομάδα και καθεμία αποτελείται μόνο από θηλυκούς μύες. Ο αριθμός σε κάθε στήλη αντιστοιχεί στο μέσο όρο αύξησης του βάρους. N= αριθμός μυών κάθε ομάδας.  $P(T \leq t)$  two-tail= 0.94, (+SEM). MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

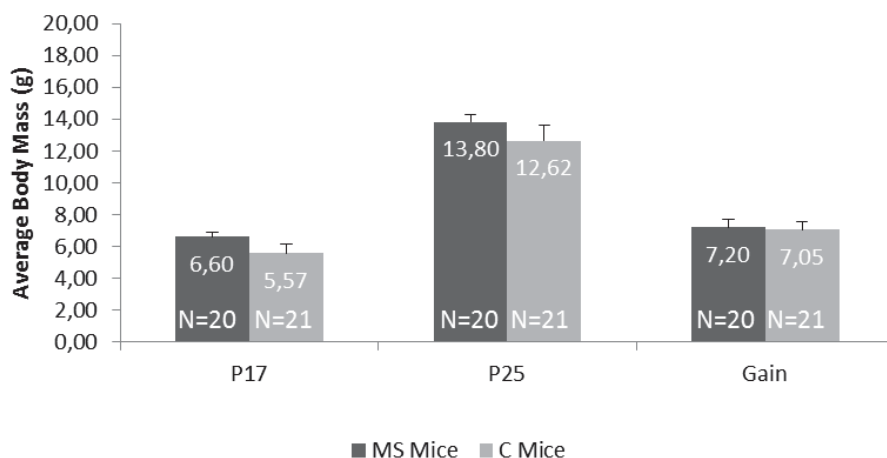
Για τον έλεγχο της στατιστικής ορθότητας των παραπάνω αποτελεσμάτων εφαρμόστηκε έλεγχος με F-Test και t-Test. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν οι μέσοι όροι αύξησης του βάρους για τις ομάδες μυών «στρες» ως προς τις ομάδες μυών «ελέγχου». Σε καμία από τις τρεις περιπτώσεις ελέγχου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην αύξηση του βάρους.

Όπως και για την πρώτη πειραματική ομάδα, τα πειραματόζωα ομαδοποιήθηκαν σε δείγματα τα οποία υπέστησαν μητρικό αποχωρισμό και σε δείγματα ελέγχου. Έπειτα έγινε καταμέτρηση του μέσου όρου βάρους τις ημέρες P17, P25 και της διαφοράς μεταξύ των ημερών αυτών, για τους αρσενικούς «στρες», τους θηλυκούς «στρες» και τους «στρες» μύες συνολικά. Οι παραπάνω τιμές υπολογίστηκαν και για τα δείγματα «ελέγχου».

Average Body Mass			
Total	P17	P25	Gain
MS	6.60	13.80	7.20
C	5.57	12.62	7.05
<b>Male</b>			
MS	6.55	14.27	7.73
C	5.45	13.00	7.55
<b>Female</b>			
MS	6.67	13.22	6.56
C	6.57	12.20	6.50

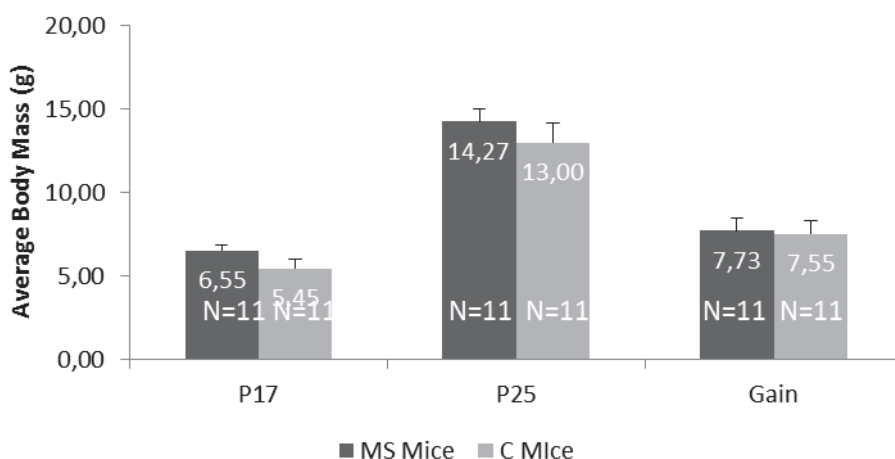
**Πίνακας 4.4.11: Καταγραφή των μέσων όρων του βάρους όλων των πειραματόζωων «στρες» και «ελέγχου», ανά φύλο και συνολικά.** Οι μετρήσεις έγιναν για τα δεδομένα των ημερών P17 και P25 και για τις διαφορές των τιμών αυτών μεταξύ τους (Gain). MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

### Average Body Mass (Total)



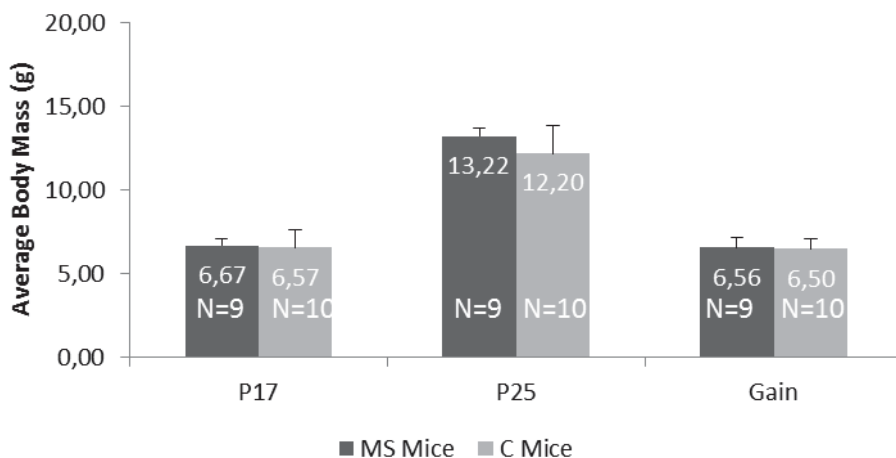
**Εικόνα 4.4.11:** Γραφική παράσταση απεικόνισης του μέσου όρου βάρους των πειραματόζωων για τις ημέρες καταμέτρησης P17 και P25, καθώς και της διαφοράς των τιμών τους. Στις ομάδες «στρες» και «ελέγχου» συμπεριλαμβάνονται αρσενικά και θηλυκά πειραματόζωα. Η τιμή που αναγράφεται σε κάθε στήλη αποτελεί το μέσο όρο που υπολογίστηκε. N= αριθμός μυνών κάθε ομάδας.  $P(T \leq t)$  two-tail= 0.81, (+SEM). MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

### Average Body Mass (Male Mice)



**Εικόνα 4.4.12:** Γραφική παράσταση απεικόνισης του μέσου όρου βάρους των πειραματόζωων για τις ημέρες καταμέτρησης P17 και P25, καθώς και της διαφοράς των τιμών τους. Στις ομάδες «στρες» και «ελέγχου» συμπεριλαμβάνονται μόνο αρσενικά πειραματόζωα. Η τιμή που αναγράφεται σε κάθε στήλη αποτελεί το μέσο όρο που υπολογίστηκε. N= αριθμός μυνών κάθε ομάδας.  $P(T \leq t)$  two-tail= 0.81, (+SEM). MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

## Average Body Mass (Female Mice)



**Εικόνα 4.4.13:** Γραφική παράσταση απεικόνισης του μέσου όρου βάρους των πειραματόζωων για τις ημέρες καταμέτρησης P17 και P25, καθώς και της διαφοράς των τιμών τους. Στις ομάδες «στρες» και «ελέγχου» συμπεριλαμβάνονται μόνο θηλυκά πειραματόζωα. Η τιμή που αναγράφεται σε κάθε στήλη αποτελεί το μέσο όρο που υπολογίστηκε. N= αριθμός μυών κάθε ομάδας.  $P(T \leq t)$  two-tail= 0.90, (+SEM). MS= δείγματα «στρες», C= δείγματα «ελέγχου».

Για να διαπιστωθεί η ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς έγινε στατιστική ανάλυση με F-Test και t-Test. Συγκεκριμένα συγκρίθηκαν σε κάθε περίπτωση οι τιμές του μέσου όρου βάρους την ημέρα P17, P25 καθώς και της διαφοράς τους, για τα πειραματόζωα «στρες», με τις αντίστοιχες τιμές για τα πειραματόζωα «ελέγχου». Σε καμία από τις τρεις περιπτώσεις δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων του βάρους των μυών.

### 4.4.2 Συμπεριφορικές δοκιμασίες

Μετά το φυλετικό διαχωρισμό, ο οποίος έλαβε χώρα την P25, ακολούθησαν τα συμπεριφορικά πειράματα, περίπου την έκτη εβδομάδα ζωής των αρσενικών μυών κάθε ομάδας. Συγκεκριμένα, διενεργήθηκαν δοκιμασίες Ανοικτού Πεδίου (Open-Field Test, OFT) και Υπερυψωμένου Σταυροειδούς Λαβυρίνθου (Elevated-Plus Maze, EPM). Η δοκιμασία του Υπερυψωμένου Σταυροειδούς Λαβυρίνθου θεωρείται περισσότερο αξιόπιστη για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς των ζώων. Για το λόγο αυτό αποτέλεσε μέθοδο επιλογής των καλύτερα στρεσαρισμένων πειραματόζωων και αποκλεισμού των ακραίων τιμών, ώστε να γίνουν στη συνέχεια τα μοριακά πειράματα. Τα πειραματόζωα κατά την είσοδό τους στον Υπερυψωμένο Σταυροειδή Λαβύρινθο, εκτίθενται σε ένα νέο



και στρεσογόνο περιβάλλον. Το ερέθισμα αυτό αποτελεί παράγοντα άγχους επειδή οι μύες έχουν απομακρυνθεί από τους κλωβούς στους οποίους διαβιούν με τα υπόλοιπα πειραματόζωα αλλά κι επειδή καλούνται να εξερευνήσουν το χώρο του Λαβυρίνθου. Με τη βοήθεια του EPM, καταμετράται η συνολική κινητική ικανότητα του ζώου και η απόκριση στο στρες. Συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος, για κάθε μνυ καταμετρήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι:

1. Αριθμός εισόδων στους κλειστούς βραχίονες του EPM (*Closed Arm Entries*).
2. Αριθμός εισόδων στους ανοικτούς βραχίονες του EPM (*Open Arm Entries*).
3. Χρόνος παραμονής στους κλειστούς βραχίονες του EPM (*Time Spent in Closed Arms*).
4. Χρόνος παραμονής στους ανοικτούς βραχίονες του EPM (*Time Spent in Open Arms*).

Για την επιλογή ενός καλά στρεσαρισμένου πειραματόζωου, επιθυμείται μεγάλος αριθμός εισόδων στους κλειστούς βραχίονες καθώς και μεγάλη χρονική διάρκεια παραμονής σε αυτούς, ενώ ο αριθμός εισόδων και ο χρόνος παραμονής στους ανοικτούς βραχίονες θα πρέπει να είναι χαμηλός. Αντιθέτως, για να αποτελεί καλό δείγμα ελέγχου ένα πειραματόζωο θα πρέπει να εμφανίζει μεγάλο αριθμό εισόδων και διάρκεια παραμονής στους ανοικτούς βραχίονες και μικρό αριθμό εισόδων και διάρκεια παραμονής στους κλειστούς βραχίονες. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι χρόνοι παραμονής στους ανοικτούς και στους κλειστούς βραχίονες του Υπερυψωμένου Σταυροειδούς Λαβυρίνθου καθώς και ο αριθμός εισόδων σε αυτούς, για όλους τους αρσενικούς μύες του πειράματος.

Πρώτη Πειραματική Ομάδα					Δεύτερη Πειραματική Ομάδα				
SAMPLE	C.A.	O.A.	TIME C.A.	TIME O.A.	SAMPLE	C.A.	O.A.	TIME C.A.	TIME O.A.
A1	23	6	124.97	27.7	A2	4	0	289.95	0
A2	3	1	122.68	8.2	A4	4	0	279.02	0
A3	13	1	128.42	5	A9	4	0	279.94	0
A4	11	5	84.95	27.4	A10	6	0	259.74	0
A5	18	2	174.93	12.39	B2	15	3	185.26	41.95
A6	12	2	196.29	21.28	B4	6	3	264.55	29.56
A7	8	0	237.26	0	B7	12	5	236.23	26.81
A9	17	4	119.97	27.6	B8	5	2	208.9	65.88
B1	10	1	125.9	16.02	B9	1	0	300	0
B4	14	5	129.69	29.17	B11	6	1	247.54	12.08

<b>B5</b>	9	5	106.89	44.91	<b>B12</b>	3	0	297.39	0
<b>B8</b>	11	3	170.48	25.51	<b>C1</b>	9	2	235.97	21.9
<b>B9</b>	9	3	180.82	21.22	<b>C4</b>	12	1	222.11	11.89
<b>B11</b>	10	1	188.5	5.02	<b>C5</b>	6	4	235.41	23.26
<b>B12</b>	16	5	149.32	35.19	<b>C7</b>	10	0	239.98	0
<b>C3</b>	11	11	76.82	63	<b>C8</b>	5	1	279.74	4.72
<b>C4</b>	15	2	193.82	15.95	<b>C9</b>	12	4	239.13	36.8
<b>C5</b>	16	4	153.22	23.38	<b>C10</b>	17	2	208.34	12.66
<b>C9</b>	9	1	88.78	3.45	<b>C12</b>	17	3	207.73	13.56
<b>D1</b>	15	1	162.96	3.66	<b>C14</b>	16	0	244.09	0
<b>D4</b>	16	4	131.04	47.56	<b>D2</b>	10	2	180.11	25.82
<b>D7</b>	14	5	110	37.55	<b>D3</b>	6	2	244.54	19.9
<b>D9</b>	18	10	85.13	52.32					
<b>D10</b>	14	4	138.07	25.28					
<b>E2</b>	13	1	162.14	9.71					
<b>E3</b>	14	2	116.29	19.64					
<b>E4</b>	13	4	132.54	50.52					
<b>E5</b>	17	1	161.66	7.02					
<b>E6</b>	19	3	113.83	31.81					
<b>E13</b>	9	10	61.31	85.88					
<b>E14</b>	23	0	150.5	0					

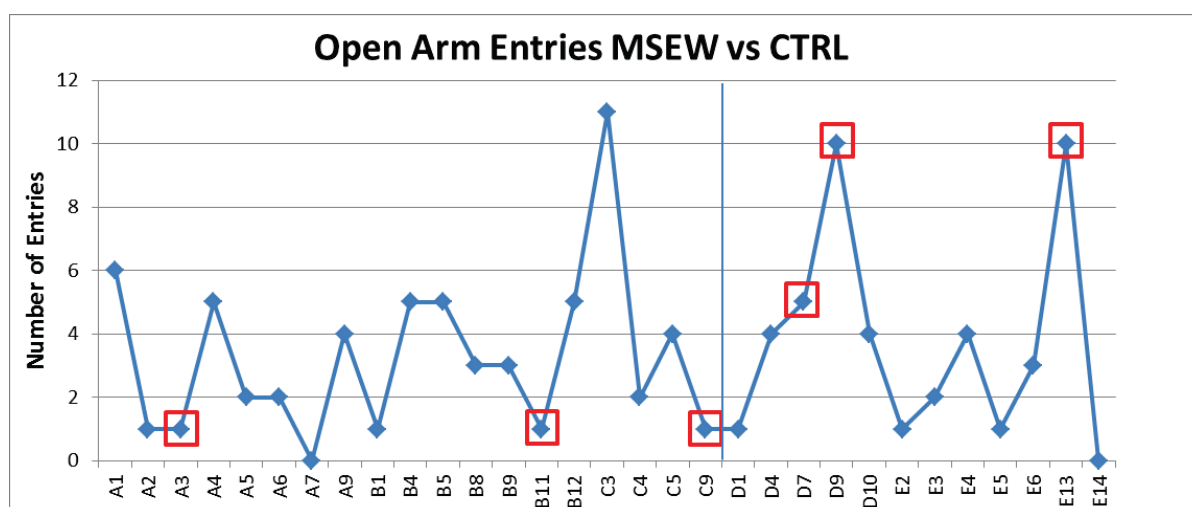
**Πίνακας 4.4.12: Μετρήσεις της δοκιμασίας Υπερυψωμένου Σταυροειδούς Λαβυρίνθου.** Αναλυτικές μετρήσεις του χρόνου παραμονής (sec) και του αριθμού εισόδων των μυών στους βραχίονες του EPM. Σημαίνονται οι μύες που επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

Από κάθε ομάδα μυών επιλέχθηκαν τρεις μύες ως δείγματα απόκρισης στο στρες κατά την πρόωμη ανάπτυξη (πρώτη πειραματική ομάδα: A3, B11, C9, δεύτερη πειραματική ομάδα: A2, A9, B12) και τρεις ως δείγματα ελέγχου (πρώτη πειραματική ομάδα: D7, D9, E13, δεύτερη πειραματική ομάδα: C5, C9, D2). Η επιλογή έγινε με κριτήριο τις τιμές των παραμέτρων που καταμετρήθηκαν. Συγκεκριμένα, τα προς επιλογή πειραματόζωα θα έπρεπε να εμφανίζουν περισσότερες από μία επιθυμητές τιμές στις εξεταζόμενες παραμέτρους. Στο Γράφημα 22 παρουσιάζεται η κατανομή της πρώτης ομάδας μυών στη δοκιμασία Υπερυψωμένου Σταυροειδούς Λαβυρίνθου. Η παράμετρος που απεικονίζεται και στην οποία παρατηρείται η μεγαλύτερη διαφοροποίηση στη συμπεριφορά των στρεσαρισμένων μυών και των δειγμάτων ελέγχου είναι ο αριθμός εισόδων στους ανοικτούς βραχίονες του Λαβυρίνθου. Συγκεκριμένα παρατηρούμε πως οι μύες A3, B11, C9 που υποβλήθηκαν σε μια διαδικασία χρόνιου αλλά ήπιου περιβαλλοντικού στρες, εμφανίζουν πολύ χαμηλότερο αριθμό εισόδων στους ανοικτούς

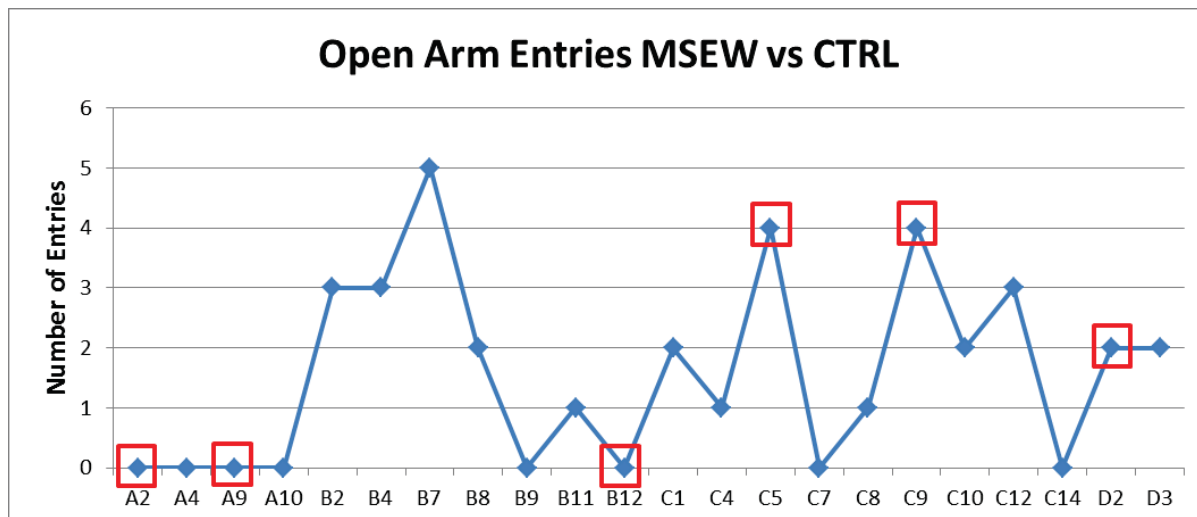
βραχίονες (1 είσοδος για κάθε ζώο) σε σχέση με τους μύες D7, D9, E13 που αποτέλεσαν δείγματα ελέγχου (5, 10, 10 είσοδοι αντίστοιχα). Για καλύτερη οργάνωση των αποτελεσμάτων, η αρίθμηση των μυών που θα ακολουθείται στο εξής, είναι η παρακάτω:

	μύες MS	μύες C
Πρώτη πειραματική ομάδα	A3→MD-1	D7→CTRL-1
	B11→MD-2	D9→CTRL-2
	C9→MD-3	E13→CTRL-3
Δεύτερη πειραματική ομάδα	A2→MD-4	C5→CTRL-4
	A9→MD-5	C9→CTRL-5
	B12→MD-6	D2→CTRL-6

**Πίνακας 4.4.13: Επιλογή δειγμάτων για περαιτέρω μοριακή ανάλυση.** Η επιλογή των καλύτερα αποκρινόμενων αρσενικών πειραματόζων έγινε με βάση τις καταμετρήσεις στη δοκιμασία του υπερυψωμένου σταυροειδούς λαβυρίνθου. Οι τελικές ομάδες για τη μοριακή ανάλυση των εγκεφαλικών δομών αποτελούνται από 6 δείγματα «στρες» και 6 δείγματα «ελέγχου».



**Εικόνα 4.4.14: Γραφική παράσταση απεικόνισης του αριθμού εισόδων των μυών της πρώτης πειραματικής ομάδας στους ανοιχτούς βραχίονες του EPM.** Με κόκκινο σημαίνονται οι μύες που επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικά δείγματα.



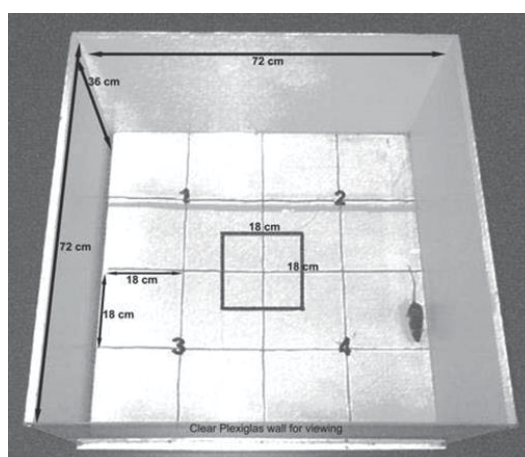
Εικόνα 4.4.15: Γραφική παράσταση απεικόνισης του αριθμού εισόδων των μύων της δεύτερης πειραματικής ομάδας στους ανοιχτούς βραχίονες του EPM. Με κόκκινο σημαίνονται οι μύες που επιλέχθηκαν ως αντιπροσωπευτικά δείγματα.

Παρατηρούμε διαφορά στον αριθμό εισόδων στους ανοιχτούς βραχίονες του EPM μεταξύ των μύων που αποτέλεσαν δείγματα έκθεσης σε στρεσογόνα ερεθίσματα και των δειγμάτων ελέγχου. Συγκεκριμένα, καταμετρήθηκαν για τα δείγματα ελέγχου C5 (CTRL-4), C9 (CTRL-5) και D2 (CTRL-6) από 4, 4 και 2 εισοδοί αντίστοιχα στους ανοιχτούς βραχίονες του λαβυρίνθου, ενώ για τα δείγματα απόκρισης στο στρες A2 (MD-4), A9 (MD-5) και B12 (MD-6) καμία είσοδος.

Η δεύτερη συμπεριφορική δοκιμασία που εφαρμόστηκε ήταν η δοκιμασία Ανοικτού Πεδίου (*Open-Field Test, OFT*). Οι παράμετροι οι οποίες καταμετρήθηκαν ήταν:

1. Δείκτες οριζόντιας κίνησης: απόσταση λόγω οριζόντιας κινητικότητας (*ambulatory distance/distance travelled*), διάρκεια οριζόντιας κινητικότητας (*ambulatory time*), συχνότητα εμφάνισης οριζόντιας κινητικότητας (*ambulatory counts*).
2. Δείκτες κατακόρυφης/κάθετης κίνησης: διάρκεια κατακόρυφης κινητικότητας/ανόρθωσης (*vertical time*), συχνότητα κατακόρυφης κινητικότητας/ανόρθωσης (*vertical counts*).
3. Διάρκεια παραμονής στο κεντρικό τετράγωνο του κλωβού (*zone time*).
4. Συχνότητα διέλευσης από το κεντρικό τετράγωνο (*zone counts/entries*).
5. Διάρκεια απραξίας (*resting time*).

Κατά την είσοδό του στο Ανοικτό Πεδίο, το πειραματόζωο καλείται να εξερευνήσει ένα νέο και φωτεινό περιβάλλον. Αυτό, σε συνδυασμό με την απομάκρυνση από τον αρχικό κλωβό διαβίωσης του μυ με τους υπόλοιπους, αποτελεί στρεσογόνο ερέθισμα και επηρεάζει τη συμπεριφορά του ζώου εντός του Ανοικτού Πεδίου. Το Πεδίο χωρίζεται σε περιοχές, τις οποίες διασχίζει κάθε μυς. Συγκεκριμένα, το συνολικό εμβαδόν του Πεδίου χωρίζεται στην περιφερειακή περιοχή και στο κεντρικό τετράγωνο του κλωβού (Εικόνα 4.4.16). Κατά κανόνα, ένα πειραματόζωο που έχει υποστεί στρες κατά την πρώιμη ανάπτυξη διανύει περισσότερο χρόνο εξερευνώντας την περιφέρεια του κλωβού, κοντά στα τοιχώματα, παρά εκτεθειμένο στο κεντρικό τετράγωνο. Αντιθέτως, ένα πειραματόζωο που αποτελεί δείγμα ελέγχου διανύει χρόνο εξίσου στο κεντρικό τετράγωνο και στην περιφέρεια του κλωβού.



**Εικόνα 4.4.16: Περιοχές Ανοικτού Πεδίου.** Το αριθμημένο τετράγωνο (1243), αποτελεί το κέντρο του κλωβού, ενώ το μικρό τετράγωνο (18x18 cm) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της κινητικής δραστηριότητας.

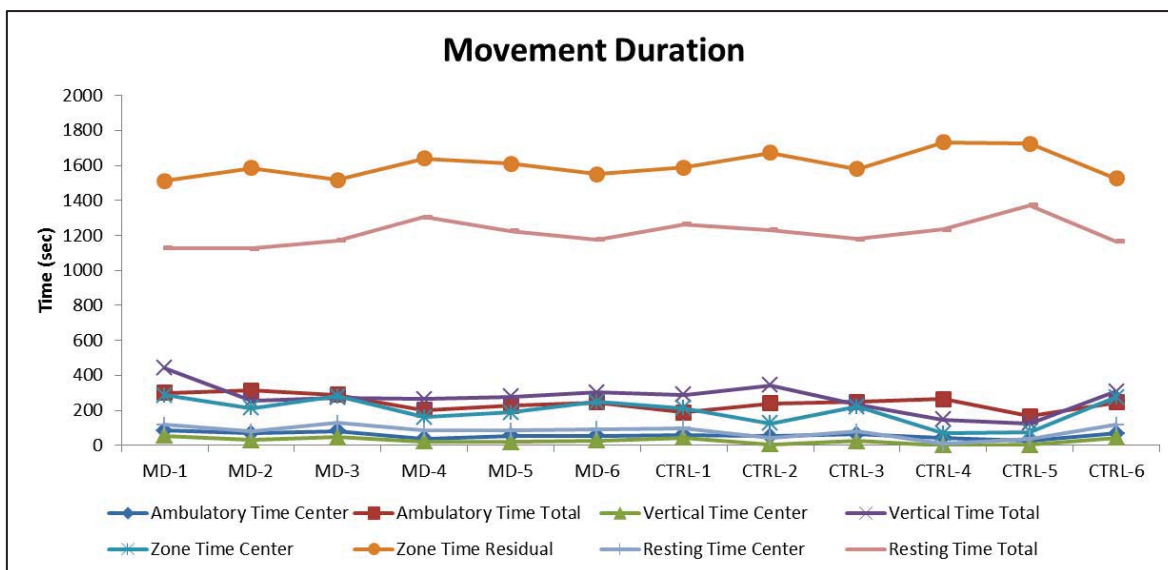
Στα ακόλουθα γραφήματα, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συμπεριφορικών παραμέτρων εντός του Ανοικτού Πεδίου, ενώ στον πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές από την καταμέτρηση του λογισμικού.



Zone Entries	Vertical Time(se)	Vertical Cnts.	Resting Time	Amb. Cnts.
776	441.35	733	1128.9	4537
734	253.7	598	1125.35	4580
586	272.8	579	1172.4	3823
318	266.2	632	1305.45	2320
353	279.05	503	1226.95	2524
828	302.35	657	1176.1	3428
360	289.15	522	1264.7	2664
324	344.65	634	1232.25	2886
764	236.1	711	1180.3	3358
312	147.35	540	1233.6	3225
168	127.2	459	1372.1	1754
710	307.8	556	1166.3	3388

**Πίνακας 4.4.14: Καταμέτρηση τιμών των παραμέτρων της δοκιμασίας Ανοιχτού Πεδίου.**

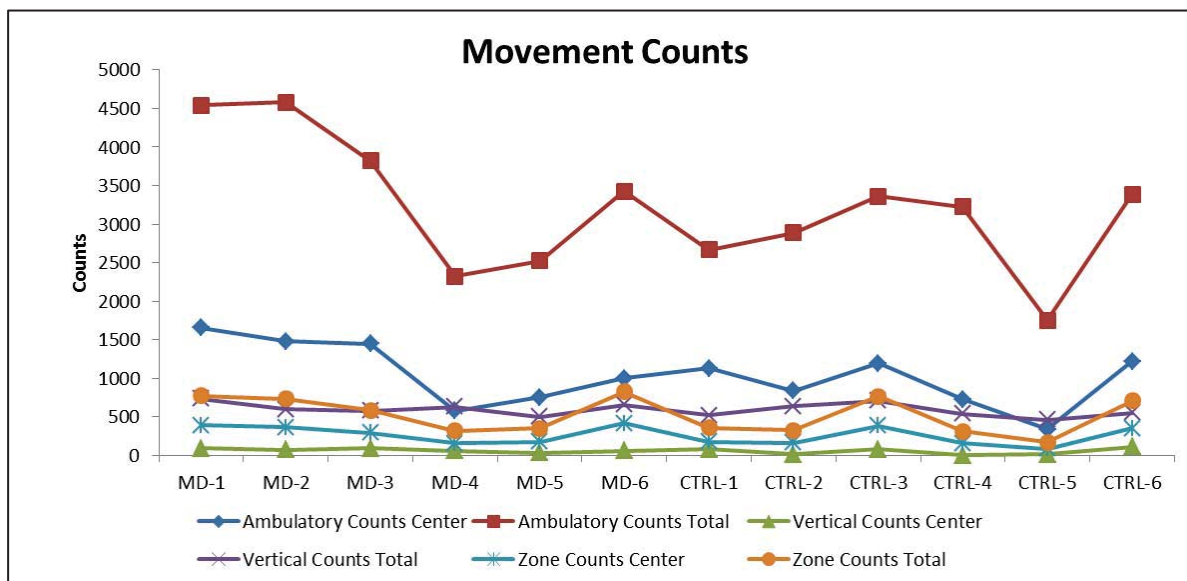
Στο παρακάτω γράφημα απεικονίζεται η κινητική δραστηριότητα των 12 μυνών, οι οποίοι επιλέχθηκαν ως οι βέλτιστα αποκρινόμενοι στο πρωτόκολλο. Στην Εικόνα 4.4.17 παρουσιάζεται για κάθε πειραματόζωο η διάρκεια κίνησης (movement duration) εντός του κλωβού. Για κάθε μυ απεικονίζεται ο χρόνος οριζόντιας κίνησης στο κεντρικό τετράγωνο (ambulatory time center) και στο συνολικό εμβαδό του κλωβού (ambulatory time total), ο χρόνος κατακόρυφων κινήσεων στο κεντρικό τετράγωνο (vertical time center) και στο συνολικό εμβαδό του κλωβού (vertical time total), ο χρόνος που παραμονής στο κεντρικό τετράγωνο (zone time center) και στην περιφέρεια του κλωβού (zone time residual) και ο χρόνος απραξίας στο κεντρικό τετράγωνο (resting time center) και στο συνολικό εμβαδό του κλωβού (resting time total). Παρατηρούμε πως σε σχέση με τις υπόλοιπες παραμέτρους, ο χρόνος παραμονής στην περιφέρεια του κλωβού, εμφανίζει την υψηλότερη χρονική διάρκεια, για όλους τους μύες. Ακολουθεί ο χρόνος απραξίας στο συνολικό εμβαδόν του κλωβού, ενώ οι υπόλοιπες παράμετροι που αφορούν χρονική διάρκεια κίνησης ή ακινησίας δεν διαφέρουν πολύ μεταξύ τους. Τα πειραματόζωα, ανεξαρτήτως του εάν είχαν εκτεθεί σε στρες κατά τη νεαρή ηλικία ή όχι, φαίνεται να εμφανίζουν παρόμοιες συμπεριφορές.



**Εικόνα 4.4.17: Γραφική παράσταση απεικόνισης παραμέτρων καταγραφής διάρκειας κινήσεων κατά τη δοκιμασία Ανοιχτού Πεδίου.** Σύνολο ιστογραμμάτων για τις παραμέτρους που εξετάστηκαν στο Ανοιχτό Πεδίο και αφορούν χρονική διάρκεια κινήσεων ή απραξίας. Μύες MD1-MD6: Δείγματα απόκρισης στο στρες κατά την πρόωμη ανάπτυξη. Μύες CTRL1-CTRL6: Δείγματα ελέγχου.

Στο επόμενο γράφημα (Εικόνα 4.4.18) απεικονίζεται ο αριθμός κινήσεων (movement counts) των μυών εντός του Ανοιχτού Πεδίου. Συγκεκριμένα φαίνεται για κάθε μυ ο αριθμός οριζόντιων κινήσεων στο κεντρικό τετράγωνο του κλωβού (ambulatory counts center), ο αριθμός οριζόντιων κινήσεων στο συνολικό εμβαδό του κλωβού (ambulatory counts total), ο αριθμός κατακόρυφων κινήσεων στο κεντρικό τετράγωνο του κλωβού (vertical counts center), ο αριθμός κατακόρυφων κινήσεων στο συνολικό εμβαδό του κλωβού καθώς και ο αριθμός εισόδων στο κεντρικό τετράγωνο (zone counts center) και ο αριθμός κινήσεων στο συνολικό εμβαδό του κλωβού (zone counts total). Η παράμετρος που ξεχωρίζει σε αριθμό κινήσεων από τις υπόλοιπες είναι ο αριθμός οριζόντιων κινήσεων στο συνολικό εμβαδό του Πεδίου, αλλά δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ της συμπεριφοράς των στρεσαρισμένων μυών και των μυών που αποτέλεσαν δείγματα ελέγχου.





**Εικόνα 4.4.18:** Γραφική παράσταση απεικόνισης παραμέτρων μέτρησης κινήσεων κατά τη δοκιμασία Ανοιχτού Πεδίου. Σύνολο ιστογραμμάτων για τις παραμέτρους που εξετάστηκαν στο Ανοιχτό Πεδίο και αφορούν αριθμό κινήσεων. Μύες MD1-MD6: Δείγματα απόκρισης στο στρες κατά την πρόωμη ανάπτυξη. Μύες CTRL1-CTRL6: Δείγματα ελέγχου.

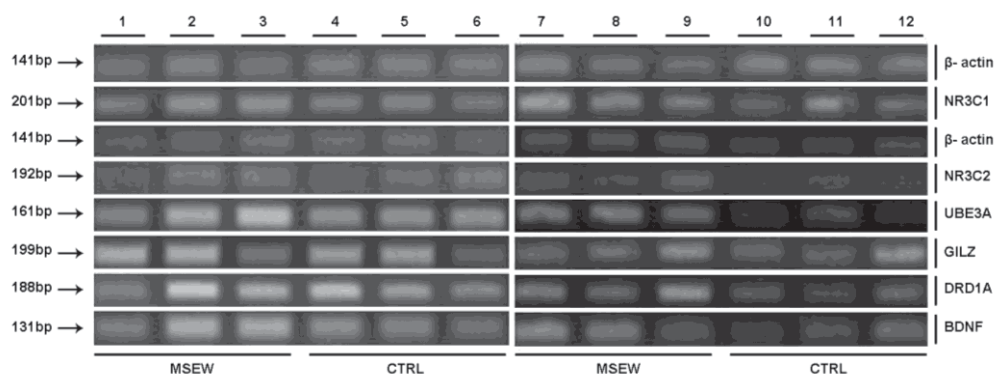
Παρατηρούμε γενικά, πως τα πειραματόζωα ανεξάρτητα της έκθεσης σε χρόνια στρες κατά την πρόωμη ανάπτυξη, αποφεύγουν την κεντρική και εκτεθειμένη περιοχή του Ανοιχτού Πεδίου. Αντιθέτως, προτιμούν να περνούν χρόνο στην περιφέρεια του Πεδίου, κοντά στα τοιχώματα, όπου νοιώθουν προστατευμένα.

#### 4.4.3 Μοριακά αποτελέσματα

Στο στάδιο αυτό διενεργήθηκε θανάτωση των πειραματόζωων και απομόνωση των εγκεφαλικών δομών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τη μελέτη των γονιδίων του άξονα HPA. Πιο συγκεκριμένα, απομονώθηκαν οι εξής επιμέρους περιοχές του εγκεφάλου: αμυγδαλή, υποθάλαμος, ιππόκαμπος και προμετωπιαίος φλοιός. Ακολούθησε απομόνωση DNA και RNA από τους ιστούς της αμυγδαλής και του ιππόκαμπου των 12 δειγμάτων μοριακής ανάλυσης και τα δείγματα φωτομετρήθηκαν για τη διεξαγωγή των μοριακών πειραμάτων.

Πίνακας 4.4.15: Συγκεντρώσεις δειγμάτων DNA και RNA με τη μέθοδο Nanodrop							
Samples	Sample code	Tissue	RNA	DNA	Tissue	RNA	DNA
BIOL.REPLIC	EXPERIMENT	HPC (mg)	(ng/μl)	(ng/μl)	AMY (mg)	(ng/μl)	(ng/μl)
ATE							
1-A3	1-MD	27	135,5	22,9	7	65,2	13,7
1-B11	2-MD	20	71,6	8,4	15	186,5	23
1-C9	3-MD	16	118	9,7	24	205,5	24,1
1-D7	1-CNTL	13	129,6	9,2	6	43,2	7,3
1-D9	2-CNTL	21	176,1	10,9	4	51,7	10,2
1-E13	3-CNTL	25	83,6	4,3	25	48,6	12,9
2-A2	4-MD	9	76,2	11,3	15	99,6	15,8
2-A9	5-MD	16	60	7,4	13	29,2	18,4
2-B12	6-MD	11	82,4	5,8	7	42,7	6,6
2-C5	4-CNTL	12	80,3	11	10	45,6	5,7
2-C9	5-CNTL	10	78,9	6,2	12	64,7	4,7
2-D2	6-CNTL	6	67,1	7,1	6	38,2	5,6

Ακολούθησε επεξεργασία του RNA για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων σε επίπεδο mRNA με τη μέθοδο της ποσοτικής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (qPCR). Στην Εικόνα 4.4.19 παρουσιάζεται η έκφραση των γονιδίων *Nr3c1* (GR), *Nr3c2* (MR), *Ube3a*, *Gilz*, *Drd1a* και *Bdnf*, σε επίπεδο mRNA στον ιστό της αμυγδαλής.



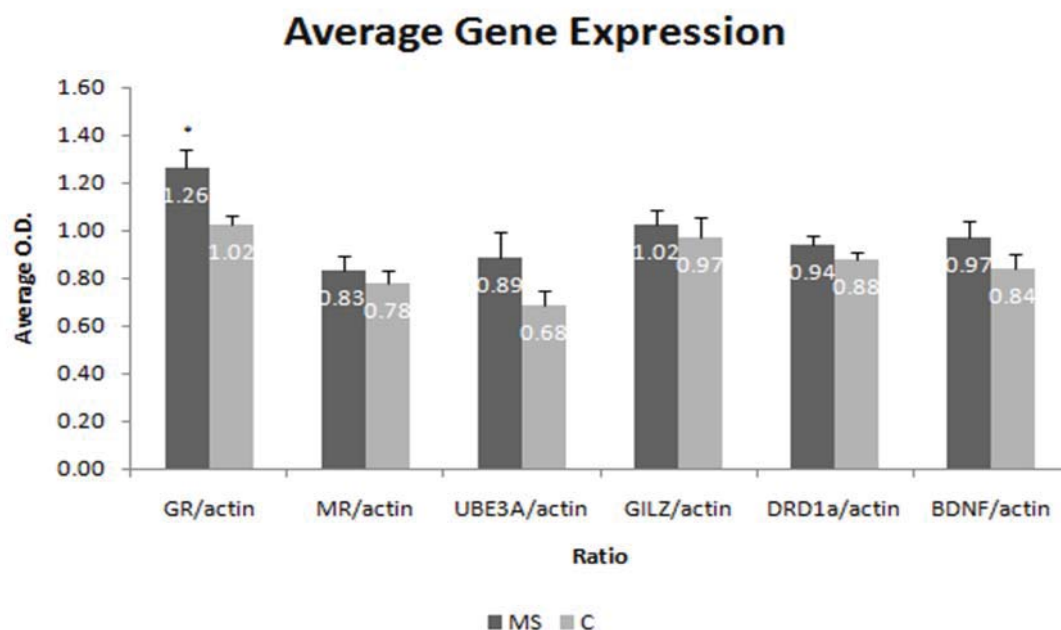
**Εικόνα 4.4.19: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA.** Παρουσιάζεται οπτικά η ένταση των ζωνών σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης 1.6% η οποία αντιπροσωπεύει τα προϊόντα της αντίδρασης ανίχνευσης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Nr3c1*, *Nr3c2*, *Ube3a*, *Gilz*, *Drd1a*, *Bdnf*. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με γονίδιο αναφοράς τη β- ακτίνη. Τα αποτελέσματα ομαδοποιούνται ανά πειραματική ομάδα (1<sup>η</sup> ομάδα- αριστερά, 2<sup>η</sup> ομάδα- δεξιά). MSEW= δείγματα «στρες», CTRL= δείγματα «ελέγχου». 1=MD-1, 2=MD-2, 3=MD-3, 4=CTRL-1, 5=CTRL-2,

6=CTRL-3, 7=MD-4, 8=MD-5, 9=MD-6, 10=CTRL-4, 11=CTRL-5, 12=CTRL-6. Αριστερά αναφέρεται το μοριακό μέγεθος στο οποίο αντιστοιχεί κάθε προϊόν.

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης κάθε γονιδίου, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα (Optical Density, O.D.) με το λογισμικό ImageJ (ij). Στη γραφική παράσταση που ακολουθεί παρουσιάζεται η αύξηση ή μείωση της έκφρασης κάθε γονιδίου για τα δείγματα που αντιπροσωπεύουν την έκθεση στο στρες μητρικού αποχωρισμού σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Για τη διερεύνηση της στατιστικής σημαντικότητας πραγματοποιήθηκε ανάλυση με t-test και διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά για την έκφραση του γονιδίου *Nr3c1* (GR). Η έκφραση του γονιδίου αυξάνει στην αμυγδαλή του εγκεφάλου στα πειραματόζωα που υπέστησαν στρες μητρικής αποστέρησης.

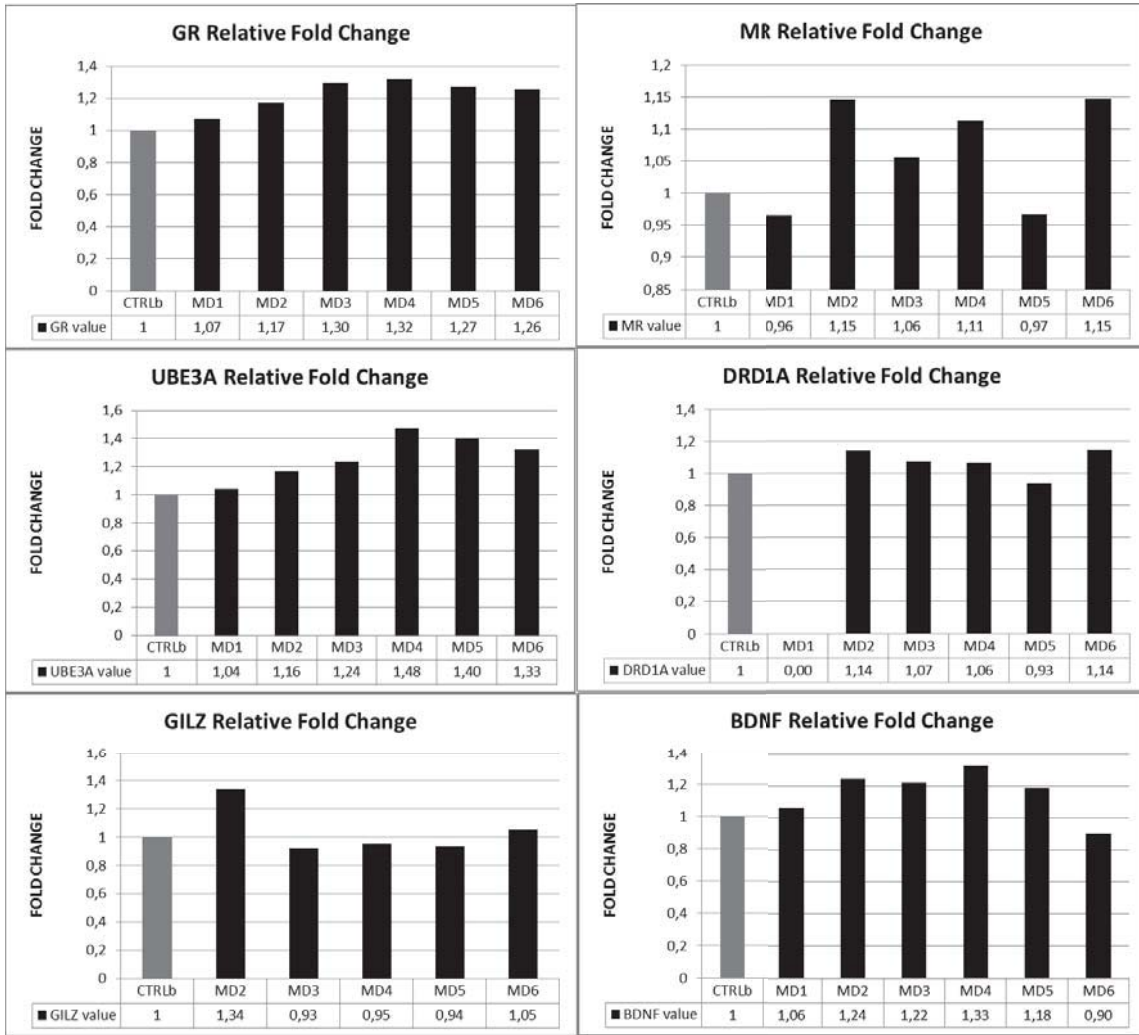
	GR/actin	MR/actin	UBE3A/actin	GILZ/actin	DRD1a/actin	BDNF/actin
<b>MD1</b>	1.01	0.64	0.59	1.01	-	0.81
<b>MD2</b>	1.10	0.76	0.66	1.07	1.03	0.95
<b>MD3</b>	1.22	0.70	0.70	0.74	0.97	0.93
<b>MD4</b>	1.46	0.99	1.18	1.08	0.91	1.22
<b>MD5</b>	1.41	0.86	1.12	1.06	0.80	1.09
<b>MD6</b>	1.39	1.02	1.06	1.19	0.98	0.83
<b>CTRL1</b>	0.95	0.59	0.55	0.88	0.98	0.77
<b>CTRL2</b>	0.98	0.63	0.54	0.91	0.88	0.79
<b>CTRL3</b>	0.89	0.77	0.61	0.61	0.85	0.73
<b>CTRL4</b>	1.01	0.91	0.76	1.15	0.89	0.77
<b>CTRL5</b>	1.19	0.90	0.92	1.04	0.77	0.87
<b>CTRL6</b>	1.12	0.86	0.72	1.21	0.91	1.12
<b>Average MS</b>	1.26	0.83	0.89	1.02	0.94	0.97
<b>Average C</b>	1.02	0.78	0.68	0.97	0.88	0.84

**Πίνακας 4.4.15: Λόγος οπτικής πυκνότητας (O.D.) των γονιδίων προς το γονίδιο αναφοράς β-ακτίνη και μέση οπτική πυκνότητα για τα δείγματα «στρες» και «ελέγχου». MS: Maternal Separation, C: Control.**

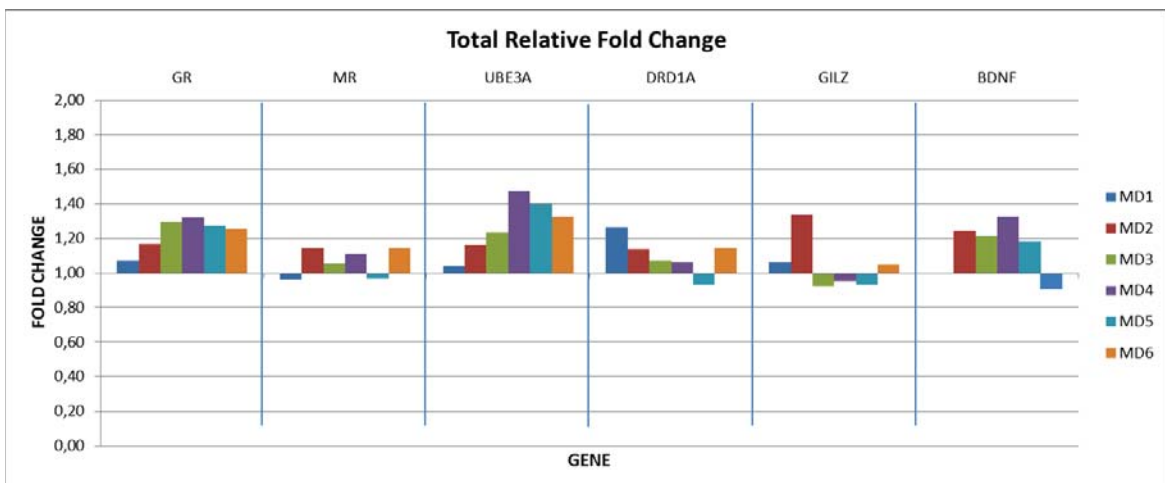


**Εικόνα 4.4.20: Γραφική παράσταση απεικόνισης του μέσου όρου έκφρασης των γονιδίων για το σύνολο των δειγμάτων «στρες» και «ελέγχου».** Πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της οπτικής πυκνότητας των γονιδίων για κάθε πειραματόζωο με το λογισμικό ImageJ και υπολογίστηκε ο λόγος των τιμών κάθε γονιδίου ως προς το γονίδιο αναφοράς (β- ακτίνη). Τα πειραματόζωα ομαδοποιήθηκαν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος έκφρασης για τα δείγματα «στρες» και τα δείγματα «ελέγχου». Παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική διαφορά της έκφρασης του γονιδίου GR μεταξύ των δύο ομάδων. \*P= 0.02, t-test (+SEM). MS: δείγματα «στρες», C: δείγματα «ελέγχου».

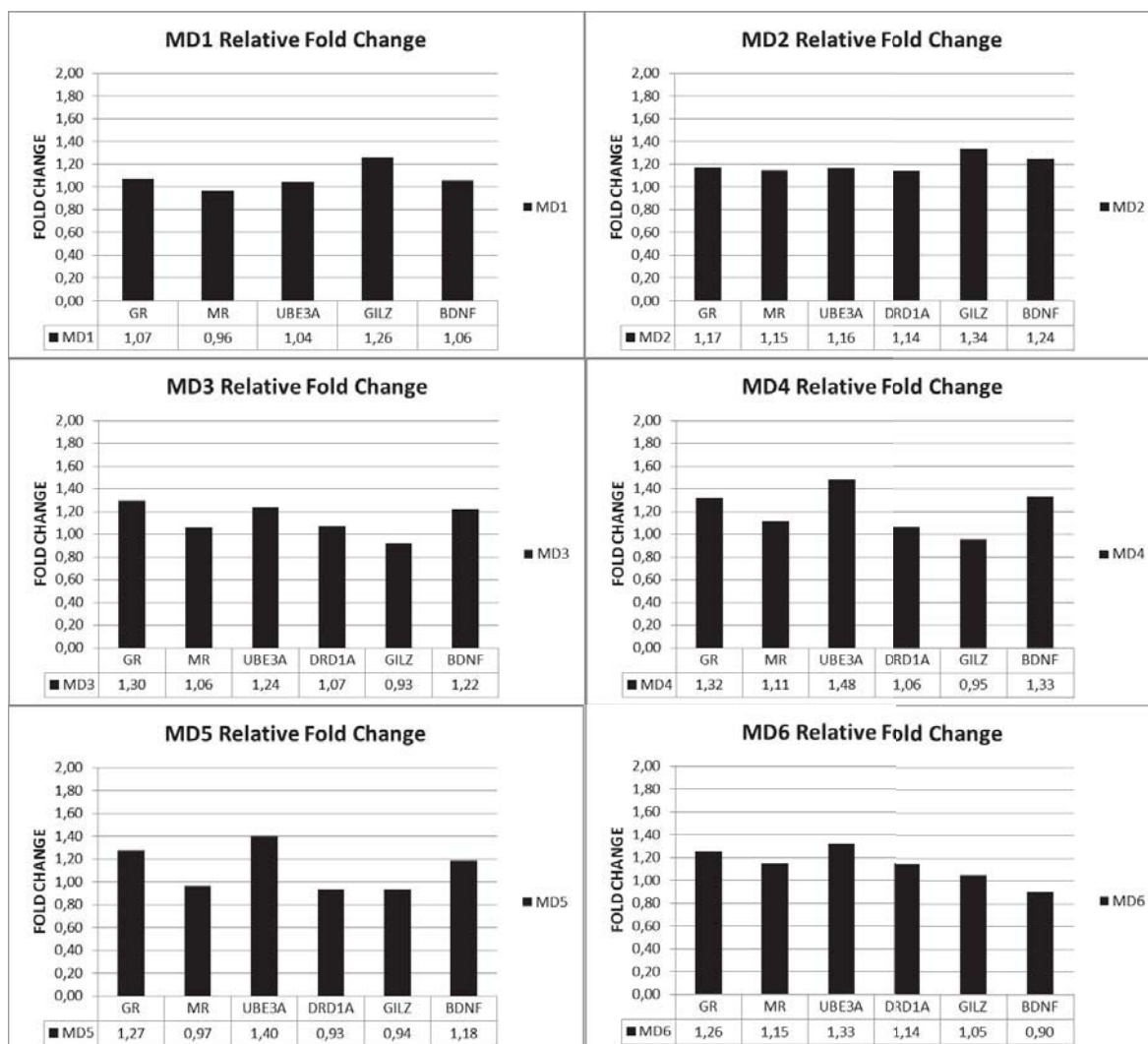
Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των τιμών και υπολογίστηκε η σχετική αύξηση ή μείωση του κάθε δείγματος στρες μητρικής αποστέρησης σε σύγκριση με το μέσο όρο της έκφρασης των δειγμάτων ελέγχου για κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω γραφήματα ως προς κάθε γονίδιο για το σύνολο των δειγμάτων «στρες», καθώς και ως προς κάθε δείγμα «στρες» για το σύνολο των γονιδίων.



Εικόνα 4.4.21: Γραφικές παραστάσεις απεικόνισης της σχετικής έκφρασης κάθε γονιδίου. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε βάσει της μονάδας που αντιπροσωπεύει τη σχετική έκφραση του μέσου όρου των δειγμάτων ελέγχου.

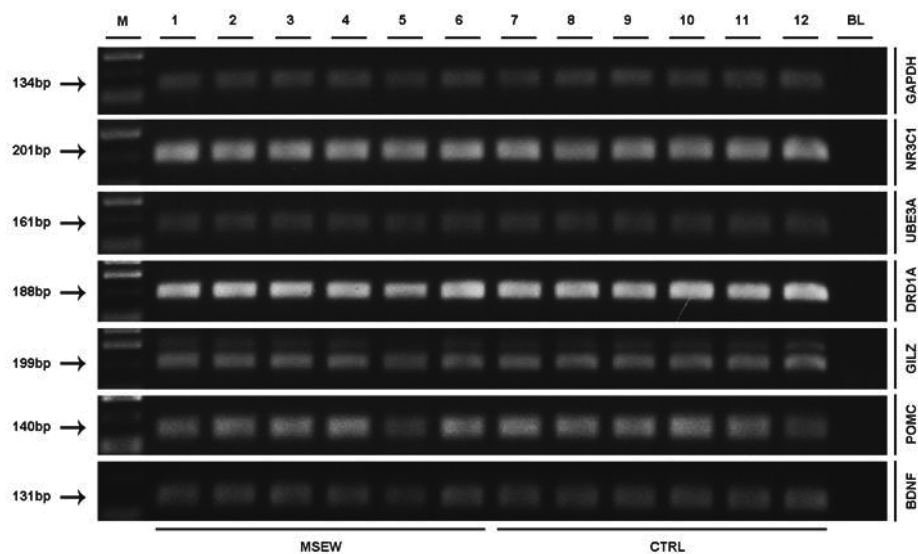


**Εικόνα 4.4.22: Γραφική παράσταση απεικόνισης της σχετικής έκφρασης κάθε γονιδίου για κάθε δείγμα απόκρισης στο στρες μητρικής αποστέρησης.** Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε βάσει της μονάδας που αντιπροσωπεύει τη σχετική έκφραση του μέσου όρου των δειγμάτων ελέγχου. Οι μπάρες που βρίσκονται στην άνω πλευρά του γραφήματος αντιπροσωπεύουν την αύξηση στην έκφραση των γονιδίων ανά δείγμα, ενώ οι μπάρες που βρίσκονται στην κάτω πλευρά του γραφήματος αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα τη μείωση της γονιδιακής έκφρασης.



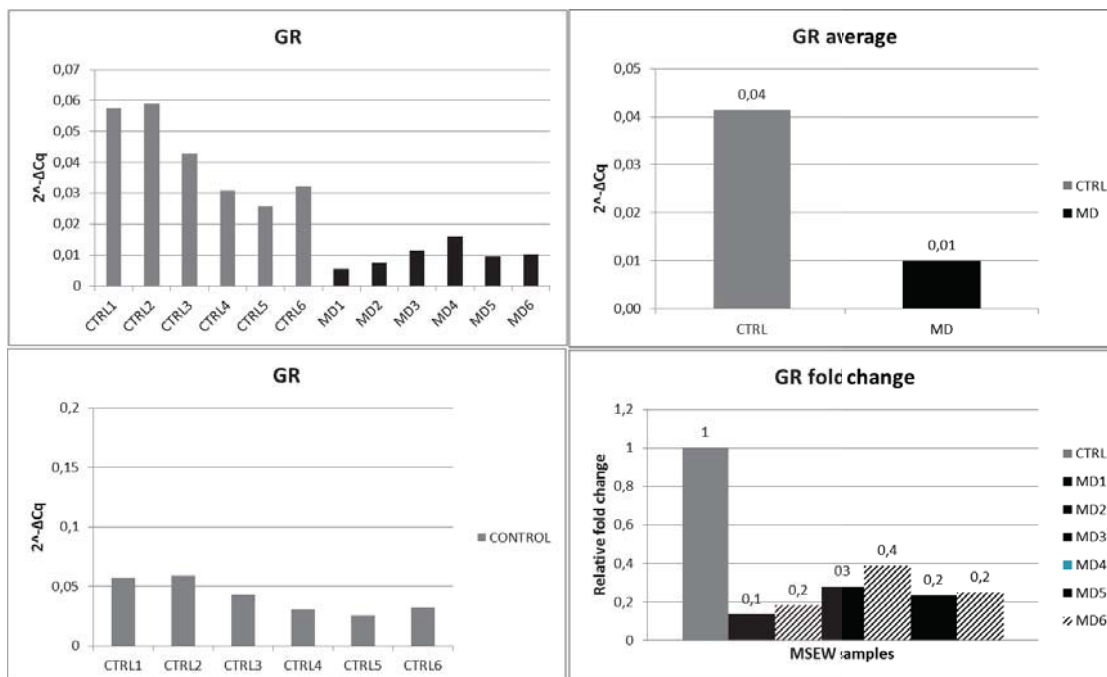
**Εικόνα 4.4.23: Γραφικές παραστάσεις απεικόνισης της σχετικής έκφρασης κάθε δείγματος «στρες».** Η μονάδα αντιπροσωπεύει τη σχετική έκφραση των δειγμάτων «ελέγχου».

Ομοίως, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των αντίστοιχων δειγμάτων του ιππόκαμπου για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *Nr3c1* (GR), *Nr3c2* (MR), *Ube3a*, *Drd1a*, *Gilz*, *Pomc* και *Bdnf*, σε επίπεδο mRNA.

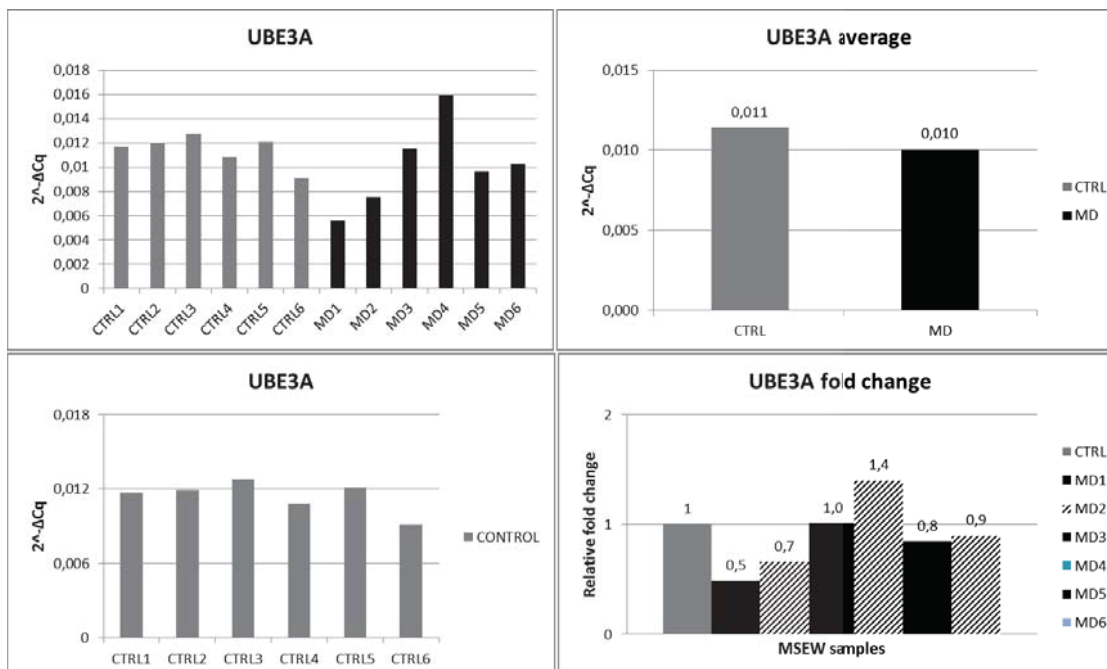


**Εικόνα 4.4.24: Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) για την ανίχνευση της έκφρασης σε επίπεδο mRNA.** Παρουσιάζεται οπτικά η ένταση των ζωνών σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης 1.6% η οποία αντιπροσωπεύει τα προϊόντα της αντίδρασης ανίχνευσης των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Nr3c1*, *Ube3a*, *Drd1a*, *Gilz*, *Pomc*, *Bdnf*. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με γονίδιο αναφοράς το GAPDH. Τα αποτελέσματα ομαδοποιούνται σε δύο ομάδες, MSEW= δείγματα «στρες», CTRL= δείγματα «ελέγχου». M= Μάρτυρας, 1=MD-1, 2=MD-2, 3=MD-3, 4=MD-4, 5=MD-5, 6=MD-6, 7=CTRL-1, 8=CTRL-2, 9=CTRL-3, 10=CTRL-4, 11=CTRL-5, 12=CTRL-6. Αριστερά αναφέρεται το μοριακό μέγεθος στο οποίο αντιστοιχεί κάθε προϊόν.

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης πραγματοποιήθηκε ανάλυση qPCR για τα παραπάνω γονίδια. Η σχετική έκφραση για κάθε δείγμα ανάλυσης υπολογίστηκε βάσει του γονιδίου αναφοράς και του τύπου  $2^{-\Delta Cq} [2^{-(Cq_{gene} - Cq_{GAPDH})}]$ . Στα διαγράμματα που ακολουθούν αναπαρίστανται για κάθε γονίδιο: Α) η έκφραση όλων των δειγμάτων, Β) ο μέσος όρος έκφρασης των δύο ομάδων και Γ) η σχετική έκφραση των δειγμάτων «στρες».



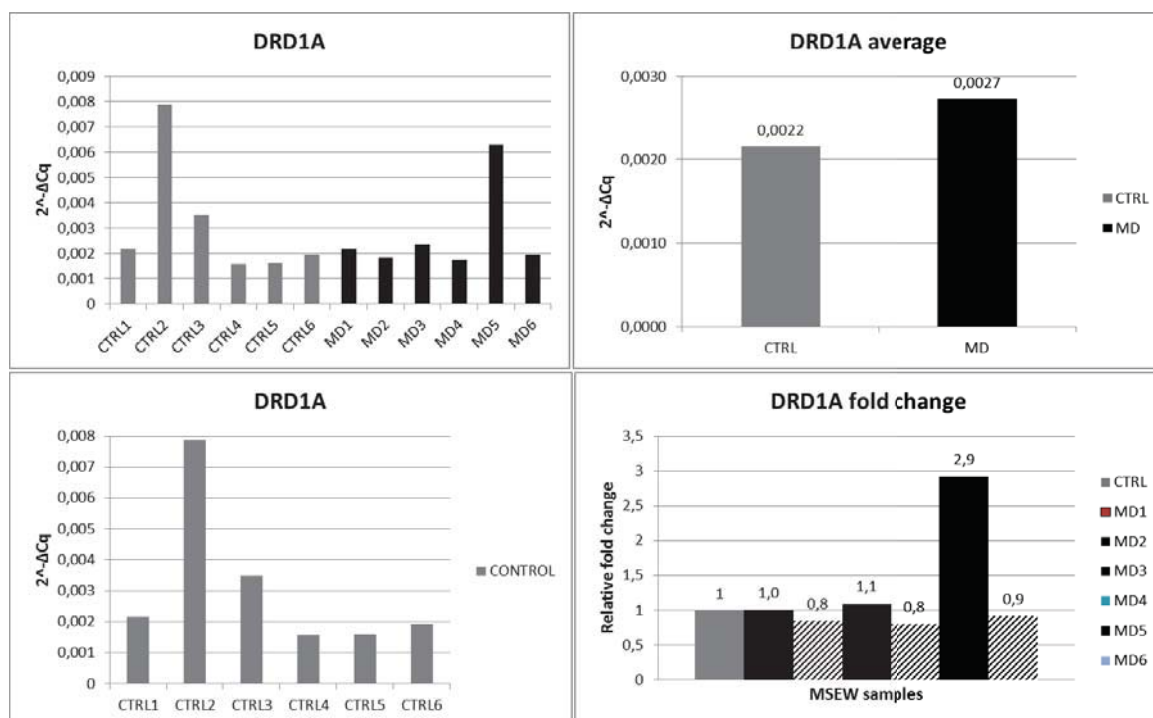
**Εικόνα 4.4.25: Real- Time PCR για την εκτίμηση των μεταβολών στα επίπεδα mRNA του γονιδίου *Nr3c1* (GR). Η έκφραση του γονιδίου μειώνεται στον υπόκαμπο του εγκεφάλου στα πειραματόζωα που υπέστησαν στρες μητρικής αποστέρησης. Η σχετική μείωση του κάθε δείγματος «στρες» παρουσιάζεται ως βαθμός μεταβολής σε σχέση με τα δείγματα «ελέγχου» που αντιπροσωπεύει η μονάδα.**



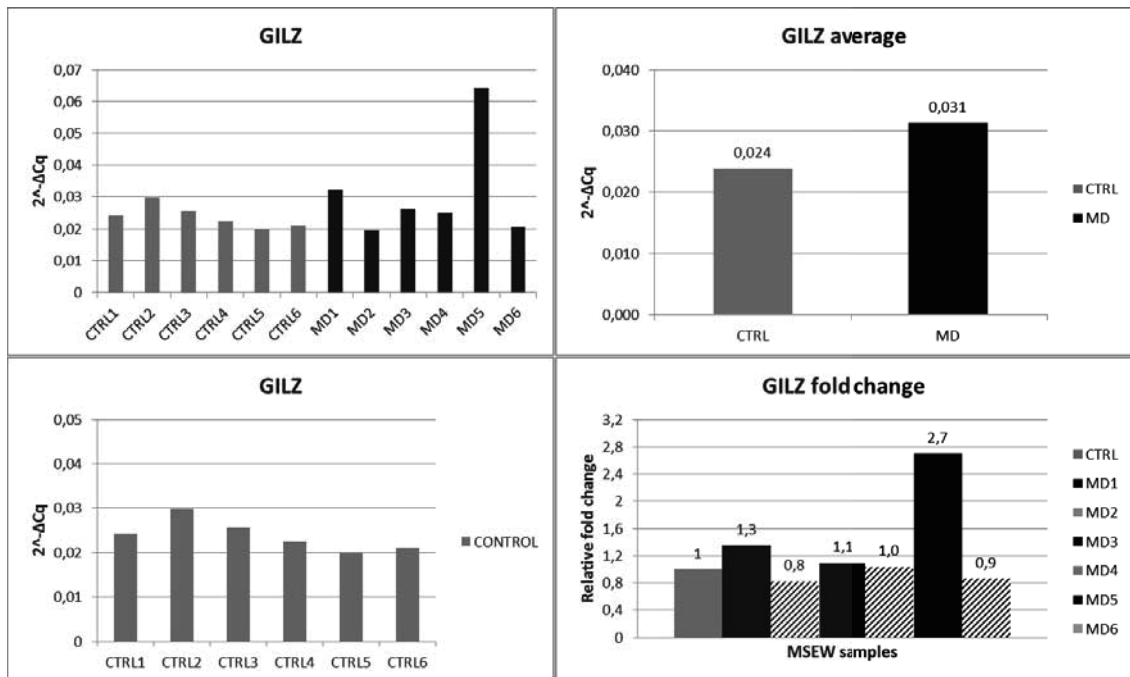
**Εικόνα 4.4.26: Real- Time PCR για την εκτίμηση των μεταβολών στα επίπεδα mRNA του γονιδίου *Ube3a*. Η έκφραση του γονιδίου ανιχνεύεται σε σταθερά επίπεδα, με τάση μείωσης, στον υπόκαμπο του εγκεφάλου στα πειραματόζωα που υπέστησαν στρες μητρικής αποστέρησης στο μέσο όρο των δειγμάτων. Το δείγμα MD4 αποτελεί εξαίρεση με επίπεδα έκφρασης αυξημένα κατά 1,4 φορές σε σχέση με τα δείγματα**



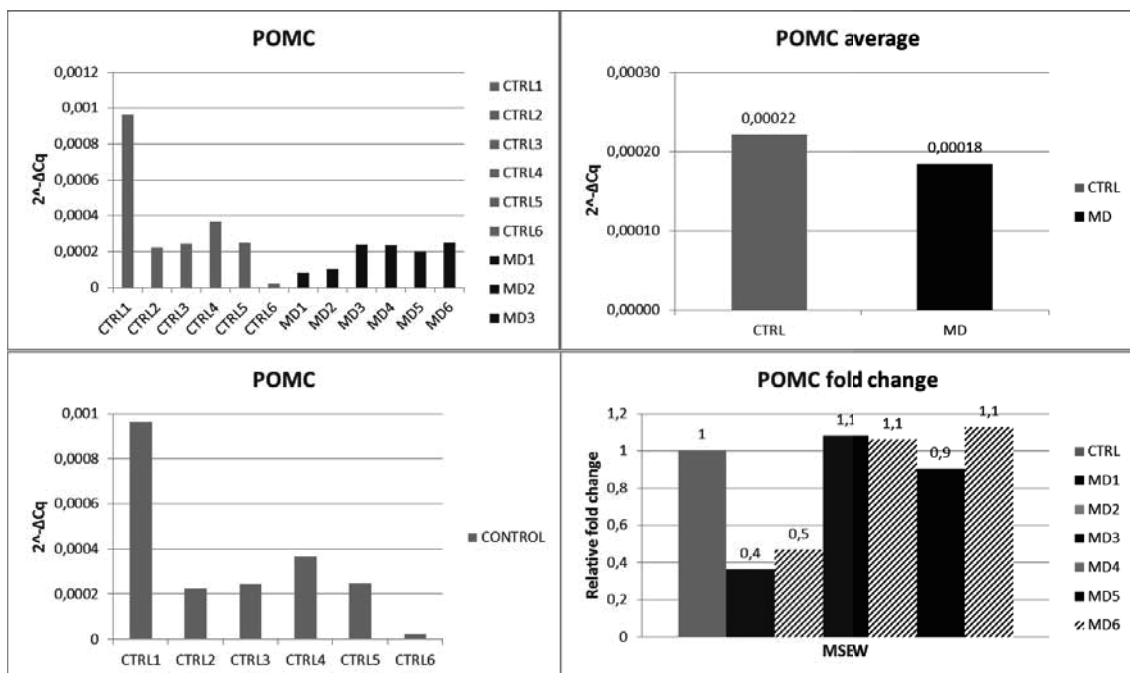
ελέγχου. Η σχετική αλλαγή του κάθε δείγματος «στρες» παρουσιάζεται ως βαθμός μεταβολής σε σχέση με τα δείγματα «ελέγχου» που αντιπροσωπεύει η μονάδα.



**Εικόνα 4.4.27: Real- Time PCR για την εκτίμηση των μεταβολών στα επίπεδα mRNA του γονιδίου *Drd1a*.** Η έκφραση του γονιδίου ανιχνεύεται σε σταθερά επίπεδα στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου στα πειραματόζωα που υπέστησαν στρες μητρικής αποστέρησης στο μέσο όρο των δειγμάτων, με εξαίρεση το δείγμα MD5 το οποίο παρουσιάζει περίπου 3 φορές αύξηση. Η σχετική αλλαγή του κάθε δείγματος «στρες» παρουσιάζεται ως βαθμός μεταβολής σε σχέση με τα δείγματα «ελέγχου» που αντιπροσωπεύει η μονάδα. Το δείγμα CTRL2 εξαιρείται από το μέσο όρο λόγω ακραίας τιμής.

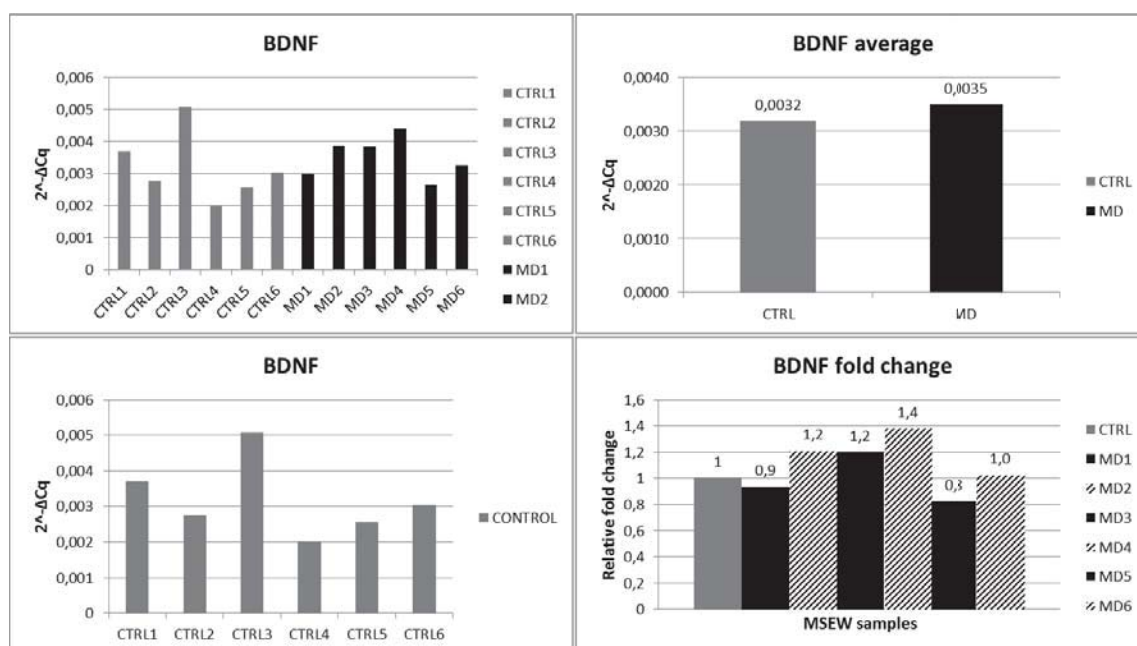


**Εικόνα 4.4.28: Real- Time PCR για την εκτίμηση των μεταβολών στα επίπεδα mRNA του γονιδίου *Gilz*.** Η έκφραση του γονιδίου ανιχνεύεται σε σταθερά επίπεδα, με αυξητική τάση, στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου στα πειραματόζωα που υπέστησαν στρες μητρικής αποστέρησης στο μέσο όρο των δειγμάτων, με εξαίρεση το δείγμα MD5 το οποίο παρουσιάζει περίπου 3 φορές αύξηση. Η σχετική αλλαγή του κάθε δείγματος «στρες» παρουσιάζεται ως βαθμός μεταβολής σε σχέση με τα δείγματα «ελέγχου» που αντιπροσωπεύει η μονάδα.

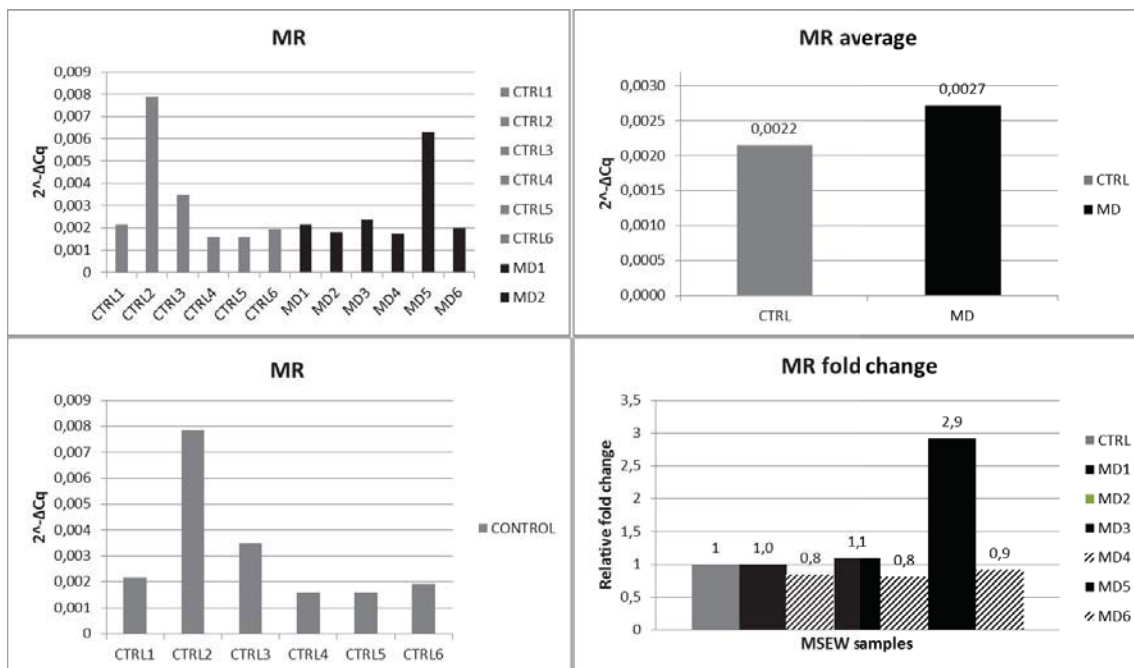


**Εικόνα 4.4.29: Real- Time PCR για την εκτίμηση των μεταβολών στα επίπεδα mRNA του γονιδίου *Pomc*.** Η έκφραση του γονιδίου ανιχνεύεται σε σταθερά επίπεδα, με μειωτική τάση, στον ιππόκαμπο του

εγκεφάλου στα πειραματόζωα που υπέστησαν στρες μητρικής αποστέρησης στο μέσο όρο των δειγμάτων, με εξαίρεση τα δείγματα MD1 και MD2 των οποίων τα επίπεδα έκφρασης είναι περίπου στο μέσον των δειγμάτων «ελέγχου». Η σχετική αλλαγή του κάθε δείγματος «στρες» παρουσιάζεται ως βαθμός μεταβολής σε σχέση με τα δείγματα «ελέγχου» που αντιπροσωπεύει η μονάδα. Το δείγμα CTRL1 εξαιρείται από το μέσο όρο λόγω ακραίας τιμής.

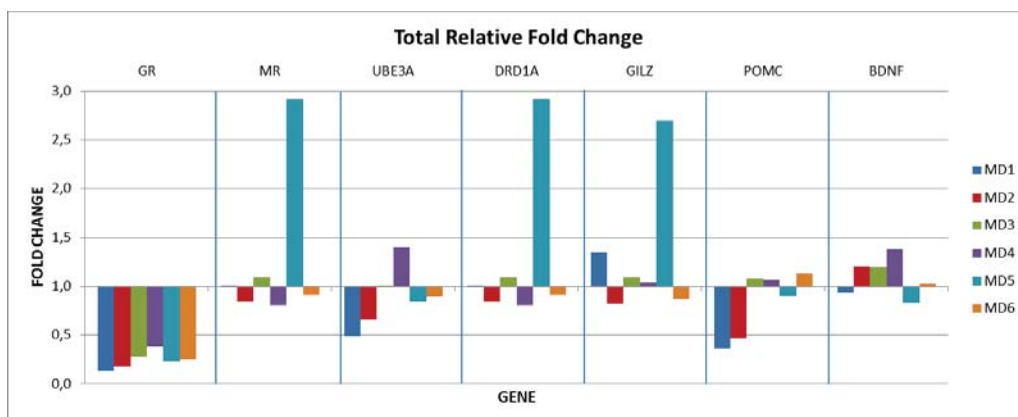


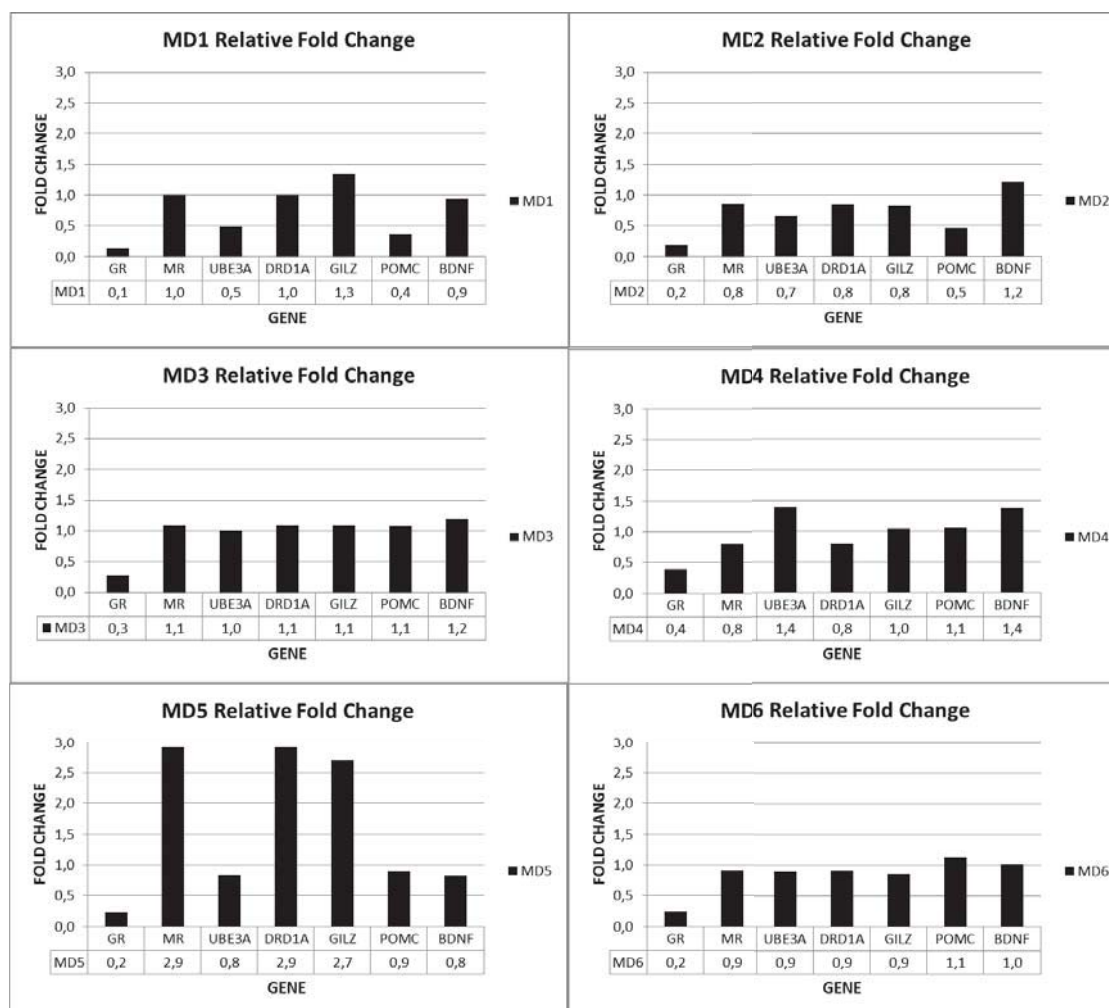
**Εικόνα 4.4.30: Real- Time PCR για την εκτίμηση των μεταβολών στα επίπεδα mRNA του γονιδίου *Bdnf*.** Η έκφραση του γονιδίου ανιχνεύεται σε σταθερά επίπεδα, με αυξητική τάση, στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου στα πειραματόζωα που υπέστησαν στρες μητρικής αποστέρησης στο μέσο όρο των δειγμάτων. Η σχετική αλλαγή του κάθε δείγματος «στρες» παρουσιάζεται ως βαθμός μεταβολής σε σχέση με τα δείγματα «ελέγχου» που αντιπροσωπεύει η μονάδα.



**Εικόνα 4.4.31: Real- Time PCR για την εκτίμηση των μεταβολών στα επίπεδα mRNA του γονιδίου *Nr3c2* (MR). Η έκφραση του γονιδίου ανιχνεύεται σε σταθερά επίπεδα, με τάση αύξησης, στον ιππόκαμπο του εγκεφάλου στα πειραματόζωα που υπέστησαν στρες μητρικής αποστέρησης στο μέσο όρο των δειγμάτων. Η σχετική αλλαγή του κάθε δείγματος «στρες» παρουσιάζεται ως βαθμός μεταβολής σε σχέση με τα δείγματα «ελέγχου» που αντιπροσωπεύει η μονάδα. Το δείγμα CTRL2 εξαιρείται από το μέσο όρο λόγω ακραίας τιμής.**

Τέλος, τα αποτελέσματα ποσοτικής έκφρασης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου παρουσιάζονται ανά δείγμα απόκρισης στο στρες ως σχετική έκφραση κάθε γονιδίου. Στα διαγράμματα που ακολουθούν αναπαρίστανται για κάθε δείγμα η έκφραση όλων των γονιδίων.

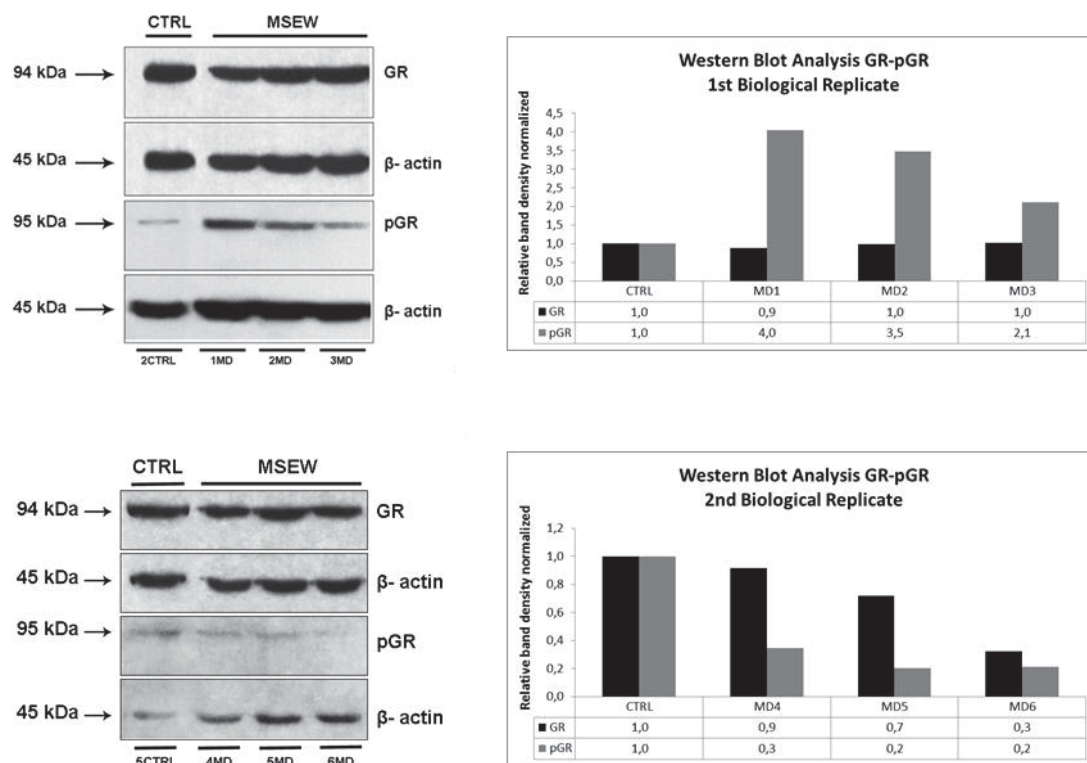




**Εικόνα 4.4.32: Real- Time PCR για την εκτίμηση των μεταβολών στα επίπεδα mRNA των γονιδίων ανά δείγμα απόκρισης στο στρες. Γραφικές παραστάσεις απεικόνισης της σχετικής έκφρασης κάθε γονιδίου για κάθε δείγμα απόκρισης στο στρες μητρικής αποστέρησης.** Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε βάσει της μονάδας που αντιπροσωπεύει τη σχετική έκφραση του μέσου όρου των δειγμάτων ελέγχου. Στο συγκεντρωτικό διάγραμμα στη βάση του άξονα X βρίσκεται η μονάδα που αντιπροσωπεύει τη σχετική έκφραση των δειγμάτων «ελέγχου». Οι μπάρες που βρίσκονται στην άνω πλευρά του γραφήματος αντιπροσωπεύουν την αύξηση στην έκφραση των γονιδίων ανά δείγμα, ενώ οι μπάρες που βρίσκονται στην κάτω πλευρά του γραφήματος αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα τη μείωση της γονιδιακής έκφρασης.

Η μελέτη της έκφρασης του GR πραγματοποιήθηκε και σε επίπεδο πρωτεΐνης καθώς σε επίπεδο mRNA, και διαπιστώθηκε σημαντική ενεργοποίηση αυτού του μορίου, γεγονός που αντικατοπτρίζει την απόκριση του οργανισμού στο στρες μητρικής αποστέρησης. Πρωτεϊνικό εκχύλισμα από τον ιπόκαμπο των αντίστοιχων δειγμάτων ηλεκτροφορήθηκε, μεταφέρθηκε σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης και επώαστηκε με αντισώματα για την ενεργή και ανενεργή μορφή του GR. Το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έδειξε σημαντική απόκριση της ενεργής μορφής του GR

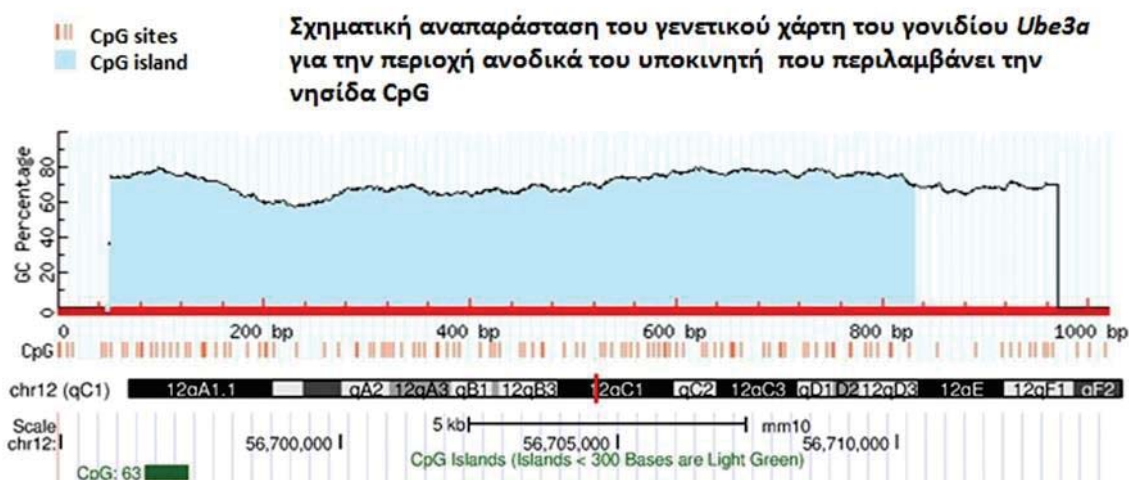
στα δείγματα που αντιστοιχούν στα στρεσαρισμένα πειραματόζωα. Πιο συγκεκριμένα, ανιχνεύεται ποσοτικά αυξημένη έκφραση της ενεργής μορφής του μορίου για τα δείγματα απόκρισης στο στρες μητρικής αποστέρησης της πρώτης πειραματικής ομάδας και μειωμένη έκφραση για τα δείγματα «στρες» της δεύτερης πειραματικής ομάδας. Για τον έλεγχο ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε η  $\beta$ - ακτίνη. Η ποσοτικοποίηση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό imagej.



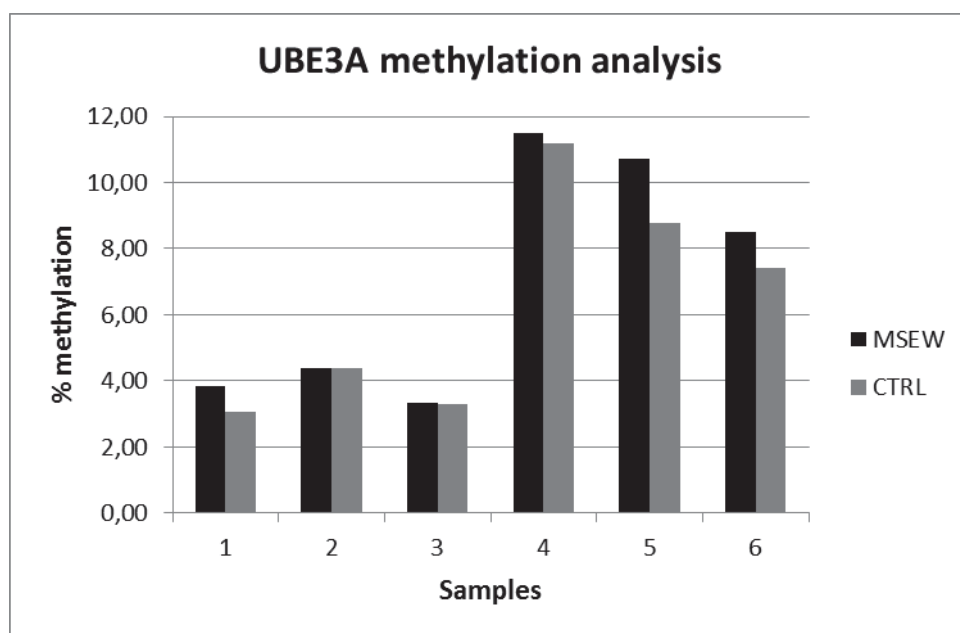
**Εικόνα 4.4.33: Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την εκτίμηση των επιπέδων της πρωτεΐνης GR και της φωσφορυλιωμένης μορφή pGR.** Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης και του βαθμού φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης GR μεταξύ στρεσαρισμένων ζώων (MSEW) και δειγμάτων ελέγχου (CTRL) σε εκχύλισμα ιππόκαμπου. Παρατηρείται μια αύξηση της ενεργής μορφής του GR στα δείγματα «στρες» της πρώτης πειραματικής ομάδας και μείωση αντίστοιχα στα δείγματα της δεύτερης πειραματικής ομάδας.

Το μόριο UBE3A, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της ενεργότητας του GR. Η μελέτη της έκφρασης σε επίπεδο mRNA δεν έδειξε σημαντικές αλλαγές μεταξύ των πειραματικών ομάδων, παρόλα αυτά το μόριο αυτό αποτελεί πιθανά μεταγραφικό στόχο του GR και πιθανώς συμμετέχει στη ρύθμιση του άξονα HPA κατά την απόκριση σε στρεσογόνες καταστάσεις. Γι' αυτό το λόγο, το μόριο αυτό εξετάστηκε σε επίπεδο επιγενετικής ρύθμισης. Πιο συγκεκριμένα, εντοπίστηκε μια περιοχή πλούσια σε νουκλεοτίδια CG (νησίδια CpG), η οποία γειτνιάζει με τον υποκινητή

του γονιδίου και αποτελεί κρίσιμη περιοχή ανίχνευσης μεθυλιωτικών τροποποιήσεων. Το DNA των δειγμάτων επεξεργάστηκε κατάλληλα για την ανάλυση του ποσοστού μεθλίωσης της περιοχής ενδιαφέροντος του γονιδίου *Ube3a* με την ειδική μέθοδο Pyrosequencing.

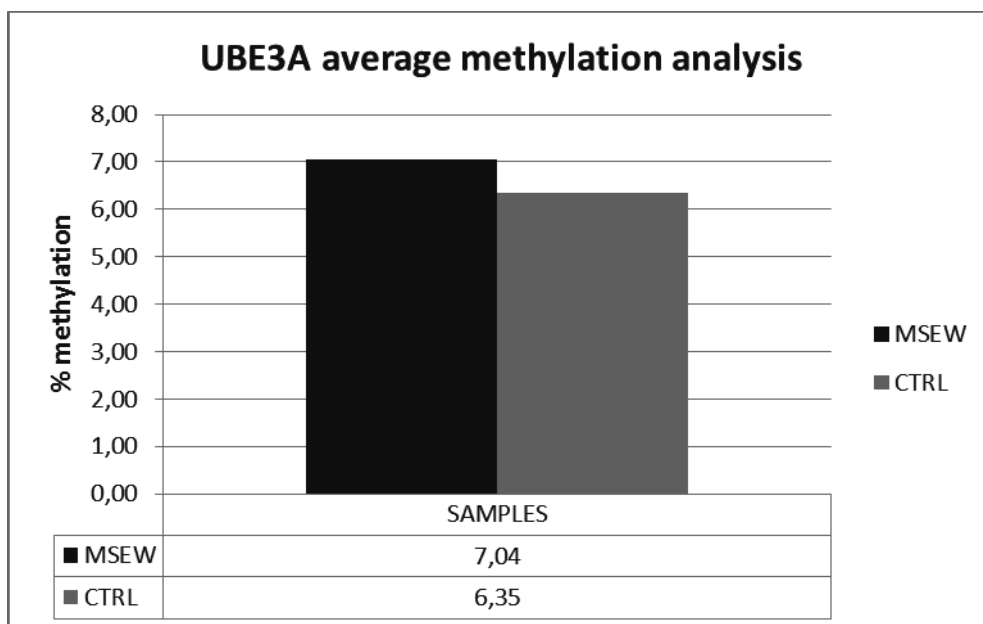


Εικόνα 4.4.34: Γενετικός χάρτης της χρωμοσωμικής περιοχής που εδράζεται το γονίδιο *Ube3a*. Το γονίδιο εντοπίζεται στην περιοχή 12qC1 του χρωμοσώματος 12 του μυός. Η περιοχή ανάλυσης επιγενετικών αλλαγών βρίσκεται ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου και αναφέρεται ως CpG:63. Ολόκληρη η περιοχή είναι πλούσια σε CG νουκλεοτίδια και σημεία ανάλυσης μεθλίωσης (CpG sites).

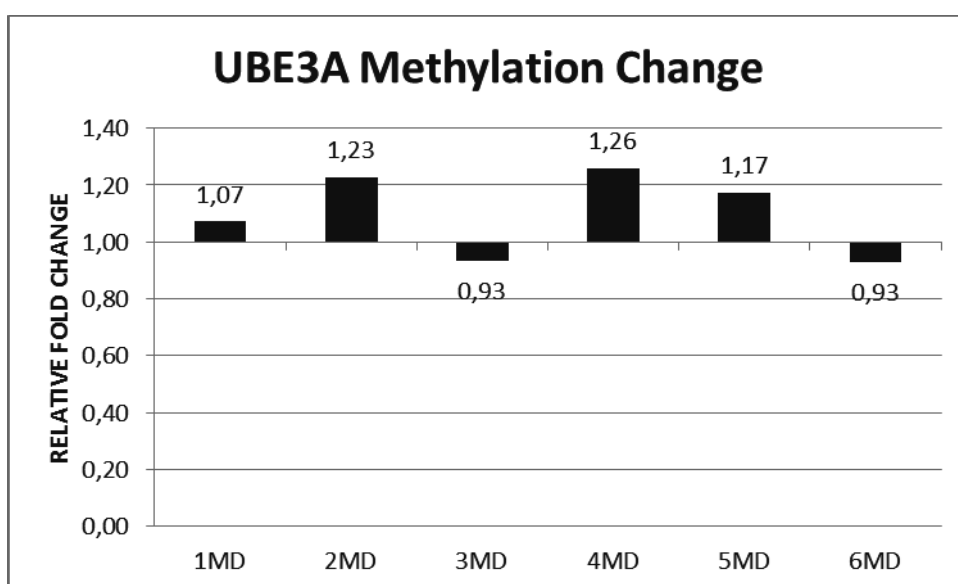


Εικόνα 4.4.35: Ανάλυση μεθλίωσης με την τεχνική Pyrosequencing. Γραφική παράσταση ανάδειξης μεταβολών στο επιγενετικό προφίλ του γονιδίου *Ube3a*. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος των

εσωτερικών σημείων ανάλυσης 6 δειγμάτων «ελέγχου» και 6 δειγμάτων «στρες» για κάθε ένα από τα 12 δείγματα ξεχωριστά. Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων βασίζεται στη διεξαγωγή επαναλήψεων της αλληλούχισης.



**Εικόνα 4.4.36: Ανάλυση μεθυλίωσης με την τεχνική Pyrosequencing.** Γραφική παράσταση ανάδειξης μεταβολών στο επιγενετικό προφίλ του γονιδίου *Ube3a*. Τα δεδομένα παρουσιάζονται σε 2 ομάδες ως μέσος όρος των εσωτερικών σημείων ανάλυσης 6 δειγμάτων «ελέγχου» και 6 δειγμάτων «στρες». Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων βασίζεται στη διεξαγωγή επαναλήψεων της αλληλούχισης. Παρατηρείται αυξημένη μεθυλίωση στην ομάδα δειγμάτων που αντιπροσωπεύει την έκθεση σε χρόνιο στρες.

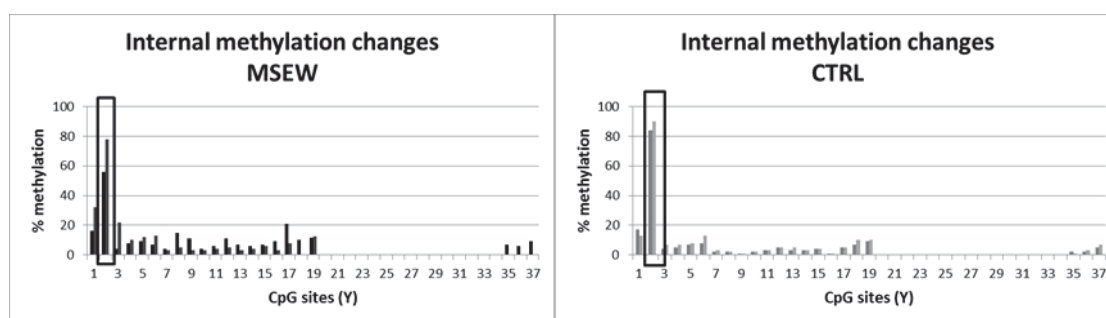


**Εικόνα 4.4.37: Γραφική παράσταση ανάδειξης σχετικών μεταβολών στο επιγενετικό προφίλ του γονιδίου *Ube3a*.** Τα δεδομένα παρουσιάζονται ατομικά για κάθε ένα από τα 6 δείγματα «στρες» αναφορικά με τη μονάδα που αντιπροσωπεύει τα δείγματα «ελέγχου». Παρατηρείται υπο-μεθυλίωση για τα δείγματα



3MD και 6MD. Η σχετική σύγκριση έγινε για κάθε πειραματική ομάδα ξεχωριστά με τα αντίστοιχα δείγματα «ελέγχου».

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η λεπτομερής ανάλυση των εσωτερικών σημείων αναγνώρισης μεθυλίωσης κατά μήκος της περιοχής CpG, αποκαλύπτει σημειακά έντονες διαφορές στο ποσοστό μεθυλίωσης σε ορισμένες θέσεις για όλα τα δείγματα που εξετάζονται. Παρακάτω παρατίθεται ένα παράδειγμα της περίπτωσης που περιγράφεται, για ένα δείγμα «ελέγχου» και ένα δείγμα «στρες». Η παρατήρηση αυτή παραπέμπει κατ' επέκταση στην υπόθεση για περαιτέρω αναζήτηση σημείων πρόσδεσης παραγόντων που επηρεάζουν το επιγενετικό προφίλ του γονιδίου στις θέσεις αυτές.



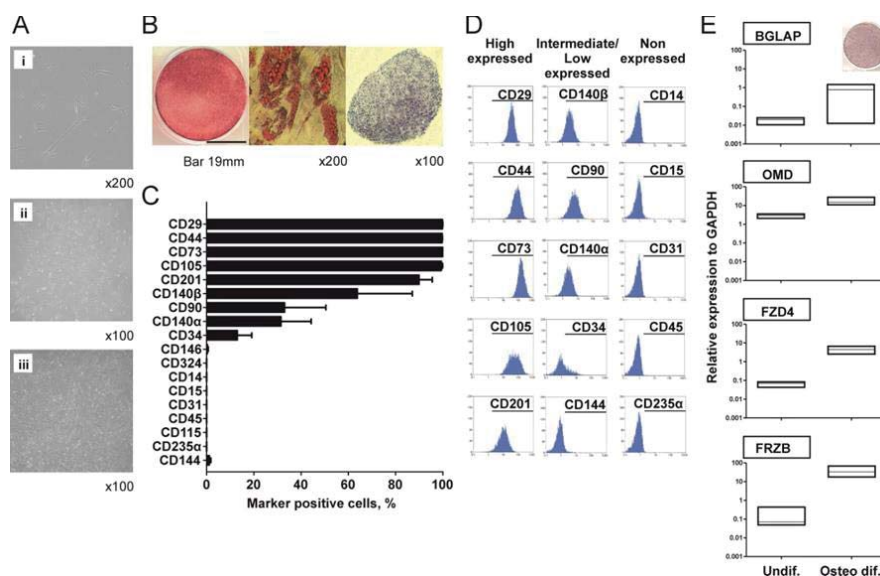
**Εικόνα 4.4.38:** Αντιπροσωπευτικές γραφικές παραστάσεις των εσωτερικών μεταβολών κατά μήκος της περιοχής ανάλυσης με τη μέθοδο Pyrosequencing. Το συγκεκριμένο τμήμα «ανάγνωσης μεθυλίωσης» περιλαμβάνει 37 θέσεις ανάλυσης (Y). Σε κάθε θέση (Y) αντιστοιχούν δύο μπάρες οι οποίες αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των επαναλήψεων της αλληλούχισης. Παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικά η ανάλυση για ένα δείγμα «στρες» (MSEW) και ένα δείγμα «ελέγχου» (CTRL) με δύο επαναλήψεις της μεθόδου για το καθένα. Οι θέσεις 21 με 33 είναι κενές λόγω αποτυχίας ανίχνευσης μεθυλίωσης του λογισμικού.

#### 4.5 Μηχανικό στρες, πρότυπο μεθυλίωσης *GNAS* και οστεογένεση

Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε επίπεδο κυτταροκαλλιέργειας μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενα από υποδόριο λίπος (hAT-MSCs) υπό την επίδραση στρες μηχανικής πίεσης κατά την πορεία της οστεογένεσης. Παρουσιάζονται αφενός οι φαινοτυπικές αλλαγές που παρατηρούνται με οπτική μικροσκοπία και αφετέρου οι μοριακές αλλαγές που παρατηρούνται σε επιγενετικό επίπεδο.

#### 4.5.1 Χαρακτηρισμός της μορφολογίας και επιφανειακός φαινότυπος των καλλιιεργούμενων κυττάρων hAT-MSCs

Τα προϊόντα ενζυμικής λύσης που προήλθαν από τον απομονωμένο λιπώδη ιστό, επιστρώθηκαν σε τρυβλία για τη δημιουργία της πρωτογενούς καλλιέργειας. Μετά από δύο ημέρες καλλιέργειας, τα κύτταρα απέκτησαν τυπική μορφολογία ινοβλαστών (Εικόνα 4.5.1 (Ai)). Στην πορεία των 10 ημερών τα κύτταρα παρατηρούνταν ανά μονάδες (Εικόνα 4.5.1 (Aii)), ενώ την 20<sup>η</sup> ημέρα κατάφεραν να καλύψουν το ταπήτιο του τρυβλίου (Εικόνα 4.5.1 (Aiii)). Κατά το πέρασμα στη γενιά 3 τα hAT-MSCs παρουσίασαν τριπλή δυνατότητα διαφοροποίησης: 1) η διαφοροποίηση με παράγοντες οστεογένεσης για 21 ημέρες οδήγησε στην εναπόθεση ασβεστίου στη μονόστοιβη επιφάνεια των κυττάρων (Εικόνα 4.5.1 (B αριστερά)), 2) η διαφοροποίηση υπό συνθήκες λιπογένεσης οδήγησε στο μετασχηματισμό των hAT-MSCs σε λιποκύτταρα μετά από 21 ημέρες καλλιέργειας με τη δημιουργία λιπώδους στρώματος μέσα στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 4.5.1 (B κέντρο)), 3) η πρόκληση χονδρογένεσης σε καλλιέργειες 3-D για 15 ημέρες οδήγησε στο σχηματισμό ιζήματος χόνδρου και τη δημιουργία χονδροβλαστών οι οποίοι έγιναν ορατοί μετά από χημική χρώση του κυτταροπλάσματος (Εικόνα 4.5.1 (B δεξιά)). Επιπλέον, η επιφανειακή φαινοτυπία ανέδειξε την ομοιογένεια των κυττάρων κατά το πέρασμα γενιάς 3. Οι καλλιέργειες που προήλθαν από τους δότες ηλικίας 55, 67, 74, 77 ετών και εξετάστηκαν για ένα σύνολο μορφολογικών δεικτών αποκάλυψαν μια ομοιόμορφα θετική έκφραση σε δείκτες μεσεγχυματικού φαινότυπου ανεξάρτητα από την ηλικία των ασθενών (Εικόνα 4.5.1 (C)). Σε συμφωνία με τα κριτήρια ISCT, τα κύτταρα βρέθηκαν θετικά σε υψηλό ποσοστό (80%) για τους πιο βασικούς δείκτες (CD29, CD44, CD73, CD105, CD201), αλλά χωρίς να εκφράζουν τους ενδοθηλιακούς και αιμοποιητικούς δείκτες (CD14, CD15, CD31, CD45, CD235a). Επιπλέον, ανιχνεύθηκε ενδιάμεση έκφραση για τους δείκτες CD90, CD140α και CD140β και χαμηλή έκφραση για τους δείκτες CD34 και CD144 (Εικόνα 4.5.1 (D)). Η έκφραση των δεικτών CD140α και CD140β επιβεβαιώνει την άμεση συσχέτιση με το αγγειακό σύστημα και την ανάπτυξη μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων μέσα από τις αλληλεπιδράσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων στο λιπώδη ιστό. Τέλος, η οστεογένεση κατά το πέρασμα γενεάς 3 επιβεβαιώθηκε αφενός από τη θετική απόκριση του δείκτη αλκαλικής φωσφατάσης, και αφετέρου από τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των σχετικών γονιδίων (BGLAP, OMD, FZD4, FRZB) (Εικόνα 4.5.1 (E)).



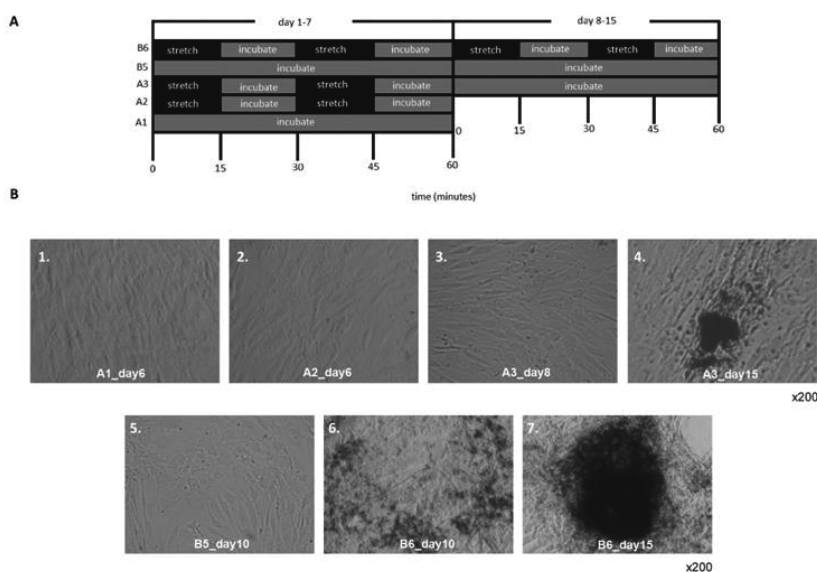
#### Εικόνα 4.5.1: Απομόνωση και χαρακτηρισμός ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων.

Αντιπροσωπευτικές εικόνες καλλιέργειας στις οποίες φαίνεται η μορφολογία ινοβλαστών μετά την απομόνωση από υποδόριο λιπώδη ιστό (Ai), CFU-F την 10<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας (Aii), και κάλυψη του ταπητίου την 20<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας. Τριπλή ιδιότητα των κυττάρων κατά το πέρασμα 3 (οστεογένεση-αριστερά, λιπογένεση- κέντρο, χονδρογένεση- δεξιά) (B). Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων κατά το πέρασμα 3 παρουσιάζει υψηλά επίπεδα ειδικών για το μεσεγχυματικό φαινότυπο δεικτών, αλλά μηδενική έκφραση των ενδοθηλιακών και αιμοποιητικών δεικτών (C, D). Μοριακό προφίλ της οστεογένεσης των hAT-MSCs (D). Η πρόκληση οστεογένεσης οδήγησε επιτυχώς σε μετασχηματισμό των hAT-MSCs σε οστεοβλάστες (δείκτης αλκαλικής φωσφατάσης), το οποίο επιβεβαιώνεται με τα υψηλά επίπεδα χαρακτηριστικών για οστεογένεση μεταγράφων (E).

#### 4.5.2 Επιδράσεις του μηχανικού στρες στη μορφολογία και τη διαφοροποίηση των hTA-MSCs

Το μηχανικό στρες, με τη μορφή βίαιης διάτασης, δεν ήταν επιβλαβές για τη βιωσιμότητα των κυττάρων, αλλά επηρέασε τη μορφολογία και ενέτεινε τη διαδικασία της διαφοροποίησης χρονικά. Τα ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που απομονώθηκαν από τους πιο ηλικιωμένους δότες και υπέστησαν το καθημερινό πρόγραμμα μηχανικού στρες, εμφάνισαν σχηματισμό ασβεστίου νωρίτερα από ότι αναμενόταν στην τυπική πορεία της οστεογένεσης με βιοχημικούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, την πειραματική ημέρα 6 τα στρεσαρισμένα κύτταρα σχημάτιζαν ομάδες μεταξύ τους, ενώ μετά από ακόμα 2 ημέρες παρατηρήσαμε κάποια σημάδια έναρξης της ασβεστοποίησης. Την πειραματική ημέρα 10 πλέον ο σχηματισμός αλάτων ήταν σαφής,

ενώ την τελευταία ημέρα του πειράματος (15<sup>η</sup>) η διαφοροποίηση προς οστεοκύτταρα ήταν σχεδόν ολοκληρωμένη. Αυτή η μορφολογική εξέλιξη ήταν χαρακτηριστική για τα κύτταρα που συνεχόμενα υπέστησαν μηχανικό στρες επί 15 ημέρες. Από την άλλη μεριά, τα κύτταρα που βρίσκονταν σε ενδιάμεση κατάσταση και από την 7<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος σταμάτησαν να εκτίθενται σε συνθήκες μηχανικού στρες έδειξαν παρόμοια συμπεριφορά με πιο αργό όμως ρυθμό. Επομένως η διάρκεια της διάτασης αποδείχθηκε βασικός παράγοντας ρύθμισης της εξέλιξης του φαινοτύπου. Ένας επιπλέον παράγοντας που εικάζεται ότι διαδραματίζει κάποιο ρόλο είναι η ηλικία του αρχικού δότη. Στα πειράματά μας διαπιστώσαμε ότι παρόλο που όλα τα δείγματα έδειξαν την ίδια απόκριση στους δείκτες εξέλιξης της οστεογένεσης με τον τυπικό προγραμματισμό, εμφάνισαν διαφορετική ανταπόκριση κατά τον επαναπρογραμματισμό τους ύστερα από την επίδραση του μηχανικού στρες.

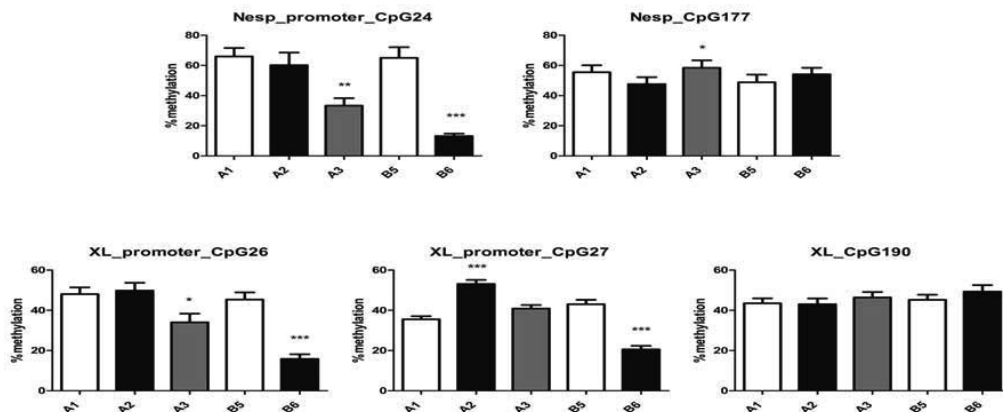


**Εικόνα 4.5.2: Μορφολογικές αλλαγές των διαφοροποιούμενων κυττάρων κατά τη διάρκεια της εφαρμογής κυκλικού μηχανικού στρες για 15 ημέρες.** Οι συνθήκες στρες περιελάμβαναν: A1= επώαση χωρίς στρες για 7 ημέρες (δείγμα ελέγχου 7 ημερών), A2= 60 λεπτά καθημερινού στρες για 7 ημέρες, A3= 60 λεπτά καθημερινού στρες για 7 ημέρες και επώαση σε συνθήκες ηρεμίας για τις επόμενες 7 ημέρες (ενδιάμεση συνθήκη), B5= επώαση χωρίς στρες για 15 ημέρες (δείγμα ελέγχου 15 ημερών), B6= 60 λεπτά καθημερινού στρες για 15 ημέρες (A). Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των δύο πειραμάτων με κύτταρα που προήλθαν από τους πιο ηλικιωμένους δότες. Οι μορφολογικές παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν τον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων μετά την εφαρμογή του μηχανικού στρες. Η σύγκριση των κυττάρων που υπέστησαν στρες με αυτά που παρέμειναν σε φυσιολογικές συνθήκες διαφοροποίησης απέδειξε ότι το

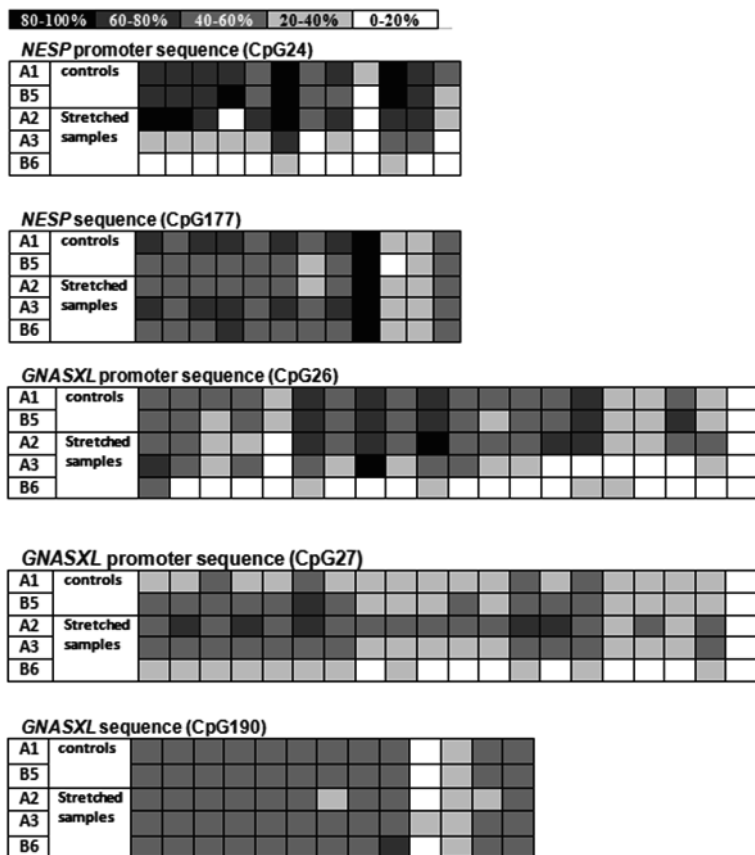
χρόνιο τέντωμα των κυττάρων σε συνδυασμό με τους βιοχημικούς οστεοποιητικούς παράγοντες προάγει το σχηματισμό εστιών ασβεστίου που σηματοδοτούν την έναρξη της οστεογένεσης. Οι φωτογραφίες 1 και 5 αντιπροσωπεύουν τις συνθήκες ηρεμίας για 6 και 10 ημέρες αντίστοιχα, η φωτογραφία 2 το αποτέλεσμα του στρες μετά από 6 ημέρες, οι φωτογραφίες 3 και 4 το αποτέλεσμα του στρες μετά από 7 ημέρες, η φωτογραφία 6 το αποτέλεσμα του στρες μετά από 10 ημέρες και η φωτογραφία 7 το αποτέλεσμα του στρες μετά από 15 ημέρες (B).

#### **4.5.3 Το μηχανικό ερέθισμα προάγει την DNA απομεθυλίωση στις περιοχές των υποκινητών των οστεο- ειδικών ισομορφών του *GNAS***

Η ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης των περιοχών *NESP* CpG24 και *GNASXL* CpG26, οι οποίες βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή, αποκάλυψε ότι ο περιβαλλοντικός παράγοντας του μηχανικού στρες επηρέασε το επιγενετικό προφίλ του γονιδίου παράλληλα με το πρότυπο διαφοροποίησης. Η έκθεση των hAT-MSCs κυττάρων σε ένα καθημερινό πρόγραμμα μηχανικού ερεθίσματος για 15 ημέρες, είχε ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA. Το ποσοστό μεθυλίωσης ανά CG αλλά και συνολικά για τις νησίδες CpG του υποκινητή μειώθηκε σημαντικά μετά από 15 ημέρες μηχανικούς στρες, ενώ οι αντίστοιχες περιοχές ανάλυσης των εξονίων δεν επηρεάστηκαν σημαντικά. Επιπλέον, η τάση της μεθυλίωσης για τις περιοχές *NESP* CpG177 και *GNASXL* CpG27 ήταν αυξητική για τις συνθήκες ενδιάμεσου στρες 15 ημερών και συνεχόμενου 7 ημερών, αντίστοιχα. Το *GNASXL* CpG27 εμφάνισε μια μη ομαλή τάση της μεθυλίωσης καθώς για τη συνθήκη συνεχόμενου στρες 15 ημερών η τάση αντιστράφηκε και το ποσοστό μεθυλίωσης παρουσίασε μείωση. Τέλος, η περιοχή *GNASXL* CpG190 φάνηκε να μην επηρεάζεται σημαντικά από τις πειραματικές συνθήκες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η απομεθυλίωση πλούσιων σε CpG περιοχών των υποκινητών είναι κρίσιμης σημασίας για την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου, ενώ αντίστοιχες επιγενετικές αλλαγές σε εξονικές περιοχές δεν έχουν μέχρι τώρα συσχετιστεί ξεκάθαρα με τη ρύθμιση της μεταγραφής. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματά μας αποτελούν μια έμμεση ένδειξη ότι η διαφορετική έκφραση των ισομορφών πάνω στο γενετικό τόπο του *GNAS* μπορεί να συσχετιστεί με την ενίσχυση του ρυθμού διαφοροποίησης των στρεσαρισμένων κυττάρων hAT-MSCs.



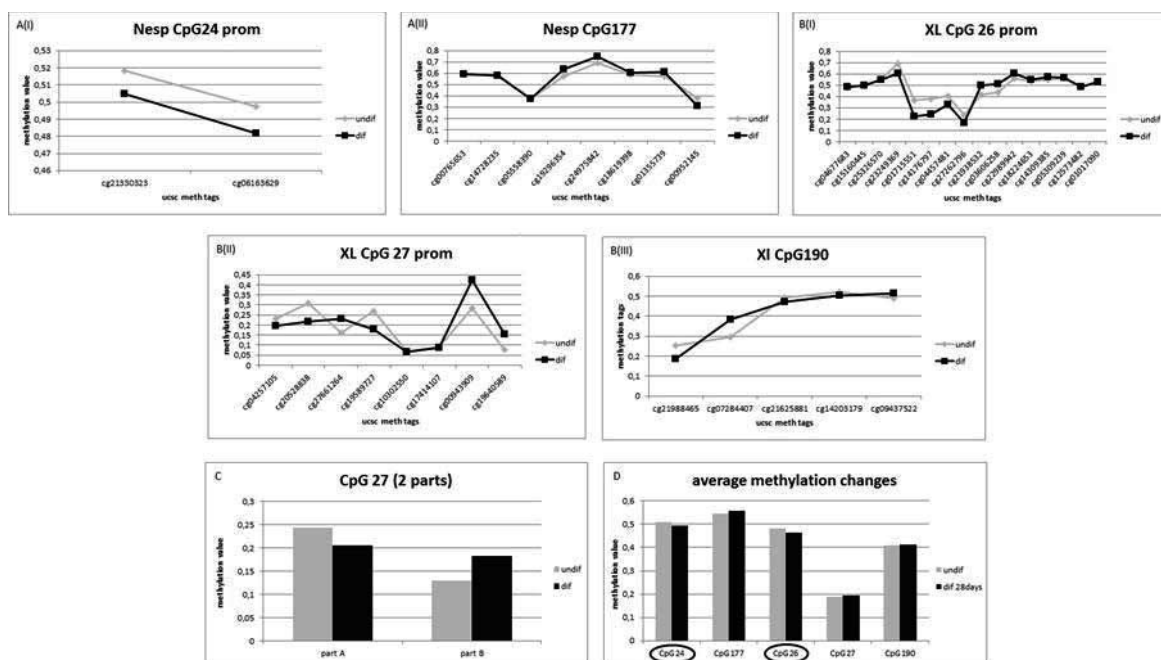
**Εικόνα 4.5.3: Στατιστική ανάλυση του ποσοστού DNA μεθυλίωσης κατά μήκος των περιοχών του *GNAS* που μελετήθηκαν.** Στο παραπάνω γράφημα παρουσιάζονται οι αλλαγές στο ποσοστό μεθυλίωσης των νησίδων CpG που αναλύθηκαν. Η σύγκριση γίνεται ανά ζεύγη: A1-A2, A3-B5, B5-B6. *NESP* CpG24: το ποσοστό μεθυλίωσης μειώνεται στατιστικά σημαντικά σε συνθήκες στρες μετά από 15 ημέρες (A3, B6). *NESP* CpG177: το ποσοστό μεθυλίωσης παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση για τη συνθήκη A3. *GNASXL* CpG26: το ποσοστό μεθυλίωσης σημειώνει στατιστικά σημαντική μείωση σε συνθήκες στρες μετά από 15 ημέρες (A3, B6). *GNASXL* CpG27: το ποσοστό μεθυλίωσης αυξάνει σημαντικά σε συνθήκες στρες 7 ημερών (A2) αλλά μειώνεται σε συνθήκες στρες 15 ημερών (B6). *GNASXL* CpG190: δεν σημειώνεται καμία στατιστικά σημαντική αλλαγή (Mann Whitney t-test: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.0001)



**Εικόνα 4.5.4: Αναπαράσταση των σημειακών αλλαγών στο ποσοστό μεθυλίωσης κατά μήκος των νησίδων CpG των ισομορφών *NESP* και *GNASXL* σε μορφή θερμικού χάρτη.** Η ειδική για τη μεθυλίωση αλληλούχιση DNA αποκαλύπτει συγκριτικά τις τροποποιήσεις στα δείγματα μηχανικού στρες (A2, A3, B6) σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου (A1, B5). Τα λευκά κουτιά αντιπροσωπεύουν τα χαμηλότερα ποσοστά μεθυλίωσης (0-20%), ενώ τα μαύρα κουτιά τα υψηλότερα (80-100%). Οι ενδιάμεσες τιμές αναπαρίστανται ως διαφορετικές αποχρώσεις του γκρι. Το ποσοστό μεθυλίωσης αποτυπώνεται ως μέσος όρος τουλάχιστον τριών επαναλήψεων των αντιδράσεων αλληλούχισης.

#### **4.5.4 Οι αλλαγές σε επίπεδο μεθυλίωσης συνδέονται με τις συνέπειες της κυτταρικής διάταξης και τα μοτίβα των προσδεόμενων παραγόντων CTCF**

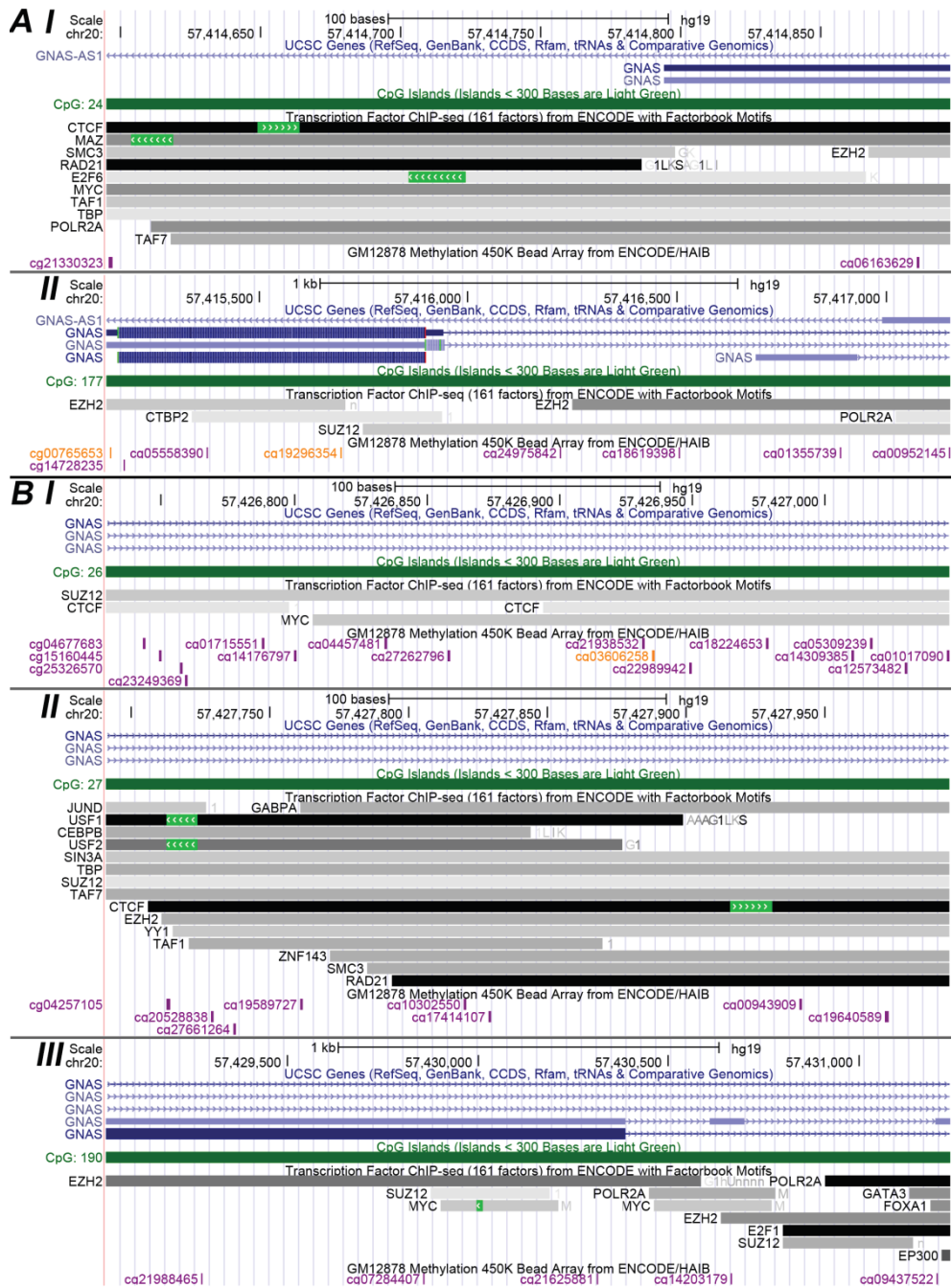
Η συγκριτική βιοπληροφορική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας με την ανάλυση μεθυλίωσης ολόκληρου του γενώματος κατά την οποία συγκρίθηκαν μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από μυελό των οστών και πλήρως διαφοροποιημένα οστεοκύτταρα, αποκάλυψε μια όμοια τάση στο πρότυπο μεθυλίωσης. Πιο συγκεκριμένα, οι δύο νησίδες CpG που εδράζονται σε περιοχή υποκινητή (*NESP* CpG24, *GNASXL* CpG26) παρουσιάζουν μια απομεθυλιωτική τάση κατά την πορεία της οστεογένεσης των 28 ημερών, όπως ακριβώς και κατά την διαφοροποίηση των hAT-MSCs υπό την επίδραση μηχανικού στρες 15 ημερών. Το επιγενετικό προφίλ των αντίστοιχων νησίδων CpG του κυρίως σώματος του γονιδίου επίσης συμφωνεί στις δύο μελέτες. Το *NESP* CpG177 παρουσιάζει μια υπερμεθυλιωτική τάση στα διαφοροποιημένα κύτταρα, ενώ το *GNASXL* CpG190 παραμένει σε σταθερά επίπεδα. Τέλος, το *GNASXL* CpG27 το οποίο εμφανίζει μια ανώμαλη διακύμανση στην τάση της μεθυλίωσης στα αποτελέσματά μας, ακολουθεί το ίδιο πρότυπο και στην αντίστοιχη συγκριτική μελέτη. Για να κατανοήσουμε το λόγο αυτής της διακύμανσης, προχωρήσαμε στη λεπτομερέστερη ανάλυση των σημειακών μεθυλιωτικών αλλαγών αυτής της περιοχής και παρατηρήσαμε ότι δεν ακολουθούν την ίδια τάση κατά μήκος του CpG. Χωρίζοντας τα σημεία ανάλυσης σε δύο τμήματα (1<sup>ο</sup> μισό CpG και 2<sup>ο</sup> μισό CpG) και συγκρίνοντας τους μέσους όρους των τιμών είδαμε ότι τα δύο μέρη ακολουθούν αντίθετο πρότυπο μεθυλίωσης (Εικόνα 4.5.5).



**Εικόνα 4.5.5:** Συσχέτιση των σημειακών μεθυλιωτικών τροποποιήσεων μεταξύ μη διαφοροποιημένων μεσεγχοματικών βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από μυελό των οστών και πλήρως διαφοροποιημένων οστεοκυττάρων σε μια πλήρη γενωμική ανάλυση. Τα πλαίσια A (I, II) και B (I, II, III) αναπαριστούν το προφίλ DNA μεθυλίωσης των μεμονωμένων εσωτερικών σημείων ελέγχου για μεθυλίωση για τα CpG24, CpG177 και CpG26, CpG27, CpG190 αντίστοιχα. Το πλαίσιο C περιγράφει το σκορ της μεθυλίωσης στα δύο μισά του CpG27 και το πλαίσιο D περιγράφει το μέσο όρο για όλα τα CpGs που αναλύθηκαν.

Το παραπάνω εύρημα μας έδωσε το έναυσμα να διερευνήσουμε την πιθανή πρόσδεση ρυθμιστικών παραγόντων που σχετίζονται με τη μεθυλίωση πάνω στα CpGs που μελετήσαμε. Κατ' αρχήν, ελέγξαμε το *GNASXL* CpG27 στην προσπάθειά μας να εξηγήσουμε αυτή την ανόμοια κατανομή των μεθυλομάδων και βρήκαμε ότι στο δεύτερο μισό του CpG υπάρχει περιοχή πρόσδεσης CTCF (βάση δεδομένων ENCODE). Τέτοιου είδους περιοχές πρόσδεσης εντοπίζονται και στα *NESP* CpG24 και *GNASXL* CpG26 που αντιστοιχούν στον υποκινητή, ενώ απουσιάζουν από τα CpGs των εξονίων (*NESP* CpG177, *GNASXL* CpG190) (Εικόνα 4.5.6). Αυτή η παρατήρηση ενισχύει την υπόθεσή μας γύρω από τις έντονες μεθυλιωτικές αλλαγές που συγκεντρώνονται στον υποκινητή του γονιδίου που μελετάμε.





Εικόνα 4.5.6: Βιοπληροφορική ανάλυση των περιοχών CpG που μελετήθηκαν. Τα σημεία πρόσδεσης μοτίβων CTCF απεικονίζονται με οριζόντιες γκρι ή μαύρες μπάρες και εντοπίζονται στα CpGs του υποκινητή.



## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

### 5.1 Μελέτη της επίδρασης των γλυκοκορτικοειδών στην έκφραση και επιγενετική ρύθμιση των γονιδίων *NR3C1* και *UBE3A* σε νευροβλαστωματικές κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μελέτη της τοξικότητας ουσιών, καθώς και των μηχανισμών που εμπλέκονται στη ρύθμιση της κυτταρικής απόκρισης σε διάφορους παράγοντες. Οι διαφορές στη μορφολογία και τη λειτουργικότητα από τις αντίστοιχες πατρικές σειρές, αντικατοπτρίζουν διαφορετική απόκριση σε τοξικές συνθήκες σε σχέση με τους νευρώνες. Επομένως, η φαρμακολογική επίδραση εξαρτάται από την εκάστοτε κυτταρική σειρά και τα στοιχεία αυτά θα πρέπει να αξιολογούνται παράλληλα.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να εγκαθιδρυθεί ένα κυτταρικό μοντέλο κατάλληλο για τη μελέτη της επίδρασης των γλυκοκορτικοειδών στις βιολογικές ιδιότητες κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας, καθώς είναι προγονικά πολλών τύπων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των νευρικών και οστεοβλαστών στα οποία έχει επικεντρωθεί το ενδιαφέρον μας όσον αφορά την απόκριση σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού, εξετάσαμε την επίδραση της δεξαμεθαζόνης- ουσίας που δρα ως αγωνιστής του GR- στη μορφολογία, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των νευρικών κυττάρων SH-SY5Y, BE(2)-C, N2A και HCN.

Στην κυτταρική σειρά SH-SY5Y δεν παρατηρήσαμε κάποια αλλαγή στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων δοκιμάζοντας αρκετά μεγάλο εύρος συγκέντρωσης φαρμάκου (1μM-1mM). Παρατηρήσαμε όμως ότι τα κύτταρα αυτά τείνουν να διαφοροποιηθούν υπό την επίδραση του φαρμάκου σε συνδυασμό με συνθήκες «στρες» στην καλλιέργεια. Η χαμηλή περιεκτικότητα του θρεπτικού μέσου σε ορό είτε η έλλειψη στεροειδών στον ορό, προσδίδει στα ανθρώπινα νευροβλαστωματικά κύτταρα τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε νευρικά κύτταρα. Το φαινόμενο αυτό δικαιολογείται από την ανάγκη των κυττάρων να αντιμετωπίσουν μια «δύσκολη» κατάσταση και να αποφύγουν να οδηγηθούν στην απόπτωση. Η περαιτέρω ανάλυση σε μοριακό επίπεδο έδειξε ότι η έκφραση ορισμένων από τα γονίδια που μελετάμε επηρεάζεται σε επίπεδο mRNA από την επίδραση δεξαμεθαζόνης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε ότι η έκφραση του GR μειώνεται σε μεγάλη συγκέντρωση δεξαμεθαζόνης (1mM), ενώ παράλληλα αυξάνει η έκφραση του παράγοντα UBE3A. Η αλληλεπίδραση των δύο αυτών

μορίων είναι κρίσιμης σημασίας για την απόκριση του οργανισμού σε ένα εξωγενές σήμα, όπως η επίδραση της δεξαμεθαζόνης που αποτελεί σύνθετη χημική ουσία. Συμπεραίνουμε επομένως ότι η χορήγηση υψηλής δόσης γλυκοκορτικοειδών αποτελεί παράγοντα στρες για τα κύτταρα SH-SY5Y, τα οποία για να ανταπεξέλθουν ενεργοποιούν το σύστημα απόκρισης στο στρες. Το γεγονός αυτό σηματοδοτείται από τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *NR3C1* που κωδικοποιεί τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR).

Στην κυτταρική σειρά BE(2)-C παρατηρήσαμε φαινοτυπικά αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 50-100μM, ενώ παρουσία του συμπληρώματος B27 στην καλλιέργεια το φαινόμενο φαίνεται να εντείνεται. Η παρατήρηση αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η δεξαμεθαζόνη δρα παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Κατά συνέπεια, υποθέτουμε ότι ενεργοποιείται ο υποδοχέα GR για την πρόσδεση στα γλυκοκορτικοειδή και την απόκριση του συστήματος στο εξωγενές σήμα. Αυτή η παρατήρηση είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που δείχνουν ότι στα νευρικά κύτταρα, η αναστολή του κυτταρικού κύκλου από τον GR σχετίζεται με την ενεργότητα του p53, και ότι η ενίσχυση της δράσης του p53 μπορεί να προετοιμάζει τα κύτταρα για διαφοροποίηση (229). Το φαινόμενο αυτό αποτελεί πρόκληση για μελλοντική έρευνα.

Τέλος, η κυτταρική σειρά N2A αποκρίνεται στη δεξαμεθαζόνη με διαφορετικό τρόπο. Από τα μορφολογικά αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η ουσία ευαισθητοποιεί τα κύτταρα N2A σε πολύ μικρότερη δόση. Η χαμηλή συγκέντρωση των 10μM σε πλήρες θρεπτικό μέσο, οδηγεί στο φαινόμενο της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού το οποίο είναι εμφανές από την 2<sup>η</sup> ημέρα και πιο έντονο την 4<sup>η</sup> ημέρα καλλιέργειας. Το φαινόμενο αυτό συνοδεύεται από μεταβολές στα επίπεδα και την κατανομή των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του κυτταρικού κύκλου p21 και p53. Συνολικά, οι παραπάνω παρατηρήσεις συμφωνούν με στοιχεία της βιβλιογραφίας (229) και σηματοδοτούν την διαταραχή του κυτταρικού κύκλου με την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του GR. Κατά συνέπεια, τα κύτταρα αυτά μπορούν να αξιοποιηθούν περαιτέρω ως ένα *in vitro* μοντέλο για τη μελέτη της δυναμικής των επιγενετικών μηχανισμών που επηρεάζουν την έκφραση, καθώς επίσης και τη λειτουργικότητα του GR, κατά την απόκριση των νευρικών κυττάρων στα γλυκοκορτικοειδή.

Εκτός από τις κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος, η επίδραση της δεξαμεθαζόνης ελέγχθηκε και σε μία βλαστική κυτταρική σειρά ανθρώπινου εγκεφαλικού φλοιού (Human Cortical Neuronal- HCN). Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από πολυδυναμία και έκφραση ποικιλίας πρωτεϊνών, πεπτιδίων και νευροδιαβιβαστών. Εξετάσθηκε η κατανομή πρωτεϊνών ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου με ανοσοφθορισμό μετά από καλλιέργεια παρουσία και απουσία αυξητικών παραγόντων. Τα μόρια p53 και p21 εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων και η δράση της δεξαμεθαζόνης ενισχύει την έκφραση αυτών των πρωτεϊνών σχεδόν ανεξάρτητα από τη συνύπαρξη αυξητικών παραγόντων στην καλλιέργεια. Χρονικά, η δράση αυτή εντείνεται και η p53 μετατοπίζεται όλο και περισσότερο από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι η δεξαμεθαζόνη- ως εξωγενές σήμα- διαταράσσει την ισορροπία των κυττάρων οδηγώντας σε ανάγκη για υπερενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53, η οποία συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ώστε να διατηρηθεί η σταθερότητα του συστήματος. Ένας από τους βασικούς ρόλους της p53 είναι να αναστέλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όταν αναγνωρίζεται κάποια απειλή για το γένωμα. Με αυτό τον τρόπο εξοικονομείται χρόνος για προσπάθεια επιδιόρθωσης της πιθανής βλάβης πριν ολοκληρωθεί ο κυτταρικός κύκλος. Σε αντίθετη περίπτωση το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση. Η διαδικασία αυτή προσδίδει ανθεκτικότητα και σταθερότητα στα κύτταρα. Ανάλογος είναι και ο ρόλος της πρωτεΐνης p21, η οποία συνήθως αλληλεπιδρά με την p53 και μαζί στοχεύουν στην ενίσχυση της δομικής σταθερότητας.

Τα πρώιμα αυτά αποτελέσματα μπορεί να αποτελέσουν το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη του συστήματος των γλυκοκορτικοειδών σε κυτταρικό επίπεδο. Απώτερος στόχος είναι να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός δράσης των στεροειδών κατά την απόκριση ενός ζωντανού οργανισμού σε ένα εξωγενές σήμα. Σε κυτταρικό επίπεδο σχεδιάζεται η διερεύνηση της δράσης της μίφεπριστόνης, η οποία αποτελεί συνθετική ουσία- ανταγωνιστή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Με τον τρόπο αυτό θα οδηγηθούμε σε ένα συμπέρασμα σχετικά με το αν τα αποτελέσματά μας διαμεσολαβούνται από τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, που αποτελεί και την υπόθεσή μας (150, 230).

## 5.2 Μελέτη της έκφρασης μορίων που συμμετέχουν με άμεσο ή έμμεσο τρόπο στη ρύθμιση του άξονα HPA κατά την απόκριση του οργανισμού στα κανναβινοειδή

Τα τελευταία χρόνια, το σύστημα των ενδοκανναβινοειδών έχει μελετηθεί στην προσπάθεια βελτίωσης της θεραπείας ψυχωσικών διαταραχών, καθώς φαίνεται να εμπλέκεται στη λειτουργία του νευροενδοκρινικού συστήματος και στη ρύθμιση της απόκρισης του άξονα HPA στο στρες. Συγκεκριμένα, τα γλυκοκορτικοειδή ευαισθητοποιούν το σύστημα ενδοκανναβινοειδών ώστε να δράσει άμεσα ενισχύοντας τον αρνητικό επανατροφοδοτικό έλεγχο για τη ρύθμιση της ομοιόστασης. Αυτή η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο συστημάτων στον περιορισμό της έντασης της διαταραχής, υποστηρίζει τη χρησιμότητα μιας θεραπείας βασισμένης στα κανναβινοειδή για τον έλεγχο των στρεσογόνων καταστάσεων και την πρόληψη ανάπτυξης ψυχωσικών διαταραχών (168). Τα κανναβινοειδή και οι συνθετικές ουσίες που ευαισθητοποιούν τους υποδοχείς του συστήματος, χρησιμοποιούνται ευρέως στη μελέτη του στρες και του φόβου *in vivo*. Επίπλέον, θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη και ότι ο κάθε οργανισμός ανταποκρίνεται εξατομικευμένα στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που δέχεται και αυτό εξαρτάται τόσο από το γενετικό υπόβαθρο όσο και από την ικανότητα να αντιμετωπίζει μια δύσκολη κατάσταση.

Η έρευνα εστιάζεται επίσης στις επιπτώσεις του στρες στη γονιδιακή έκφραση απουσία του υποδοχέα CB1. Τονίζεται ότι η έκθεση των πειραματόζωων σε ένα χρόνιο στρεσογόνο ερέθισμα οδηγεί στην ανάπτυξη καταθλιπτικού φαινότυπου με γονιδιακές αλλαγές παρόμοιες με εκείνες που παρατηρούνται σε ζώα με αποσιώπηση του υποδοχέα CB1 (177). Ωστόσο, η ενεργοποίηση ή η παρεμπόδιση του υποδοχέα εξαρτάται από τις συνθετικές ουσίες που δρουν αγωνιστικά ή ανταγωνιστικά, καθώς και από την ενζυμική δράση για την υδρόλυση των ενδοκανναβινοειδών (181, 182). Όλα τα παραπάνω θα πρέπει να συνυπολογιστούν σε μια μελέτη που θα οδηγήσει στο σχεδιασμό νέας γενιάς φαρμάκων.

Η θεραπευτική αξία του φυτοκανναβινοειδούς «δέλτα-9-τετραϋδροκανναβινόλη» ( $\Delta_9$ -THC) είναι γνωστή για την περιποίηση τραυμάτων. Ωστόσο, το εκχύλισμα αυτό παρουσιάζει ενδιαφέρον διότι βρέθηκε να δρα βελτιώνοντας τα αποτελέσματα των γλυκοκορτικοειδών στη μετατραυματική μνήμη. Παραθέτουμε πρώιμα αποτελέσματα που υποστηρίζουν ότι η χορήγηση  $\Delta_9$ -THC με δοσοεξαρτώμενο τρόπο και σε ορισμένο χρόνο σε έφηβους επίμυες, οδήγησε με μεταβολές των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που

απαρτίζουν τον άξονα HPA. Διερευνήσαμε την έκφραση σε επίπεδο mRNA των γονιδίων *Nr3c1* (GR), *Nr3c2* (MR), *Ube3a*, *Drd1a*, *Gilz*, *Pomc*, *Bdnf* στον ιππόκαμπο επίμυων μετά το πρόγραμμα χορήγησης της ουσίας, σε σύγκριση με την έκφραση στον ιππόκαμπο πειραματόζωων ελέγχου. Τα αυξημένα επίπεδα mRNA των γονιδίων *Nr3c1*, *Nr3c2* και *Ube3a* αναδεικνύουν την ενεργοποίηση του άξονα HPA κατά την ευαισθητοποίηση του οργανισμού με τη χορήγηση συνθετικών κανναβινοειδών, καθώς τα μόρια αυτά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με στόχο τη ρύθμιση της λειτουργίας του εγκεφάλου σε απόκριση σε εξωγενή σήματα. Αντίθετα, η μείωση στα επίπεδα έκφρασης των μορίων *Pomc* και *Gilz* υποδηλώνει πιθανώς την «κατανάλωση» των μορίων αυτών στη ρύθμιση της μεταγραφικής ενεργότητας του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών για την απόκριση των κυττάρων στον καταρράκτη έκκρισης ορμονών. Συνολικά, συμπεραίνουμε ότι η φαρμακευτική ουσία πιθανώς περιορίζει τα συμπτώματα του στρες, δεδομένου ότι παρατηρούμε αντίθετα αποτελέσματα από εκείνα του πρωτοκόλλου μητρικής αποστέρησης. Επιπλέον, συμπληρώνουμε ένα ακόμα στοιχείο στην υπόθεση ότι το σύστημα ενδοκανναβινοειδών συμμετέχει στην απόκριση του οργανισμού σε στρεσογόνα ερεθίσματα, προτείνοντας την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στόχων για ένα μεγάλο εύρος ψυχιατρικών διαταραχών (231-233).

### **5.3 Διερεύνηση της έκφρασης πρωτεϊνών μιτοχονδριακής λειτουργίας στο εγκέφαλο ζώων διαφορετικού προφίλ άγχους**

Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, όπως έχει αναφερθεί ήδη, εμπλέκεται στην ανάπτυξη διαταραχών που συνδέονται με τη λειτουργία του νευρικού συστήματος. Η κατανόηση του ρόλου των μιτοχονδρίων σε επίπεδο ενζυμικής ενεργότητας και μεταβολισμού στον εγκέφαλο, μπορεί να συμβάλει στην εξέλιξη των φαρμάκων για αποτελεσματικότερη θεραπεία τέτοιου είδους ασθενειών.

Σκοπός της διερεύνησης των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών ήταν η κατανόηση της λειτουργίας τους έτσι ώστε να αποτελέσουν απώτερο στόχο ανάπτυξης εξειδικευμένης θεραπείας ψυχικών διαταραχών.

Βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι στις μοριακές αλλαγές που παρατηρούνται στο φλοιό του εγκεφάλου μετά από την έκθεση σε κάποιο στρεσογόνο παράγοντα εμπλέκονται μιτοχονδριακά μονοπάτια, μελετήσαμε τη διαφορική έκφραση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών σε φαινοτυπικά φυσιολογικούς και σε μύες υψηλού άγχους. Διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα



έκφρασης των συμπλόκων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων δεν παρουσιάζουν έντονες διαφορές μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων. Το ίδιο παρατηρούμε και για τις μιτοχονδριακές πρωτεΐνες του Κυτόχρωματος C και την SLC25A22, καθώς και τον υποδοχέα γλουταμινικού, NMDAR. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν βασικά στοιχεία λειτουργίας των μιτοχονδρίων, καθώς εκτελούν σημαντικούς ρόλους στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Συγκεκριμένα, το κυτόχρωμα C είναι απαραίτητη πρωτεΐνη της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, καθώς μεταφέρει ηλεκτρόνια από το σύμπλοκο III στο σύμπλοκο IV. Η πρωτεΐνη SLC25A22 ανήκει στην οικογένεια SLC25 των μιτοχονδριακών μεταφορέων μεταβολιτών κατά μήκος της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η SLC25A22 αποτελεί μεταφορέα γλουταμινικού. Υποθέτουμε επομένως ότι ο φαινότυπος των πειραματόζων υψηλού άγχους δε συνδέεται με αλλαγές στα επίπεδα των συγκεκριμένων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών σε ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Πιθανώς όμως, να εντοπίζονται πιο στοχευμένα μεταβολές στην έκφραση πρωτεϊνών των νευρώνων.

Έχει επικρατήσει η άποψη ότι οι διεργασίες μνήμης και μάθησης διαμεσολαβούνται από ένα μηχανισμό με διαδοχικές αλληλεπιδράσεις μορίων για τη διατήρηση της συναπτικής πλαστικότητας (193-195). Πολλές μελέτες υποστηρίζουν το σημαντικό ρόλο των υποδοχέων NMDA στις παραπάνω διεργασίες και συσχετίζουν την υπολειτουργία τους με τη μειωμένη λειτουργικότητα του φλοιού που παρατηρείται σε ασθενείς με σχιζοφρένεια (234). Η ενδοκυττάρια ενεργότητα των NMDA υποδοχέων έχει συσχετιστεί με τη λειτουργία των διαύλων ασβεστίου σε περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος, δεδομένου ότι οι υποδοχείς αυτοί είναι ιδιαίτερα διαπερατοί από ιόντα ασβεστίου (196, 197). Οι διάυλοι ιόντων τύπου L διακρίνονται σε τέσσερις ισομορφές, εκ των οποίων η μία ( $Ca_v1.2$ ) εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπτώσεων της συναπτογένεσης στην επιβίωση των κυττάρων, την πλαστικότητα και τη γονιδιακή έκφραση (202, 235).

Έχοντας ως δεδομένο ότι τα πειραματόζωα LAB αντιπροσωπεύουν έναν φαινότυπο ανάλογο της διαταραχής ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας (ADHD), προχωρήσαμε στο συγκριτικό έλεγχο των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών NMDAR και  $Ca_v1.2$  στις περιοχές του ραβδωτού σώματος και του επικλινούς πυρήνα του εγκεφάλου. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές στο πρότυπο έκφρασης του NMDAR και για τις δύο περιοχές

ανάλυσης. Αντίθετα, παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα πρωτεϊνών του διαύλου ασβεστίου  $Ca_v1.2$  στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου των μυών LAB.

Λαμβάνοντας υπόψη τη σημαντική αυτή παρατήρηση και με γνώμονα τις μελέτες που υποστηρίζουν το ρόλο του  $Ca_v1.2$  στις διεργασίες μνήμης και μάθησης (207, 208), μια ενδιαφέρουσα μελλοντική προσέγγιση του θέματος θα μπορούσε να είναι η διερεύνηση του γενετικού και επιγενετικού προφίλ του γονιδίου *CACNA1C* σε συνάρτηση με τη ρύθμιση του άξονα HPA.

Πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η αποσιώπηση του συγκεκριμένου γονιδίου από την περιοχή του πρόσθιου εγκεφάλου συνδέεται με στρεσογόνο συμπεριφορά σε ποντίκια. Πιο συγκεκριμένα, η εξάλειψη του γονιδίου σε ποσοστό περίπου 70% από τις περιοχές του ιππόκαμπου, φλοιού, ραβδωτού σώματος και αμυγδαλής, οδήγησε τα πειραματόζωα σε αυξημένη σχετική με το άγχος συμπεριφορά, όπως αποκαλύπτεται από τη δοκιμασία του υπερυψωμένου σταυροειδούς λαβυρίνθου (236). Αυτή είναι η πρώτη άμεση ένδειξη για το ρόλο του *cacna1c* στη ρύθμιση του στρες στον εγκέφαλο και θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση για τη μελέτη της παθοφυσιολογίας του στρες σε νευροψυχιατρικές διαταραχές.

Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν ότι η κορτικοστερόνη ενισχύει τη ροή ασβεστίου στα κύτταρα των πυριμιδικών νευρώνων CA1 του ιππόκαμπου, μέσω ενός μονοπατιού που περιλαμβάνει την πρόσδεση των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών σε ομοδιμερή στο DNA (237). Υψηλή δοσολογία κορτικοστερόνης, ικανή να ενεργοποιήσει το GR, διεγείρει τη ροή ασβεστίου μέσω των διαύλων τύπου L, παρόλο που η μελέτη της ποσοτικής έκφρασης σε μεταγραφικό επίπεδο δεν έδειξε στοιχεία υπερέκφρασης της υπομονάδας  $Ca_v1$  στην περιοχή CA1 (238). Ακόμη, ορισμένα δεδομένα υποστηρίζουν το διαφορετικό προφίλ έκφρασης των ισομορφών  $Ca_v1.2$  και  $Ca_v1.3$  στις περιοχές του μεταιχμιακού συστήματος (239). Τέλος, έχει ήδη αναφερθεί ότι τα μακροχρόνια αυξημένα επίπεδα κορτικοστερόνης στον ιππόκαμπο οδηγούν σε μεταβολές στα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών και των αντίστοιχων υποδοχέων, μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού στο οποίο κύριο ρόλο διαδραματίζει το ασβέστιο. Το γεγονός αυτό αποτελεί χρόνιο στρες υποξίας επηρεάζοντας τη νευρογένεση και τη μνήμη, και η χορήγηση

μυεπριστόνης θα μπορούσε να έχει θεραπευτικό χαρακτήρα περιορίζοντας τις αρνητικές συνέπειες (240).

Ακολουθώντας την πληροφορία που μας δίνεται από την πρόσφατη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα αυτά θα έβρισκαν εφαρμογή στο χρόνιο μοντέλο στρες μητρικού αποχωρισμού, με σκοπό τη διερεύνηση της ρύθμισης των διαύλων ασβεστίου σε συνδυασμό με τις επιγενετικές τροποποιήσεις που συνοδεύουν την επίδραση του περιβαλλοντικού ερεθίσματος στη νευρογένεση και τη μνήμη. Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου *casna1c* παράλληλα με τη ρύθμιση του ισοζυγίου GR/MR στον ιστό της αμυγδαλής και του ιππόκαμπου, καθώς επίσης και η μελέτη του ρόλου της καλμοδουλίνης ως διαμεσολαβητή του σηματοδοτικού μονοπατιού του ασβεστίου σε απόκριση στο στρες μητρικού αποχωρισμού.

#### **5.4 Μεταβολές στα πρότυπα έκφρασης μορίων που συνδέονται με τη λειτουργία του άξονα HPA σε ένα πειραματικό μοντέλο μητρικής αποστέρησης**

Υπάρχει πλέον πληθώρα μελετών που καταδεικνύει τη συσχέτιση του στρεσογόνου περιβάλλοντος κατά την πρώιμη μεταγεννητική ηλικία με την ανάπτυξη διαταραχών άγχους και ψυχιατρικών ασθενειών κατά την ενήλικη ζωή. Η περιγεννητική ηλικία θεωρείται κρίσιμη αναπτυξιακή περίοδος κατά την οποία οι αρνητικές εμπειρίες έχουν επιπτώσεις στη λειτουργία του εγκεφάλου, επηρεάζουν τη γονιδιακή έκφραση και κατ'επέκταση τη συμπεριφορά του ατόμου στην ενήλικη ζωή (72, 89, 241). Τα νεογέννητα πειραματόζωα που εκτίθενται κατά τις πρώτες 10 ημέρες της ζωής τους σε χαμηλά επίπεδα μητρικής φροντίδας εξελίσσονται σε ενήλικα ζώα με αυξημένη ευαισθησία σε οξέα στρεσογόνα ερεθίσματα. Επιπλέον, αντιμετωπίζουν ένα οξύ ερέθισμα με νευρικότητα και έχει αποδειχθεί ότι τέτοιου είδους πρώιμες εμπειρίες μπορούν να διαταράξουν το νευρικό σύστημα του οργανισμού επηρεάζοντας την απόκριση στις ορμόνες που εκκρίνονται φυσιολογικά ως απάντηση στο στρες (76). Τονίζεται επιπλέον ότι η σοβαρότητα στην εξέλιξη μιας παθολογικής συμπεριφοράς, εξαρτάται από ένα σύνολο παραγόντων: το είδος, τη διάρκεια, το φύλο και την ηλικία απογαλακτισμού (242, 243).

Στην παρούσα εργασία, διερευνήθηκαν οι μεταβολές της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στον άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (HPA) στις περιοχές της αμυγδαλής και του ιππόκαμπου, σε ενήλικους μύες που υποβλήθηκαν σε στρες μητρικού αποχωρισμού και πρόωρου απογαλακτισμού κατά την περιγεννητική

ηλικία. Ακολουθήθηκε ένα πρωτόκολλο ήπιου, αλλά χρόνιου στρες μητρικής αποστέρησης (223) κατά τη διάρκεια του οποίου παρακολουθούνταν το βάρος των ζώων. Έπειτα διενεργήθηκαν συμπεριφορικές δοκιμασίες αξιολόγησης της κινητικότητας κατά την ενήλικη φάση ζωής και στη συνέχεια τα ζώα θυσιάστηκαν, και εξετάστηκε η διακύμανση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων *Nr3c1*, *Nr3c2*, *Ube3a*, *Gilz*, *Pomc*, *Bdnf* και *Drd1a*.

Η πρόσληψη σωματικού βάρους παρουσίασε διακύμανση μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων, αλλά ακόμα και μεταξύ των διαφορετικών γεννήσεων μέσα στην κάθε ομάδα. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο πείραμα παρατηρούμε ότι η πρόσληψη βάρους για την ομάδα γέννησης «Α», στα νεογνά της οποίας εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο, ήταν μεγαλύτερη από τις υπόλοιπες ομάδες γέννησης, και ιδιαίτερα για τα θηλυκά ζώα. Ακολουθώντας, παρατηρώντας το μέσο όρο για όλες τις ομάδες «στρες» και «ελέγχου», βλέπουμε ότι την ημέρα 17, αμέσως μετά το τέλος του πρωτοκόλλου μητρικού αποχωρισμού, το βάρος των μυών «στρες» (MS) ήταν μικρότερο από το βάρος των μυών «ελέγχου» (C), και μάλιστα με μεγαλύτερη διαφορά για τους θηλυκούς μύες. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο μητρικό αποχωρισμό- με πλήρη απουσία τροφής για αρκετές ώρες- αφενός, αλλά και στο στρες που προκάλεσε η απουσία επαφής με τη μητέρα, η έλλειψη οσμής της, η απουσία της φροντίδας που παρέχει η συμπεριφορά της, καθώς και η αλλαγή θερμοκρασίας του σώματος των νεογνών. Αρκετές μελέτες αναφέρουν μείωση του σωματικού βάρους μετά από την έκθεση των νεογνών σε κάποιο πρωτόκολλο μητρικής αποστέρησης (244-247). Ωστόσο, την ημέρα 25 παρατηρούμε ότι η κατάσταση αντιστρέφεται. Το σωματικό βάρος είναι μεγαλύτερο στα στρεσαρισμένα ζώα (MS) από τα ζώα ελέγχου (C), με μεγαλύτερη διαφορά για τους αρσενικούς μύες αυτή τη φορά. Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται πιθανώς στον πρόωρο απογαλακτισμό που πραγματοποιήθηκε για τους μύες «στρες» την 17<sup>η</sup> ημέρα. Τα πειραματόζωα ήταν πλέον ελεύθερα να λαμβάνουν ξηρά τροφή, και εφόσον είχαν αναπτυχθεί φυσιολογικά ως την ημέρα εκείνη, ήταν σε θέση να διαβιώσουν ανεξάρτητα. Το γεγονός της αύξησης βάρους για το διάστημα των ημερών 17-25, μας οδηγεί στην υπόθεση ότι η μητέρα μετά τη συνεχή αποστέρηση των νεογνών της, έπαψε να είναι αποδοτική στο θηλασμό. Γι' αυτό και η μετέπειτα ελεύθερη πρόσβαση των μυών σε τροφή, τους οδήγησε σε απότομη αύξηση βάρους. Όσον αφορά τη δεύτερη πειραματική ομάδα, παρατηρούμε ότι η πρόσληψη βάρους για την ομάδα γέννησης «Δ», στα νεογνά της οποίας δεν εφαρμόστηκε το

πρωτόκολλο, ήταν μεγαλύτερη από τις υπόλοιπες ομάδες γέννησης, και ιδιαίτερα για τα αρσενικά ζώα. Ακολουθώντας, παρατηρώντας το μέσο όρο για όλες τις ομάδες «στρες» και «ελέγχου», βλέπουμε ότι την ημέρα 17 το βάρος των μυών «στρες» (MS) ήταν μεγαλύτερο από το βάρος των μυών «ελέγχου» (C), οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι η μητρική αποστέρηση δεν είχε κάποια επίδραση στην αύξηση βάρους των νεογνών στο δεύτερο πείραμα. Ανάλογη είναι και η τάση την ημέρα 25, κατά την οποία τα στρεσαρισμένα ζώα εξακολουθούν να υπερβαίνουν σε βάρος τα ζώα ελέγχου. Το γεγονός αυτό είναι το πρώτο στοιχείο που υποστηρίζει ότι δεν ανταποκρίνονται όλα τα ζώα με τον ίδιο τρόπο σε ένα πρωτόκολλο ήπιου στρες και το αποτέλεσμα είναι πολυπαραγοντικό. Οι διαφορές θα μπορούσαν να οφείλονται σε πλειάδα εξωγενών παραγόντων, για παράδειγμα στον αριθμό των νεογνών ανά μητέρα. Έτσι, εάν μια ομάδα γέννησης που αποτέλεσε ομάδα «στρες» περιλαμβάνει λιγότερα νεογνά από μία ομάδα «ελέγχου», είναι αναμενόμενο η μητέρα να μπορεί να ανταπεξέλθει αποτελεσματικότερα στην ανατροφή των απογόνων της. Αξιολογώντας όλα τα παραπάνω, διαπιστώνουμε ότι το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε δεν είχε κάποια σημαντική επίδραση συνολικά στην ανάπτυξη των μυών, καθώς οι διαφορές στο βάρος δεν έδειξαν στατιστική σημαντικότητα. Ωστόσο, η παρατήρηση ότι τα ζώα αναπτύσσονται φυσιολογικά παρά την μητρική αποστέρηση, ενδυναμώνει τα αποτελέσματα που ακολουθούν, καθώς μπορούμε να αποκλείσουμε τον παράγοντα στρες υποσιτισμού.

Οι συμπεριφορικοί δείκτες που μετρήθηκαν για την αναγνώριση των επιπέδων άγχους των μυών έδειξαν ότι δεν βίωσαν όλα τα ζώα, το στρες μητρικού αποχωρισμού με τον ίδιο τρόπο. Η δοκιμασία υπερυψωμένου σταυροειδούς λαβυρίνθου αποδείχθηκε καταλληλότερη για τη διάκριση των καλύτερα αποκρινόμενων πειραματόζωων, έτσι ώστε να γίνει η επιλογή των δειγμάτων για περαιτέρω μοριακή ανάλυση. Από τις τέσσερις παραμέτρους της δοκιμασίας, ο αριθμός εισόδων στους ανοιχτούς βραχίονες αποτέλεσε την πιο αντιπροσωπευτική. Σημειώνεται ότι η επιλογή των δειγμάτων έγινε με βάση τις «καλύτερες τιμές» κάθε ζώου για πάνω από μία παράμετρο. Έτσι για παράδειγμα στο πρώτο πείραμα, ενώ τα ζώα A2 και A3 είχαν τον ίδιο αριθμό εισόδων στους ανοιχτούς βραχίονες, επιλέχθηκε το ζώο A3 επειδή είχε ακόμα μία καλή τιμή σε άλλη παράμετρο μέτρησης (13 εισόδους στους κλειστούς βραχίονες έναντι 3 του ζώου A2). Αντίστοιχα, η δοκιμασία ανοιχτού πεδίου για την καταμέτρηση της οριζόντιας και κάθετης κινητικότητας του κάθε ζώου για διάρκεια τριάντα λεπτών, δεν έδειξε σημαντικές

διαφορές μεταξύ των ζώων μητρικού αποχωρισμού και ελέγχου. Η διακύμανση των τιμών για όλες τις παραμέτρους ήταν παρόμοια για το σύνολο των πειραματόζωων, με εξαίρεση το συνολικό αριθμό οριζόντιας κίνησης (Total Ambulatory Counts), σύμφωνα με τον οποίο φαίνεται ότι τα επιλεγμένα ζώα «στρες» της πρώτης ομάδας (MD1-MD3) κινήθηκαν περισσότερο οριζόντια απ' ό,τι τα ζώα «στρες» της δεύτερης ομάδας (MD4-MD6) και όλα τα ζώα «ελέγχου» (CTRL1-CTRL6). Στη βιβλιογραφία υπάρχει μια μελέτη που υποστηρίζει ότι τα πειραματόζωα που έχουν υποστεί μητρική αποστέρηση δεν παρουσιάζουν διαφορές στους συμπεριφορικούς δείκτες της δοκιμασίας ανοιχτού πεδίου, παρότι μοριακά αποδεικνύονται στρεσαρισμένα (248).

Η μοριακή ανάλυση για τη διερεύνηση των επιπέδων έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στη λειτουργία του άξονα HPA, οδήγησε σε ορισμένα ενδιαφέροντα συμπεράσματα για την επίδραση του στρες μητρικής αποστέρησης στη λειτουργία του εγκεφάλου. Ξεκινώντας από την αμυγδαλή, παρατηρούμε μία σημαντική αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *Nr3c1* (GR) και *Ube3a* σε επίπεδο mRNA, ενώ ο βαθμός μεταβολής είναι μεγαλύτερος για τα στρεσαρισμένα δείγματα της δεύτερης πειραματικής ομάδας (MD4-MD6) και για τα δύο αυτά γονίδια. Για το γονίδιο *Nr3c2* (MR) παρατηρείται μικρότερος βαθμός μεταβολής, αλλά και ανόμοια διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων που αντιπροσωπεύουν το στρες. Η έκφραση των γονιδίων *Drd1a* και *Bdnf* έχει επίσης αυξητική τάση για όλα τα δείγματα στρες, σε αντίθεση με την έκφραση του *Gilz*, η οποία παρουσιάζει μια τάση μείωσης. Συνολικά, παρατηρούμε σημαντικές αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, γεγονός που υποστηρίζει ότι το στρες μητρικού αποχωρισμού προκάλεσε τη γενικότερη ευαισθητοποίηση της αμυγδαλής με την ενεργοποίηση του άξονα HPA. Επίσης το γεγονός ότι παρατηρείται αντίθετη τάση ρύθμισης της έκφρασης των μορίων GR και GILZ, υποδηλώνει ότι το ισοζύγιο αυτών των παραγόντων διαδραματίζει ρόλο στη ρύθμιση του άξονα HPA.

Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα που προέρχονται από τη μοριακή ανάλυση του υπόκαμπου ήταν με μια ματιά ανασκόπησης αντίθετα από αυτά της αμυγδαλής. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Nr3c1* (GR) είναι σημαντικά μειωμένα για τα δείγματα «στρες» σε σχέση με τα δείγματα «ελέγχου». Αντίθετα, τα επίπεδα έκφρασης του *Ube3a* δεν φαίνεται να μεταβάλλονται ομοιόμορφα όπως στην περίπτωση της αμυγδαλής, με το δείγμα MD4 να παρουσιάζει μία πιο αισθητή αύξηση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανταπόκριση του δείγματος MD5 με ιδιαίτερα αυξημένη έκφραση για τα γονίδια *Nr3c2*

(MR), *Drd1a* και *Gilz*. Τα υπόλοιπα γονίδια ελέγχου του άξονα HPA δεν φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά και παρουσιάζουν μικρές μεμονομένες μεταβολές. Συνοψίζοντας, παρατηρούμε ότι ο ιππόκαμπος ευαισθητοποιείται αντιστρόφως ανάλογα σε σχέση με την αμυγδαλή, αν λάβουμε υπόψη τη γενικότερη μειωτική τάση στη γονιδιακή έκφραση. Αξίζει να τονισθεί βέβαια ότι και στις δύο δομές του εγκεφάλου ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών αποκρίνεται με την έκφραση σε επίπεδο mRNA να μεταβάλλεται σημαντικά.

Η διερεύνηση του επιγενετικού προφίλ σε επίπεδο DNA μεθυλίωσης του γονιδίου *Ube3a* έδειξε πολύ μικρές μεταβολές στο συνολικό ποσοστό μεθυλίωσης μεταξύ δειγμάτων «στρες» και «ελέγχου», με μία τάση αύξησης στα δείγματα που αντιπροσωπεύουν την έκθεση σε στρες μητρικής αποστέρησης. Αξίζει να σημειωθεί παρόλα αυτά, ότι εντοπίζονται ορισμένα σημεία εσωτερικά της περιοχής ανάλυσης, τα οποία έδειξαν ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί μια ένδειξη για περαιτέρω ανάλυση για τη διερεύνηση παραγόντων που επηρεάζουν επιλεκτικά τη δομή της χρωματίνης και κατ' επέκταση τη γονιδιακή έκφραση. Η αξιοποίηση των βιοπληροφορικών εργαλείων μας δίνει τη δυνατότητα να διερευνήσουμε μελλοντικά τις θέσεις μεθυλίωσης σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες που βρίσκονται στην περιοχή και είναι πιθανόν να επηρεάζουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου *Ube3a*. Μια επιπλέον υπόθεση για το παραπάνω αποτέλεσμα έγκειται στο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε καθώς και στον αριθμό δειγμάτων που αναλύθηκαν. Παρόλο που ο UBE3A αποτελεί παράγοντα ρύθμισης της μεταγραφικής ενεργότητας του GR, είναι πιθανόν το ήπιο στρες που εφαρμόστηκε να μην επηρέασε τη δράση του, καθώς ούτε σε επίπεδο μεταγραφής παρατηρούμε σημαντικές μεταβολές στο γονίδιο *Ube3a*. Τέλος, θεωρούμε ότι η ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων ζώων θα μας έδινε μία πιο ξεκάθαρη εικόνα για την επίδραση περιβαλλοντικών στρεσογόνων παραγόντων κατά τη νεαρή ηλικία στην επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στον εγκέφαλο κατά την ενηλικίωση.

Τέλος, σε πρωτεϊνικό επίπεδο παρατηρείται αυξημένη έκφραση της ενεργής μορφής του GR (pGR) στα στρεσορισμένα ζώα της πρώτης πειραματικής ομάδας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ ακριβώς το αντίθετο πρότυπο παρατηρείται για τη δεύτερη πειραματική ομάδα. Επομένως, ενώ η φωσφορυλίωση του GR αυξάνει στα δείγματα MD1-MD3, μειώνεται αντίστοιχα για τα δείγματα MD4-MD6. Οι παραπάνω

παρατηρήσεις αντανακλούν την ευαισθητοποίηση του άξονα HPA με διαφορετικό τρόπο στις δύο ομάδες. Αξίζει να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι η φωσφορυλίωση του GR είναι μια τροποποίηση που συμβαίνει σε φυσιολογικές συνθήκες, όμως παρουσία χρόνιου στρες όλο και περισσότερα μόρια GR φωσφορυλιώνονται. Αυτή η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του GR μπορεί να οδηγήσει σε εκφυλισμό των νευρώνων του ιππόκαμπου, γεγονός που μπορεί να αναστραφεί με τη χορήγηση αγχολυτικών (249). Υποθέτουμε ως εκ τούτου, ότι το περιβαλλοντικό ερέθισμα της μητρικής αποστέρησης είχε διαφορετική επίδραση στα πειραματόζωα που γεννήθηκαν σε διαφορετική χρονική στιγμή, παρόλο που χειρίστηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο. Διαφορετικά επίπεδα στρες μπορεί να αντανακλούν διαφορετικό πρότυπο φωσφορυλίωσης του GR στον ιππόκαμπο των μυών (250). Τα αποτελέσματα συμφωνούν με την αντίληψη ότι το γενετικό υπόβαθρο κάθε ατόμου ξεχωριστά μπορεί να αλληλεπιδρά κατάλληλα με το εκάστοτε περιβαλλοντικό ερέθισμα, διαμορφώνοντας τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Τα παραπάνω ευρήματα αποκαλύπτουν τη σημασία του ατομικού παράγοντα στην απόκριση του οργανισμού στο στρες μητρικής αποστέρησης και ενισχύουν τη σημασία της εξατομικευμένης διερεύνησης σε όλα τα επίπεδα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, στις μελέτες συμπεριφοράς υπό την επίδραση ενός ήπιου στρεσογόνου ερεθίσματος.

Συνοψίζοντας, βάσει των ανωτέρω αποτελεσμάτων, υποστηρίζουμε ότι η μητρική αποστέρηση και ο πρόωρος απογαλακτισμός οδηγούν σε μακροπρόθεσμες μεταβολές που δείχνουν διέγερση του άξονα HPA, γεγονός που υποδεικνύεται από αναπτυξιακές, συμπεριφορικές και μοριακές μεταβολές σε περιοχές του εγκεφάλου στα πειραματόζωα κατά τη φάση της ενηλικίωσης.

### **5.5 Μελέτη της επίδρασης του μηχανικού στρες (stretch) στον επαναπρογραμματισμό διαφοροποίησης ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων (hAT-MSCs) και διερεύνηση του προτύπου μεθυλίωσης του γονιδίου *GNAS***

Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε την υπόθεση ότι επιγενετικές αλλαγές συμβάλλουν στην προώθηση της οστεογένεσης των hAT-MSCs, η οποία εντείνεται εξαιτίας της εφαρμογής μηχανικού στρες στα κύτταρα. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από τις αλλαγές που παρατηρούνται στο προφίλ DNA μεθυλίωσης συγκεκριμένων ισομορφών του γονιδίου *GNAS* που σχετίζονται με την οστεογένεση. Τα εναλλακτικά



μετάγραφα που προκύπτουν είναι κρίσιμης σημασίας για το αίτιο που προκαλεί το φαινόμενο της έκτοπης οστεοποίησης, μια διαταραχή ιδιαίτερα συχνή σε ασθενείς ορθοπεδικών και άλλων χειρουργείων που παραμένουν σε ακινησία για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Τα μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα αποτέλεσαν το μέσο της διερεύνησης. Χαρακτηρίζονται από την ικανότητα πολυδυναμίας και μπορούν να απομονωθούν από ποικίλους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του λιπώδους. Είναι ευρέως γνωστό ότι η διαφοροποίησή τους σε διάφορους κυτταρικούς τύπους κατευθύνεται χημικά (251), παρόλα αυτά όμως, εξωγενή σήματα όπως η φυσική ή μηχανική πίεση μπορεί να επαναπρογραμματίσει τα κύτταρα και να επηρεάσει την οστεογένεση (252, 253). Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, το μηχανικό στρες επηρεάζει τον προγραμματισμό της διαφοροποίησης των καλλιεργούμενων κυττάρων ρυθμίζοντας το πρότυπο μεθυλίωσης του *GNAS*. Ο γενετικός τόπος του *GNAS* ρυθμίζεται από το μηχανισμό της γονιδιωματικής αποτύπωσης και αποτελεί βασικό παράγοντα ρύθμισης της διαφοροποίησης των προγονικών οστεοκυττάρων (220). Διερευνώντας ένα μεγάλο εύρος συνθηκών μηχανικού στρες, που εφαρμόστηκε για διάρκεια επτά και δεκαπέντε ημερών, παρατηρήσαμε επιτάχυνση στο ρυθμό οστεογένεσης όπως αποκαλύφθηκε από το φαινότυπο των κυττάρων σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Αυτό το φαινόμενο έγινε αντιληπτό στα κύτταρα που προήλθαν από τους πιο ηλικιωμένους δότες, παρόλο που οι οστεοειδικοί δείκτες που ελέγχθηκαν σε τυπική καλλιέργεια διαφοροποίησης έδειξαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης για όλα τα δείγματα. Το επόμενο στοιχείο προέκυψε από την ειδική για μεθυλίωση ανάλυση των επιλεγμένων περιοχών CpG. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μηχανικό στρες προκάλεσε μείωση του ποσοστού μεθυλίωσης και για τις δύο περιοχές που αντιστοιχούν στον υποκινητή του γονιδίου, τόσο για την ισομορφή NESP όσο και για την ισομορφή GNASXL. Μάλιστα διαπιστώθηκε ότι η διάρκεια του ερεθίσματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα και εντείνει ακόμα περισσότερο το αποτέλεσμα. Τα ευρήματά μας συμφωνούν με τα δεδομένα μιας μελέτης ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος στην οποία συγκρίνεται το προφίλ μεθυλίωσης μεταξύ μη διαφοροποιημένων βλαστικών κυττάρων και πλήρως διαφοροποιημένων οστεοκυττάρων (254). Οι μεθυλιωτικές αλλαγές κατά μήκος των τεσσάρων από τις πέντε περιοχές που αναλύθηκαν έδειξαν να ακολουθούν την ίδια τάση στη διακύμανση με εκείνη της συγκριτικής μελέτης. Ωστόσο, η ανομοιότητα στην τάση της μεθυλίωσης που παρατηρήθηκε στην ανάλυση της νησίδας CpG27 στις πειραματικές μας συνθήκες, αποδείχθηκε να είναι φυσιολογικά ανόμοια κατά μήκος της

περιοχής, όπως φαίνεται στη συγκριτική μελέτη. Επιπλέον στοιχεία προήλθαν από τη βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε περαιτέρω. Αποκαλύφθηκε ότι οι περιοχές CpG οι οποίες επηρεάστηκαν στατιστικά σημαντικά από τις συνθήκες του πειράματος τροποποιώντας το πρότυπο μεθυλίωσης, περιλαμβάνουν περιοχές πρόσδεσης ειδικών μοτίβων που ρυθμίζουν την αρχιτεκτονική της χρωματίνης. Τα στοιχεία αυτά (CTCFs) απουσιάζουν παρόλα αυτά από τις αντίστοιχες περιοχές στις οποίες παρατηρήσαμε μικρές μεθυλιωτικές αλλαγές. Τα CTCFs εμπλέκονται στην επιγενετική ρύθμιση αποτρέποντας την εξάπλωση της DNA μεθυλίωσης (255), οργανώνοντας τη δομή της χρωματίνης και ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων με αποτύπωμα. Η δράση τους περιλαμβάνει πρόσδεση σε μεταγραφικούς ενεργοποιητές και διακοπή της επικοινωνίας ενισχυτών και υποκινητών (256). Στην περίπτωση που μελετάμε, η απώλεια της μεθυλίωσης συνοδεύει τη φυσική εξέλιξη της διαφοροποίησης, ενώ οι συνθήκες στρες που εφαρμόστηκαν επιτάχυναν αυτή τη διαδικασία πιθανώς λόγω της επιγενετικής ρύθμισης της περιοχής του *GNAS*. Επομένως, τα στοιχεία της βιοπληροφορικής ανάλυσης συνδέουν το περιβαλλοντικό ερέθισμα με το εντοπισμένο πρότυπο απομεθυλίωσης.

Το γεγονός ότι παρατηρήσαμε έντονες μεθυλιωτικές αλλαγές στις περιοχές που βρίσκονται στον υποκινητή συνάδει με τη γενική παραδοχή ότι η απομεθυλίωση των υποκινητών γονιδίων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της γονιδιακής έκφρασης, καθώς επίσης ότι οι ισομορφές του *GNAS* χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης. Ωστόσο, δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί εάν η μεταγραφική διαδικασία ελέγχεται από τα υψηλά, τα χαμηλά ή τα σταθερά επίπεδα μεθυλίωσης. Επιπλέον μελέτες απαιτούνται ώστε να εξακριβωθεί ο ακριβής ρόλος του μηχανισμού της DNA μεθυλίωσης στην ανάπτυξη σοβαρών παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση της δυναμικής ενός σταθερού περιβαλλοντικού ερεθίσματος να οδηγήσει σε πρόκληση οστεοποίησης μεταβάλλοντας το πρότυπο μεθυλίωσης του γονιδίου *GNAS*. Τα αποτελέσματά μας προσφέρουν ένα στοιχείο που υποστηρίζει την υπόθεση ότι το μηχανικό στρες αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα ρύθμισης του επιγενετικού προτύπου, ενώ ταυτόχρονα παίζει σημαντικό ρόλο στην προώθηση της διαφοροποίησης στα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα. Η κατανόηση του μηχανισμού που συνδέει τις επιγενετικές τροποποιήσεις με το ρυθμό διαφοροποίησης των MSCs κάτω από την επίδραση στρες, μπορεί να οδηγήσει επιτυχώς στην ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής και στοχευμένης θεραπείας για την αντιμετώπιση της έκτοπης οστεοποίησης.

## **6. Συμπεράσματα – Μελλοντικοί στόχοι**

Μελετώντας διάφορα συστήματα του οργανισμού τα οποία έχουν ικανότητα προσαρμογής σε μεταβολές του περιβάλλοντος, όπως είναι η μητρική αποστέρηση, ή μια φαρμακολογική παρέμβαση για τον HPA άξονα, ή ένα μηχανικό στρες για τα οστεοκύτταρα, διαπιστώνουμε ότι τα κύτταρα χρησιμοποιούν «κοινή λογική» για να ανταποκρίνονται αποτελεσματικά σε αυτές τις αλλαγές κι αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να παίρνουμε πληροφορίες από το ένα σύστημα και να τις μεταφέρουμε στο άλλο.

Η έρευνά μας εστιάζεται μελλοντικά στην εκτενέστερη μελέτη της σημασίας των μιτοχονδρίων στις διαταραχές που οφείλονται σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Στόχος μας είναι η διερεύνηση της βιολογίας των μιτοχονδρίων σε όλα τα συστήματα που μελετήθηκαν σε αυτή τη διατριβή, καθώς οι ενδείξεις από τα πρώιμα αποτελέσματα σε αυτό το πεδίο αποκαλύπτουν ότι το μιτοχονδριακό προφίλ μεταβάλλεται σε ένα μοντέλο ζώων υψηλού και χαμηλού ενδογενούς άγχους.



## **7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

## 7.1 Περίληψη

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε η επίδραση περιβαλλοντικών ερεθισμάτων στη φυσιολογική ανάπτυξη ενός οργανισμού με τη ρύθμιση του γενετικού και επιγενετικού προφίλ μορίων που συμμετέχουν στην απόκριση στο στρες. Η μελέτη μας συμπεριέλαβε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα στην προσπάθεια να διερευνηθεί η στρεσογόνος δράση σε συστήματα *in vivo* και *in vitro*.

Το κύριο μέρος της εργασίας επικεντρώθηκε στις μεταβολές του προτύπου έκφρασης και μεθυλίωσης μορίων που συσχετίζονται με τη λειτουργία του άξονα HPA σε ένα πειραματικό μοντέλο μητρικής αποστέρησης. Το γενικό συμπέρασμα ήταν ότι το στρες μητρικής αποστέρησης και ο πρόωρος απογαλακτισμός οδηγούν σε μακροπρόθεσμες μεταβολές που δείχνουν ευαισθητοποίηση του άξονα HPA, με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών να μεταβάλλεται σημαντικά, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και πρωτεΐνης, με αντίθετη τάση στον ιππόκαμπο απ' ό,τι στην αμυγδαλή. Οι αλλαγές του προτύπου μεθυλίωσης του UBE3A, μιας πολύ σταθερής επιγενετικής τροποποίησης, επηρεάζει την έκφραση αυτού του γονιδίου, και κατά συνέπεια τη μεταγραφική ενεργότητα του GR, ενώ οι ατομικές διαφορές που παρατηρούνται αποκαλύπτουν τη σημασία του ατομικού παράγοντα στην απόκριση του οργανισμού στο στρεσογόνο ερέθισμα. Αντίστοιχα, διερευνήθηκε *in vitro* ο ρόλος των γλυκοκορτικοειδών στις ιδιότητες των νευρικών κυττάρων, μελετώντας την απόκριση κυττάρων νευροβλαστώματος στη χορήγηση δεξαμεθαζόνης. Τα ευρήματα έδειξαν ότι τα κύτταρα ανταποκρίθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας με αναστολή του κυτταρικού κύκλου, δίνοντας το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη του συστήματος των γλυκοκορτικοειδών σε κυτταρικό επίπεδο. Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσίασε η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης δύο συστημάτων που σχετίζονται με το στρες, των ενδοκανναβινοειδών και των κορτικοειδών. Τα αποτελέσματα μαρτυρούν ότι η ενδοφλέβια χορήγηση εκθετικά αυξανόμενων δόσεων Δ<sub>9</sub>-THC ενεργοποιεί τον άξονα HPA με αύξηση της έκφρασης των μορίων GR, MR και UBE3A. Συνολικά υποθέτουμε ότι το συνθετικό κανναβινοειδές μπορεί να περιορίζει τα συμπτώματα του στρες, δεδομένου ότι παρατηρούμε αντίθετα αποτελέσματα από εκείνα του μητρικού αποχωρισμού. Εξετάστηκε επίσης ο ρόλος των μιτοχονδρίων στην απόκριση του εγκεφάλου στο άγχος. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των συμπλόκων της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και των μορίων SLC25A22, NMDAR, Cyt C, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι

ο νευρικός φαινότυπος δεν συνδέεται με το μιτοχονδριακό πρωτέωμα. Ωστόσο χαμηλά επίπεδα άγχους φαίνεται να συνδέονται με υψηλή ροή ασβεστίου στα κύτταρα του ραβδωτού σώματος του εγκεφάλου. Τέλος, ένα σημαντικό μέρος της διατριβής εστιάστηκε στη διερεύνηση του πιθανού μηχανισμού ενεργοποίησης της οστεογένεσης κατά την επίδραση μηχανικού στρες σε διαφοροποιούμενα κύτταρα hAT-MSCs. Το πείραμα αυτό αποτέλεσε μια προσπάθεια απόδοσης σε κυτταρικό επίπεδο, του περιβάλλοντος που προκαλεί έκτοπη οστεοποίηση. Παρατηρήσαμε ότι η σταθερή επίδραση μηχανικού στρες στο κυτταρικό μας σύστημα οδήγησε σε πρόωμη οστεογένεση με ταυτόχρονη απομεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *GNAS*. Η πλήρης κατανόηση του μοριακού μηχανισμού μπορεί να συντελέσει στην εξέλιξη μεθόδων πρόληψης ή αντιμετώπισης της έκτοπης οστεοποίησης.

Κοινός στόχος των επιμέρους ενοτήτων της διατριβής ήταν η κατανόηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την ανταπόκριση του οργανισμού στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, με απώτερο σκοπό τη συμβολή στην εξέλιξη νέων θεραπευτικών μεθόδων για διαταραχές που έχουν ως αιτία διάφορες μορφές στρες.

## 7.2 Abstract

In this study we investigated the effect of environmental stimuli to the normal development of an organism by regulating the genetic and epigenetic profile of molecules involved in the system of stress response. Our study was conducted on different experimental models in an effort to investigate the stress effects, both *in vivo* and *in vitro*.

The main part of the study has focused on alterations of the expression and methylation pattern of molecules associated with the function of HPA axis in an experimental model of maternal deprivation. We concluded that Maternal Separation and Early Weaning (MSEW) lead to long-term changes, stimulating the HPA axis, with the glucocorticoid receptor changing considerably, both at the protein and transcription level, in an opposite way between hippocampus as oppose to amygdala. The epigenetic modification of UBE3A, in the DNA methylation level, confirms the transcriptional regulation of GR, while individual differences reveal the importance of the individual characteristics in the body's response to a stressful stimulus. Correspondingly, we investigated *in vitro* the role of glucocorticoids in the development of nerve cells, by studying the response of neuroblastoma cell lines to dexamethasone treatment. Our preliminary findings showed that the cells responded to different concentrations of the drug by cell cycle arrest, thereby launching further study of the glucocorticoid system at the cellular level. Additionally, our interest was focused on the investigation of the interaction of the endocannabinoid and corticosteroid systems, both associated with stress. The results reveal that the intravenous administration of exponentially elevating doses of  $\Delta_9$ -THC activates the HPA axis, by increasing the expression of GR, MR and UBE3A. To summarize, we suggest that the synthetic cannabinoid drug ( $\Delta_9$ -THC) can reduce the stress symptoms, since we observe opposite effects than those of maternal separation. Furthermore, we examined the role of mitochondria in the brain response to stress. The protein levels of the electron transport chain complexes and SLC25A22, NMDAR, Cyt C molecules, suggest that the anxiety phenotype is not associated with the mitochondrial proteome. However, low anxiety levels seem to be associated with high calcium flow in the brain striatum cells. Finally, a large part of this thesis has focused on the investigation of the possible mechanism which activates osteogenesis during the application of mechanical stress on hAT-MSCs. This experiment was conducted in an effort to simulate the environment that promotes the development of ectopic ossification. We observed that



the constant application of mechanical stress in the cell system promoted early osteogenesis and demethylation of the *GNAS* promoter regions. The complete understanding of the molecular mechanism may lead to the development of methods for the prevention or treatment of heterotopic ossification.

The common aim of the individual parts of this study was to understand the mechanisms that regulate the response of an organism to environmental stimuli, with a view to contributing to the development of new treatments for disorders caused by stress.



## 8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nature reviews Endocrinology*. 2009;5(7):374-81.
2. Ranson SW. Some Functions of the Hypothalamus: Harvey Lecture, December 17, 1936. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 1937;13(5):241-71.
3. Maclean PD. The limbic system ("visceral brain") and emotional behavior. *AMA archives of neurology and psychiatry*. 1955;73(2):130-4.
4. Provencal N, Binder EB. The effects of early life stress on the epigenome: From the womb to adulthood and even before. *Experimental neurology*. 2015;268:10-20.
5. Keller-Wood ME, Dallman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrine reviews*. 1984;5(1):1-24.
6. McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *European journal of pharmacology*. 2008;583(2-3):174-85.
7. Matthews SG. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatric research*. 2000;47(3):291-300.
8. Buckingham JC. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *British journal of pharmacology*. 2006;147 Suppl 1:S258-68.
9. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*. 2004;7(8):847-54.
10. Weaver IC, Diorio J, Seckl JR, Szyf M, Meaney MJ. Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1024:182-212.
11. Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, de Kloet ER. Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2010;34(6):853-66.
12. Rainnie DG, Bergeron R, Sajdyk TJ, Patil M, Gehlert DR, Shekhar A. Corticotrophin releasing factor-induced synaptic plasticity in the amygdala translates stress into emotional disorders. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(14):3471-9.
13. Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S. Stress, memory and the amygdala. *Nature reviews Neuroscience*. 2009;10(6):423-33.
14. Mitra R, Jadhav S, McEwen BS, Vyas A, Chattarji S. Stress duration modulates the spatiotemporal patterns of spine formation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(26):9371-6.
15. Vyas A, Pillai AG, Chattarji S. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*. 2004;128(4):667-73.
16. Morris JS, Frith CD, Perrett DI, Rowland D, Young AW, Calder AJ, et al. A differential neural response in the human amygdala to fearful and happy facial expressions. *Nature*. 1996;383(6603):812-5.
17. LeDoux JE. Emotion, memory and the brain. *Scientific American*. 1994;270(6):50-7.
18. Davis M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual review of neuroscience*. 1992;15:353-75.
19. Karl A, Schaefer M, Malta LS, Dorfel D, Rohleder N, Werner A. A meta-analysis of structural brain abnormalities in PTSD. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2006;30(7):1004-31.
20. Rodriguez F, Lopez JC, Vargas JP, Broglio C, Gomez Y, Salas C. Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish. *Brain research bulletin*. 2002;57(3-4):499-503.

21. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(9):662-73.
22. Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, et al. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*. 2005;120(2):169-81.
23. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*. 2007;447(7143):433-40.
24. Day JJ, Sweatt JD. DNA methylation and memory formation. *Nature neuroscience*. 2010;13(11):1319-23.
25. Roth TL. Epigenetics of neurobiology and behavior during development and adulthood. *Developmental psychobiology*. 2012;54(6):590-7.
26. Zhang TY, Meaney MJ. Epigenetics and the environmental regulation of the genome and its function. *Annual review of psychology*. 2010;61:439-66, C1-3.
27. Clayton DF. The genomic action potential. *Neurobiology of learning and memory*. 2000;74(3):185-216.
28. Martin C, Zhang Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Current opinion in cell biology*. 2007;19(3):266-72.
29. Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *The EMBO journal*. 1998;17(17):4905-8.
30. Santos-Reboucas CB, Pimentel MM. Implication of abnormal epigenetic patterns for human diseases. *European journal of human genetics : EJHG*. 2007;15(1):10-7.
31. Borrelli E, Nestler EJ, Allis CD, Sassone-Corsi P. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron*. 2008;60(6):961-74.
32. Day JJ, Sweatt JD. Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron*. 2011;70(5):813-29.
33. Gibbs WW. The unseen genome: beyond DNA. *Scientific American*. 2003;289(6):106-13.
34. Weaver IC. Epigenetic programming by maternal behavior and pharmacological intervention. *Nature versus nurture: let's call the whole thing off. Epigenetics*. 2007;2(1):22-8.
35. Maison C, Bailly D, Peters AH, Quivy JP, Roche D, Taddei A, et al. Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nature genetics*. 2002;30(3):329-34.
36. Sleutels F, Zwart R, Barlow DP. The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature*. 2002;415(6873):810-3.
37. Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41(1):87-95.
38. Gabory A, Jammes H, Dandolo L. The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2010;32(6):473-80.
39. Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):37-49.
40. Santos KF, Mazzola TN, Carvalho HF. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2005;38(10):1531-41.
41. Bartolomei MS, Tilghman SM. Genomic imprinting in mammals. *Annual review of genetics*. 1997;31:493-525.
42. Hornstra IK, Yang TP. High-resolution methylation analysis of the human hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene 5' region on the active and inactive X chromosomes: correlation with binding sites for transcription factors. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(2):1419-30.
43. Chen T, Hevi S, Gay F, Tsujimoto N, He T, Zhang B, et al. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nature genetics*. 2007;39(3):391-6.

44. Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Current topics in microbiology and immunology*. 2000;249:101-18.
45. Barber BA, Rastegar M. Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*. 2010;192(5):261-74.
46. Maunakea AK, Chepelev I, Zhao K. Epigenome mapping in normal and disease States. *Circulation research*. 2010;107(3):327-39.
47. Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang IC, Desai P, et al. Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(23):15763-73.
48. Fleissner E, Borek E. Studies on the Enzymatic Methylation of Soluble Rna. I. Methylation of the S-Rna Polymer. *Biochemistry*. 1963;2:1093-100.
49. Scarano E. Letter: DNA methylation. *Nature*. 1973;246(5434):539.
50. Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *Journal of cellular physiology*. 2005;204(1):21-35.
51. Baniushin BF. [Methylation of adenine residues in DNA of eukaryotes]. *Molekuliarnaia biologiiia*. 2005;39(4):557-66.
52. Vanyushin BF. Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Biochemistry Biokhimiiia*. 2005;70(5):488-99.
53. Gromova ES, Khoroshaev AV. [Prokaryotic DNA methyltransferases: the structure and the mechanism of interaction with DNA]. *Molekuliarnaia biologiiia*. 2003;37(2):300-14.
54. Buryanov Y, Shevchuk T. The use of prokaryotic DNA methyltransferases as experimental and analytical tools in modern biology. *Analytical biochemistry*. 2005;338(1):1-11.
55. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics*. 2000;9(16):2395-402.
56. Globisch D, Munzel M, Muller M, Michalakakis S, Wagner M, Koch S, et al. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS one*. 2010;5(12):e15367.
57. Richards EJ. Inherited epigenetic variation--revisiting soft inheritance. *Nature reviews Genetics*. 2006;7(5):395-401.
58. Choi JD, Lee JS. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. *Genomics & informatics*. 2013;11(4):164-73.
59. McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonte B, Szyf M, et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature neuroscience*. 2009;12(3):342-8.
60. Provencal N, Suderman MJ, Guillemin C, Massart R, Ruggiero A, Wang D, et al. The signature of maternal rearing in the methylome in rhesus macaque prefrontal cortex and T cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(44):15626-42.
61. Ooi SK, Bestor TH. The colorful history of active DNA demethylation. *Cell*. 2008;133(7):1145-8.
62. Sweatt JD. Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. *Biological psychiatry*. 2009;65(3):191-7.
63. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*. 2005;308(5727):1466-9.
64. Weintraub H. Assembly and propagation of repressed and depressed chromosomal states. *Cell*. 1985;42(3):705-11.
65. Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *The Journal of pathology*. 2001;195(1):97-110.

66. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(18):9821-6.
67. Siedlecki P, Zielenkiewicz P. Mammalian DNA methyltransferases. *Acta biochimica Polonica*. 2006;53(2):245-56.
68. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature genetics*. 1998;19(2):187-91.
69. Jeltsch A, Nellen W, Lyko F. Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. *Trends in biochemical sciences*. 2006;31(6):306-8.
70. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;70(4):495-501.
71. Heim C, Binder EB. Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. *Experimental neurology*. 2012;233(1):102-11.
72. Meaney MJ. Epigenetics and the biological definition of gene x environment interactions. *Child development*. 2010;81(1):41-79.
73. Meaney MJ, Szyf M. Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity? *Trends in neurosciences*. 2005;28(9):456-63.
74. Francis DD, Caldji C, Champagne F, Plotsky PM, Meaney MJ. The role of corticotropin-releasing factor--norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. *Biological psychiatry*. 1999;46(9):1153-66.
75. Caldji C, Hellstrom IC, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ. Environmental regulation of the neural epigenome. *FEBS letters*. 2011;585(13):2049-58.
76. Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(9):5335-40.
77. Veenema AH, Blume A, Niederle D, Buwalda B, Neumann ID. Effects of early life stress on adult male aggression and hypothalamic vasopressin and serotonin. *The European journal of neuroscience*. 2006;24(6):1711-20.
78. Veenema AH, Bredewold R, Neumann ID. Opposite effects of maternal separation on intermale and maternal aggression in C57BL/6 mice: link to hypothalamic vasopressin and oxytocin immunoreactivity. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32(5):437-50.
79. Veenema AH. Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: what can we learn from animal models? *Frontiers in neuroendocrinology*. 2009;30(4):497-518.
80. Teh AL, Pan H, Chen L, Ong ML, Dogra S, Wong J, et al. The effect of genotype and in utero environment on interindividual variation in neonate DNA methylomes. *Genome research*. 2014;24(7):1064-74.
81. Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, Irizarry RA, Aspelund T, Cui H, et al. Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *Jama*. 2008;299(24):2877-83.
82. Bell JT, Pai AA, Pickrell JK, Gaffney DJ, Pique-Regi R, Degner JF, et al. DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. *Genome biology*. 2011;12(1):R10.

83. Beyan H, Down TA, Ramagopalan SV, Uvebrant K, Nilsson A, Holland ML, et al. Guthrie card methylomics identifies temporally stable epialleles that are present at birth in humans. *Genome research*. 2012;22(11):2138-45.
84. Dolinoy DC, Das R, Weidman JR, Jirtle RL. Metastable epialleles, imprinting, and the fetal origins of adult diseases. *Pediatric research*. 2007;61(5 Pt 2):30R-7R.
85. Rakyan VK, Blewitt ME, Druker R, Preis JI, Whitelaw E. Metastable epialleles in mammals. *Trends in genetics : TIG*. 2002;18(7):348-51.
86. Mitchell JB, Rowe W, Boksa P, Meaney MJ. Serotonin regulates type II corticosteroid receptor binding in hippocampal cell cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1990;10(6):1745-52.
87. Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Weaver S, Yau J, Chapman K, et al. Postnatal handling increases the expression of cAMP-inducible transcription factors in the rat hippocampus: the effects of thyroid hormones and serotonin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(10):3926-35.
88. Weaver IC, D'Alessio AC, Brown SE, Hellstrom IC, Dymov S, Sharma S, et al. The transcription factor nerve growth factor-inducible protein a mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(7):1756-68.
89. Meaney MJ, Szyf M. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2005;7(2):103-23.
90. Moriceau S, Shionoya K, Jakubs K, Sullivan RM. Early-life stress disrupts attachment learning: the role of amygdala corticosterone, locus ceruleus corticotropin releasing hormone, and olfactory bulb norepinephrine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(50):15745-55.
91. Fareri DS, Tottenham N. Effects of early life stress on amygdala and striatal development. *Developmental cognitive neuroscience*. 2016;19:233-47.
92. Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, et al. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25(47):11045-54.
93. Murgatroyd C, Patchev AV, Wu Y, Micale V, Bockmuhl Y, Fischer D, et al. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nature neuroscience*. 2009;12(12):1559-66.
94. Mueller BR, Bale TL. Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(36):9055-65.
95. Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological psychiatry*. 2006;59(12):1116-27.
96. Turnamian SG, Binder HJ. Regulation of active sodium and potassium transport in the distal colon of the rat. Role of the aldosterone and glucocorticoid receptors. *The Journal of clinical investigation*. 1989;84(6):1924-9.
97. Meyer AS, Schmidt TJ. In contrast to glucocorticoid receptors, mineralocorticoid receptors are not autoregulated in rat distal colon epithelia. *Endocrinology*. 1994;134(3):1163-72.
98. Berecek KH, Barron KW, Webb RL, Brody MJ. Vasopressin-central nervous system interactions in the development of DOCA hypertension. *Hypertension*. 1982;4(3 Pt 2):131-7.
99. Bohn MC, O'Banion MK, Young DA, Giuliano R, Hussain S, Dean DO, et al. In vitro studies of glucocorticoid effects on neurons and astrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994;746:243-58; discussion 58-9, 89-93.

100. MacLusky NJ, Yuan H, Elliott J, Brown TJ. Sex differences in corticosteroid binding in the rat brain: an in vitro autoradiographic study. *Brain research*. 1996;708(1-2):71-81.
101. Funder JW. Mineralocorticoids, glucocorticoids, receptors and response elements. *Science*. 1993;259(5098):1132-3.
102. McCormick JA, Lyons V, Jacobson MD, Noble J, Diorio J, Nyirenda M, et al. 5'-heterogeneity of glucocorticoid receptor messenger RNA is tissue specific: differential regulation of variant transcripts by early-life events. *Molecular endocrinology*. 2000;14(4):506-17.
103. Turecki G, Meaney MJ. Effects of the Social Environment and Stress on Glucocorticoid Receptor Gene Methylation: A Systematic Review. *Biological psychiatry*. 2016;79(2):87-96.
104. Herman JP, Patel PD, Akil H, Watson SJ. Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. *Molecular endocrinology*. 1989;3(11):1886-94.
105. Venkova K, Johnson AC, Myers B, Greenwood-Van Meerveld B. Exposure of the amygdala to elevated levels of corticosterone alters colonic motility in response to acute psychological stress. *Neuropharmacology*. 2010;58(7):1161-7.
106. Korte SM, de Boer SF, de Kloet ER, Bohus B. Anxiolytic-like effects of selective mineralocorticoid and glucocorticoid antagonists on fear-enhanced behavior in the elevated plus-maze. *Psychoneuroendocrinology*. 1995;20(4):385-94.
107. Han F, Ding J, Shi Y. Expression of amygdala mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the single-prolonged stress rats. *BMC neuroscience*. 2014;15:77.
108. Arnett MG, Pan MS, Doak W, Cyr PE, Muglia LM, Muglia LJ. The role of glucocorticoid receptor-dependent activity in the amygdala central nucleus and reversibility of early-life stress programmed behavior. *Translational psychiatry*. 2015;5:e542.
109. Jiang Y, Lev-Lehman E, Bressler J, Tsai TF, Beaudet AL. Genetics of Angelman syndrome. *American journal of human genetics*. 1999;65(1):1-6.
110. Clayton-Smith J, Laan L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *Journal of medical genetics*. 2003;40(2):87-95.
111. Ramamoorthy S, Nawaz Z. E6-associated protein (E6-AP) is a dual function coactivator of steroid hormone receptors. *Nuclear receptor signaling*. 2008;6:e006.
112. Godavarthi SK, Dey P, Maheshwari M, Jana NR. Defective glucocorticoid hormone receptor signaling leads to increased stress and anxiety in a mouse model of Angelman syndrome. *Human molecular genetics*. 2012;21(8):1824-34.
113. van der Laan S, Sarabdjitsingh RA, Van Batenburg MF, Lachize SB, Li H, Dijkmans TF, et al. Chromatin immunoprecipitation scanning identifies glucocorticoid receptor binding regions in the proximal promoter of a ubiquitously expressed glucocorticoid target gene in brain. *Journal of neurochemistry*. 2008;106(6):2515-23.
114. D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, et al. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity*. 1997;7(6):803-12.
115. Cannarile L, Zollo O, D'Adamio F, Ayroldi E, Marchetti C, Tabilio A, et al. Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene. *Cell death and differentiation*. 2001;8(2):201-3.
116. Ayroldi E, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009;23(11):3649-58.
117. Bruscoli S, Di Virgilio R, Donato V, Velardi E, Baldoni M, Marchetti C, et al. Genomic and non-genomic effects of different glucocorticoids on mouse thymocyte apoptosis. *European journal of pharmacology*. 2006;529(1-3):63-70.



118. Eddleston J, Herschbach J, Wagelie-Steffen AL, Christiansen SC, Zuraw BL. The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2007;119(1):115-22.
119. Ingram WJ, Wicking CA, Grimmond SM, Forrest AR, Wainwright BJ. Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene*. 2002;21(53):8196-205.
120. Ellestad LE, Malkiewicz SA, Guthrie HD, Welch GR, Porter TE. Expression and regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper in the developing anterior pituitary gland. *Journal of molecular endocrinology*. 2009;42(2):171-83.
121. Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function\*. *Annual review of immunology*. 2000;18:309-45.
122. Thiagarajah AS, Eades LE, Thomas PR, Guymer EK, Morand EF, Clarke DM, et al. GILZ: Glitzing up our understanding of the glucocorticoid receptor in psychopathology. *Brain research*. 2014;1574:60-9.
123. Yachi K, Inoue K, Tanaka H, Yoshikawa H, Tohyama M. Localization of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) expressing neurons in the central nervous system and its relationship to the stress response. *Brain research*. 2007;1159:141-7.
124. Kalcheim C, Gendreau M. Brain-derived neurotrophic factor stimulates survival and neuronal differentiation in cultured avian neural crest. *Brain research*. 1988;469(1-2):79-86.
125. Branchi I. The mouse communal nest: investigating the epigenetic influences of the early social environment on brain and behavior development. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2009;33(4):551-9.
126. Boersma GJ, Lee RS, Cordner ZA, Ewald ER, Purcell RH, Moghadam AA, et al. Prenatal stress decreases Bdnf expression and increases methylation of Bdnf exon IV in rats. *Epigenetics*. 2014;9(3):437-47.
127. Carim-Todd L, Bath KG, Fulgenzi G, Yanpallewar S, Jing D, Barrick CA, et al. Endogenous truncated TrkB.T1 receptor regulates neuronal complexity and TrkB kinase receptor function in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(3):678-85.
128. Daskalakis NP, De Kloet ER, Yehuda R, Malaspina D, Kranz TM. Early Life Stress Effects on Glucocorticoid-BDNF Interplay in the Hippocampus. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2015;8:68.
129. Sabban EL, Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends in neurosciences*. 2001;24(2):91-8.
130. Van Craenenbroeck K, De Bosscher K, Vanden Berghe W, Vanhoenacker P, Haegeman G. Role of glucocorticoids in dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Molecular and cellular endocrinology*. 2005;245(1-2):10-22.
131. Autelitano DJ, Lundblad JR, Blum M, Roberts JL. Hormonal regulation of POMC gene expression. *Annual review of physiology*. 1989;51:715-26.
132. Bertagna X. Proopiomelanocortin-derived peptides. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 1994;23(3):467-85.
133. Brunetti L, Preziosi P, Ragazzoni E, Vacca M. Involvement of nitric oxide in basal and interleukin-1 beta-induced CRH and ACTH release in vitro. *Life sciences*. 1993;53(13):PL219-22.
134. Castro MG, Morrison E. Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Critical reviews in neurobiology*. 1997;11(1):35-57.
135. Drouin J, Nemer M, Charron J, Gagner JP, Jeannotte L, Sun YL, et al. Tissue-specific activity of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene and repression by glucocorticoids. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada*. 1989;31(2):510-9.
136. Jones MT, Gillham B. Factors involved in the regulation of adrenocorticotropic hormone/beta-lipotrophic hormone. *Physiological reviews*. 1988;68(3):743-818.

137. Kjaer A, Larsen PJ, Knigge U, Jorgensen H, Warberg J. Neuronal histamine and expression of corticotropin-releasing hormone, vasopressin and oxytocin in the hypothalamus: relative importance of H1 and H2 receptors. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 1998;139(2):238-43.
138. Lundblad JR, Roberts JL. Regulation of proopiomelanocortin gene expression in pituitary. *Endocrine reviews*. 1988;9(1):135-58.
139. Smith AI, Funder JW. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocrine reviews*. 1988;9(1):159-79.
140. Wardlaw SL, McCarthy KC, Conwell IM. Glucocorticoid regulation of hypothalamic proopiomelanocortin. *Neuroendocrinology*. 1998;67(1):51-7.
141. Uhler M, Herbert E, D'Eustachio P, Ruddle FD. The mouse genome contains two nonallelic pro-opiomelanocortin genes. *The Journal of biological chemistry*. 1983;258(15):9444-53.
142. Uhler M, Herbert E. Complete amino acid sequence of mouse pro-opiomelanocortin derived from the nucleotide sequence of pro-opiomelanocortin cDNA. *The Journal of biological chemistry*. 1983;258(1):257-61.
143. Zhou Y, Spangler R, Maggos CE, Wang XM, Han JS, Ho A, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal activity and pro-opiomelanocortin mRNA levels in the hypothalamus and pituitary of the rat are differentially modulated by acute intermittent morphine with or without water restriction stress. *The Journal of endocrinology*. 1999;163(2):261-7.
144. Zhou Y, Spangler R, LaForge KS, Maggos CE, Ho A, Kreek MJ. Modulation of CRF-R1 mRNA in rat anterior pituitary by dexamethasone: correlation with POMC mRNA. *Peptides*. 1996;17(3):435-41.
145. Schnydrig S, Korner L, Landweer S, Ernst B, Walker G, Otten U, et al. Peripheral lipopolysaccharide administration transiently affects expression of brain-derived neurotrophic factor, corticotropin and proopiomelanocortin in mouse brain. *Neuroscience letters*. 2007;429(1):69-73.
146. Stevens A, Begum G, Cook A, Connor K, Rumball C, Oliver M, et al. Epigenetic changes in the hypothalamic proopiomelanocortin and glucocorticoid receptor genes in the ovine fetus after periconceptual undernutrition. *Endocrinology*. 2010;151(8):3652-64.
147. Bai F, Sozen MA, Lukiw WJ, Argyropoulos G. Expression of AgRP, NPY, POMC and CART in human fetal and adult hippocampus. *Neuropeptides*. 2005;39(4):439-43.
148. Pahlman S, Mamaeva S, Meyerson G, Mattsson ME, Bjelfman C, Ortoft E, et al. Human neuroblastoma cells in culture: a model for neuronal cell differentiation and function. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum*. 1990;592:25-37.
149. Casulari LA, Dondi D, Maggi R, Demissie M, Piccolella M, Piva F. Dexamethasone blocks the migration of the human neuroblastoma cell line SK-N-SH. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2006;39(9):1233-40.
150. Maggi R, Poletti A, Casulari LA, Pimpinelli F, Piva F, Zanisi MR, et al. Effects and metabolism of steroid hormones in human neuroblastoma cells. *Steroids*. 1998;63(5-6):257-62.
151. Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer research*. 1989;49(1):219-25.
152. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research*. 1973;33(11):2643-52.
153. Pahlman S, Ruusala AI, Abrahamsson L, Mattsson ME, Esscher T. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell differentiation*. 1984;14(2):135-44.

154. Baulieu EE. The steroid hormone antagonist RU486. Mechanism at the cellular level and clinical applications. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 1991;20(4):873-91.
155. LePage KT, Dickey RW, Gerwick WH, Jester EL, Murray TF. On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. *Critical reviews in neurobiology*. 2005;17(1):27-50.
156. Salto R, Vilchez JD, Giron MD, Cabrera E, Campos N, Manzano M, et al. beta-Hydroxy-beta-Methylbutyrate (HMB) Promotes Neurite Outgrowth in Neuro2a Cells. *PloS one*. 2015;10(8):e0135614.
157. Provost P. Interpretation and applicability of microRNA data to the context of Alzheimer's and age-related diseases. *Aging*. 2010;2(3):166-9.
158. Ma R, Wang X, Lu C, Li C, Cheng Y, Ding G, et al. Dexamethasone attenuated bupivacaine-induced neuron injury in vitro through a threonine-serine protein kinase B-dependent mechanism. *Neuroscience*. 2010;167(2):329-42.
159. Kasckow JW, Han JH, Parkes DG, Mulchahey JJ, Owens MJ, Risby ED, et al. Regulation of corticotropin-releasing factor secretion and synthesis in the human neuroblastoma clones- BE(2)-M17 and BE(2)-C. *Journal of neuroendocrinology*. 1995;7(6):461-6.
160. Yamamori E, Iwasaki Y, Taguchi T, Nishiyama M, Yoshida M, Asai M, et al. Molecular mechanisms for corticotropin-releasing hormone gene repression by glucocorticoid in BE(2)C neuronal cell line. *Molecular and cellular endocrinology*. 2007;264(1-2):142-8.
161. Tsugita M, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Shinahara M, Taniguchi Y, et al. Glucocorticoid receptor plays an indispensable role in mineralocorticoid receptor-dependent transcription in GR-deficient BE(2)C and T84 cells in vitro. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;302(1):18-25.
162. Taniguchi Y, Iwasaki Y, Tsugita M, Nishiyama M, Taguchi T, Okazaki M, et al. Glucocorticoid receptor-beta and receptor-gamma exert dominant negative effect on gene repression but not on gene induction. *Endocrinology*. 2010;151(7):3204-13.
163. Zhang Z, Drzewiecki GJ, Hom JT, May PC, Hyslop PA. Human cortical neuronal (HCN) cell lines: a model for amyloid beta neurotoxicity. *Neuroscience letters*. 1994;177(1-2):162-4.
164. Trukenmiller ME, Kulaga H, Coggiano M, Wyatt R, Snyder SH, Sweetnam PM. Human cortical neuronal cell line: a model for HIV-1 infection in an immature neuronal system. *AIDS research and human retroviruses*. 1993;9(5):445-53.
165. Ronnett GV, Hester LD, Nye JS, Snyder SH. Human cerebral cortical cell lines from patients with unilateral megalencephaly and Rasmussen's encephalitis. *Neuroscience*. 1994;63(4):1081-99.
166. Ronnett GV, Hester LD, Nye JS, Connors K, Snyder SH. Human cortical neuronal cell line: establishment from a patient with unilateral megalencephaly. *Science*. 1990;248(4955):603-5.
167. Poltorak M, Isono M, Freed WJ, Ronnett GV, Snyder SH. Human cortical neuronal cell line (HCN-1): further in vitro characterization and suitability for brain transplantation. *Cell transplantation*. 1992;1(1):3-15.
168. Akirav I. Cannabinoids and glucocorticoids modulate emotional memory after stress. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2013;37(10 Pt 2):2554-63.
169. Kogan NM, Mechoulam R. The chemistry of endocannabinoids. *Journal of endocrinological investigation*. 2006;29(3 Suppl):3-14.
170. Breivogel CS, Sim-Selley LJ. Basic neuroanatomy and neuropharmacology of cannabinoids. *International review of psychiatry*. 2009;21(2):113-21.
171. Pazos MR, Nunez E, Benito C, Tolon RM, Romero J. Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2005;81(2):239-47.
172. Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, et al. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(23):9506-18.

173. Steiner MA, Wotjak CT. Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in brain research*. 2008;170:397-432.
174. Lafenetre P, Chaouloff F, Marsicano G. The endocannabinoid system in the processing of anxiety and fear and how CB1 receptors may modulate fear extinction. *Pharmacological research*. 2007;56(5):367-81.
175. Moreira FA, Lutz B. The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addiction biology*. 2008;13(2):196-212.
176. Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Cullinan WE, Hillard CJ. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*. 2004;145(12):5431-8.
177. Aso E, Ozaita A, Serra MA, Maldonado R. Genes differentially expressed in CB1 knockout mice: involvement in the depressive-like phenotype. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*. 2011;21(1):11-22.
178. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature reviews Drug discovery*. 2004;3(9):771-84.
179. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*. 2002;54(2):161-202.
180. Moreira FA, Wotjak CT. Cannabinoids and anxiety. *Current topics in behavioral neurosciences*. 2010;2:429-50.
181. Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A, et al. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nature medicine*. 2003;9(1):76-81.
182. Simone JJ, Green MR, Hodges TE, McCormick CM. Differential effects of CB1 receptor agonism in behavioural tests of unconditioned and conditioned fear in adult male rats. *Behavioural brain research*. 2015;279:9-16.
183. McNaughton N, Corr PJ. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2004;28(3):285-305.
184. Streck EL, Goncalves CL, Furlanetto CB, Scaini G, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Mitochondria and the central nervous system: searching for a pathophysiological basis of psychiatric disorders. *Revista brasileira de psiquiatria*. 2014;36(2):156-67.
185. Kromer SA, Kessler MS, Milfay D, Birg IN, Bunck M, Czibere L, et al. Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25(17):4375-84.
186. Zhang Y, Filiou MD, Reckow S, Gormanns P, Maccarrone G, Kessler MS, et al. Proteomic and metabolomic profiling of a trait anxiety mouse model implicate affected pathways. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2011;10(12):M111 008110.
187. Williams JM, Thompson VL, Mason-Parker SE, Abraham WC, Tate WP. Synaptic activity-dependent modulation of mitochondrial gene expression in the rat hippocampus. *Brain research Molecular brain research*. 1998;60(1):50-6.
188. Filiou MD, Zhang Y, Teplytska L, Reckow S, Gormanns P, Maccarrone G, et al. Proteomics and metabolomics analysis of a trait anxiety mouse model reveals divergent mitochondrial pathways. *Biological psychiatry*. 2011;70(11):1074-82.
189. Einat H, Yuan P, Manji HK. Increased anxiety-like behaviors and mitochondrial dysfunction in mice with targeted mutation of the Bcl-2 gene: further support for the involvement of mitochondrial function in anxiety disorders. *Behavioural brain research*. 2005;165(2):172-80.
190. Nussbaumer M, Asara JM, Teplytska L, Murphy MP, Logan A, Turck CW, et al. Selective Mitochondrial Targeting Exerts Anxiolytic Effects In Vivo. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2016;41(7):1751-8.

191. Yen YC, Anderzhanova E, Bunck M, Schuller J, Landgraf R, Wotjak CT. Co-segregation of hyperactivity, active coping styles, and cognitive dysfunction in mice selectively bred for low levels of anxiety. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2013;7:103.
192. Yen YC, Gassen NC, Zellner A, Rein T, Landgraf R, Wotjak CT, et al. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibition in the medial prefrontal cortex mediates paradoxical amphetamine action in a mouse model of ADHD. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2015;9:67.
193. Martin SJ, Morris RG. New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus*. 2002;12(5):609-36.
194. Kemp A, Manahan-Vaughan D. Hippocampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(21):8192-7.
195. Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature reviews Neuroscience*. 2012;13(3):169-82.
196. Coyle JT, Basu A, Benneyworth M, Balu D, Konopaske G. Glutamatergic synaptic dysregulation in schizophrenia: therapeutic implications. *Handbook of experimental pharmacology*. 2012(213):267-95.
197. Corlett PR, Honey GD, Krystal JH, Fletcher PC. Glutamatergic model psychoses: prediction error, learning, and inference. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2011;36(1):294-315.
198. Oda Y. [Cognitive Function and Calcium. NMDA receptor activity dependent intracellular Ca increase in neurons]. *Clinical calcium*. 2015;25(2):209-15.
199. Atlas D. The voltage-gated calcium channel functions as the molecular switch of synaptic transmission. *Annual review of biochemistry*. 2013;82:607-35.
200. Craddock N, Sklar P. Genetics of bipolar disorder. *Lancet*. 2013;381(9878):1654-62.
201. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews*. 2005;57(4):411-25.
202. Dao DT, Mahon PB, Cai X, Kovacsics CE, Blackwell RA, Arad M, et al. Mood disorder susceptibility gene CACNA1C modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans. *Biological psychiatry*. 2010;68(9):801-10.
203. Hardingham GE, Cruzalegui FH, Chawla S, Bading H. Mechanisms controlling gene expression by nuclear calcium signals. *Cell calcium*. 1998;23(2-3):131-4.
204. Sarkar SN, Huang RQ, Logan SM, Yi KD, Dillon GH, Simpkins JW. Estrogens directly potentiate neuronal L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(39):15148-53.
205. Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM, Greenberg ME. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*. 2001;294(5541):333-9.
206. West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, et al. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(20):11024-31.
207. White JA, McKinney BC, John MC, Powers PA, Kamp TJ, Murphy GG. Conditional forebrain deletion of the L-type calcium channel Ca<sub>v</sub>1.2 disrupts remote spatial memories in mice. *Learning & memory*. 2008;15(1):1-5.
208. Moosmang S, Haider N, Klugbauer N, Adelsberger H, Langwieser N, Muller J, et al. Role of hippocampal Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25(43):9883-92.

209. Lohberger B, Kaltenecker H, Stundl N, Payer M, Rinner B, Leithner A. Effect of cyclic mechanical stimulation on the expression of osteogenesis genes in human intraoral mesenchymal stromal and progenitor cells. *BioMed research international*. 2014;2014:189516.
210. Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, Ignatius A, Claes L. Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and C1CP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity. *Journal of biomechanics*. 2000;33(1):45-51.
211. Hu B, El Haj AJ, Dobson J. Receptor-targeted, magneto-mechanical stimulation of osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(9):19276-93.
212. Wagner ER, He BC, Chen L, Zuo GW, Zhang W, Shi Q, et al. Therapeutic Implications of PPARgamma in Human Osteosarcoma. *PPAR research*. 2010;2010:956427.
213. Fu G, Ren A, Qiu Y, Zhang Y. Epigenetic regulation of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Current stem cell research & therapy*. 2015.
214. Arnsdorf EJ, Tummala P, Castillo AB, Zhang F, Jacobs CR. The epigenetic mechanism of mechanically induced osteogenic differentiation. *Journal of biomechanics*. 2010;43(15):2881-6.
215. Chen JC, Chua M, Bellon RB, Jacobs CR. Epigenetic changes during mechanically induced osteogenic lineage commitment. *Journal of biomechanical engineering*. 2015;137(2):020902.
216. Kelsey G. Imprinting on chromosome 20: tissue-specific imprinting and imprinting mutations in the GNAS locus. *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics*. 2010;154C(3):377-86.
217. Peters J, Wroe SF, Wells CA, Miller HJ, Bodle D, Beechey CV, et al. A cluster of oppositely imprinted transcripts at the Gnas locus in the distal imprinting region of mouse chromosome 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(7):3830-5.
218. Shore EM, Ahn J, Jan de Beur S, Li M, Xu M, Gardner RJ, et al. Paternally inherited inactivating mutations of the GNAS1 gene in progressive osseous heteroplasia. *The New England journal of medicine*. 2002;346(2):99-106.
219. Shore EM, Kaplan FS. Inherited human diseases of heterotopic bone formation. *Nature reviews Rheumatology*. 2010;6(9):518-27.
220. Pignolo RJ, Xu M, Russell E, Richardson A, Kaplan J, Billings PC, et al. Heterozygous inactivation of Gnas in adipose-derived mesenchymal progenitor cells enhances osteoblast differentiation and promotes heterotopic ossification. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26(11):2647-55.
221. Zhang S, Kaplan FS, Shore EM. Different roles of GNAS and cAMP signaling during early and late stages of osteogenic differentiation. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2012;44(10):724-31.
222. Davies SJ, Hughes HE. Imprinting in Albright's hereditary osteodystrophy. *Journal of medical genetics*. 1993;30(2):101-3.
223. George ED, Bordner KA, Elwafi HM, Simen AA. Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect. *BMC neuroscience*. 2010;11:123.
224. Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology*. 2003;226:3-6.
225. Shapiro R, Weisgras JM. Bisulfite-catalyzed transamination of cytosine and cytidine. *Biochemical and biophysical research communications*. 1970;40(4):839-43.
226. Hayatsu H, Wataya Y, Kazushige K. The addition of sodium bisulfite to uracil and to cytosine. *Journal of the American Chemical Society*. 1970;92(3):724-6.
227. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(5):1827-31.

228. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
229. Crochemore C, Michaelidis TM, Fischer D, Loeffler JP, Almeida OF. Enhancement of p53 activity and inhibition of neural cell proliferation by glucocorticoid receptor activation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16(8):761-70.
230. Lamberts SW, Koper JW, de Jong FH. The endocrine effects of long-term treatment with mifepristone (RU 486). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1991;73(1):187-91.
231. Abush H, Akirav I. Cannabinoids ameliorate impairments induced by chronic stress to synaptic plasticity and short-term memory. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2013;38(8):1521-34.
232. Gorzalka BB, Hill MN, Hillard CJ. Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2008;32(6):1152-60.
233. Viveros MP, Marco EM, File SE. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2005;81(2):331-42.
234. Kristiansen LV, Huerta I, Beneyto M, Meador-Woodruff JH. NMDA receptors and schizophrenia. *Current opinion in pharmacology*. 2007;7(1):48-55.
235. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological reviews*. 2005;57(4):397-409.
236. Lee AS, Gonzales KL, Lee A, Moosmang S, Hofmann F, Pieper AA, et al. Selective genetic deletion of *cacna1c* in the mouse prefrontal cortex. *Molecular psychiatry*. 2012;17(11):1051.
237. Karst H, Karten YJ, Reichardt HM, de Kloet ER, Schutz G, Joels M. Corticosteroid actions in hippocampus require DNA binding of glucocorticoid receptor homodimers. *Nature neuroscience*. 2000;3(10):977-8.
238. Chameau P, Qin Y, Spijker S, Smit AB, Joels M. Glucocorticoids specifically enhance L-type calcium current amplitude and affect calcium channel subunit expression in the mouse hippocampus. *Journal of neurophysiology*. 2007;97(1):5-14.
239. Liebmann L, Karst H, Sidiropoulou K, van Gemert N, Meijer OC, Poirazi P, et al. Differential effects of corticosterone on the slow afterhyperpolarization in the basolateral amygdala and CA1 region: possible role of calcium channel subunits. *Journal of neurophysiology*. 2008;99(2):958-68.
240. Baitharu I, Deep SN, Jain V, Prasad D, Ilavazhagan G. Inhibition of glucocorticoid receptors ameliorates hypobaric hypoxia induced memory impairment in rat. *Behavioural brain research*. 2013;240:76-86.
241. Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, et al. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Developmental neuroscience*. 1996;18(1-2):49-72.
242. Millstein RA, Holmes A. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2007;31(1):3-17.
243. Oomen CA, Girardi CE, Cahyadi R, Verbeek EC, Krugers H, Joels M, et al. Opposite effects of early maternal deprivation on neurogenesis in male versus female rats. *PloS one*. 2009;4(1):e3675.
244. Whitten CF, Pettit MG, Fischhoff J. Evidence that growth failure from maternal deprivation is secondary to undereating. *Jama*. 1969;209(11):1675-82.
245. Dhungel S. Effect of maternal deprivation on growth of Wistar rats in preweaning period. *Kathmandu University medical journal*. 2007;5(2):210-4.

246. Penke Z, Felszeghy K, Fernette B, Sage D, Nyakas C, Burlet A. Postnatal maternal deprivation produces long-lasting modifications of the stress response, feeding and stress-related behaviour in the rat. *The European journal of neuroscience*. 2001;14(4):747-55.
247. Matsumoto Y, Yoshihara T, Yamasaki Y. Maternal deprivation in the early versus late postnatal period differentially affects growth and stress-induced corticosterone responses in adolescent rats. *Brain research*. 2006;1115(1):155-61.
248. Fabricius K, Wortwein G, Pakkenberg B. The impact of maternal separation on adult mouse behaviour and on the total neuron number in the mouse hippocampus. *Brain structure & function*. 2008;212(5):403-16.
249. Zhang K, Pan X, Wang F, Ma J, Su G, Dong Y, et al. Baicalin promotes hippocampal neurogenesis via SGK1- and FKBP5-mediated glucocorticoid receptor phosphorylation in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Scientific reports*. 2016;6:30951.
250. Hapgood JP, Avenant C, Moliki JM. Glucocorticoid-independent modulation of GR activity: Implications for immunotherapy. *Pharmacology & therapeutics*. 2016;165:93-113.
251. Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta biomaterialia*. 2011;7(2):463-77.
252. Delaine-Smith RM, Reilly GC. Mesenchymal stem cell responses to mechanical stimuli. *Muscles, ligaments and tendons journal*. 2012;2(3):169-80.
253. Chen JC, Jacobs CR. Mechanically induced osteogenic lineage commitment of stem cells. *Stem cell research & therapy*. 2013;4(5):107.
254. Hakelien AM, Bryne JC, Harstad KG, Lorenz S, Paulsen J, Sun J, et al. The regulatory landscape of osteogenic differentiation. *Stem cells*. 2014;32(10):2780-93.
255. Wang H, Maurano MT, Qu H, Varley KE, Gertz J, Pauli F, et al. Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome research*. 2012;22(9):1680-8.
256. Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*. 2000;405(6785):482-5.



