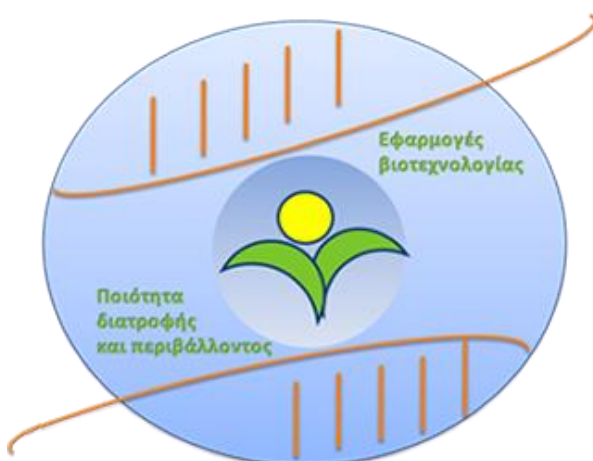


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**



**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΠΥΡΗΝΙΚΩΝ
ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΜΥΙΚΩΝ
ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

ΧΡΗΣΤΟΣ ΣΟΥΓΛΕΡΗΣ

2024

**Διερεύνηση της διαφορικής έκφρασης πυρηνικών
υποδοχέων κατά τη διαφοροποίηση μυϊκών κυττάρων**

**Assessment of the differential expression of nuclear
receptors during muscle cell differentiation**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα

ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Μέλος

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΣΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Μέλος

ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ψαρρά Άννα Μαρία για την ευκαιρία που μου προσέφερε ώστε να είμαι μέλος της ερευνητικής της ομάδας, για την άριστη συνεργασία που είχαμε, το ενδιαφέρον, τη βοήθεια και τις γνώσεις που μου μετέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο που υπήρξε ένας άριστος συνεργάτης και μέντορας, για την καθημερινή βοήθεια και στήριξη του, την υπομονή του και τις γνώσεις που μου έδωσε κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την άψογη συνεργασία.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που με στηρίζει σε κάθε μου βήμα, χωρίς την οποία δε θα μπορούσα να τα καταφέρω.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα οιστρογόνα και τα γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ορμόνες (SHs) που επηρεάζουν ποικιλοτρόπως μεταξύ άλλων, το αναπαραγωγικό, ανοσολογικό, καρδιαγγειακό και σκελετικό σύστημα. Μέσω της σύνδεσης τους στους αντίστοιχους στεροειδείς υποδοχείς, τους υποδοχείς οιστρογόνων άλφα και βήτα (ERα και ERβ) και τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) οι οποίοι δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες, γίνεται ο έλεγχος στην έκφραση γονιδίων στόχων μέσω μεταγραφής που πραγματοποιείται στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια. Τα υπεροξεισώματα είναι υποκυτταρικά οργάνιδια, τα οποία περιέχουν ένζυμα που επηρεάζουν πολλές μεταβολικές διεργασίες των λιπαρών οξέων, όπως η β-οξειδωση. Σημαντικός ρυθμιστής του μεταβολισμού λιπαρών οξέων αποτελεί ο πυρηνικός υποδοχέας, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα, από πολλαπλασιαστική υπεροξεισωμάτων ενεργοποιούμενος υποδοχέας άλφα), ο οποίος λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και ενεργοποιείται από λιπαρά οξέα. Η πρωτεΐνη MyoD αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας των Μυογενικών Ρυθμιστικών Παραγόντων (MRF) και έχει σπουδαίο ρόλο στη διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης, κατά τη διάρκεια της μυογένεσης. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των πιθανών μεταβολών των πρωτεϊνικών επιπέδων των GR, ERα, PPARα και του δείκτη διαφοροποίησης MyoD1 κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης κυττάρων μυοβλαστών C2C12. Για την καλύτερη δυνατή αποσαφήνιση του ρόλου των υποδοχέων στη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων C2C12, που προκαλείται από ορό αλόγου (horse serum), σε δύο συγκεκριμένα διαφορετικά χρονικά διαστήματα εξέλιξης της διαδικασίας, αυτό των 4 και 6 ημερών στοχευμένα, μελετήθηκαν οι πιθανές μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων σε συνδυασμό με την παρουσία και απουσία των στεροειδών ορμονών E2, DEX και DPN. Σύμφωνα με την ανάλυση των αποτελεσμάτων μας, που προέκυψαν μετά από ανασοαποτύπωση κατά Western, και παρουσιάζονται ως λόγοι μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων κανονικοποιημένων ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της β-ακτίνης και συγκρινόμενα με τον αντίστοιχο λόγο στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα (non-differentiated, ND) C2C12 (τιμή λόγο «1»), τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα φάνηκαν να σημειώνουν αύξηση, οδηγώντας

στην υπόθεση πως ο ERα πιθανόν να έχει ρόλο στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των σκελετικών μυών. Το ίδιο ενδεχομένως να ισχύει και όσο αφορά τον GR, με τα αποτελέσματα να χρήζουν περισσότερης διερεύνησης και επιβεβαίωσης. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα σημείωσαν κλιμακωτή πτώση κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες, γεγονός που μπορεί να ερμηνευτεί ως μειωμένη πρόσληψη και μεταβολισμό λιπαρών οξέων και υδατανθράκων. Ο δείκτης διαφοροποίησης MyoD1 έδειξε αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων κατά την εξέλιξη της διαφοροποίησης των μυοβλαστών συμβαδίζοντας με την υπάρχουσα βιβλιογραφία αποτελώντας έναν αξιόπιστο δείκτη.

Λέξεις κλειδιά: στεροειδείς ορμόνες (SHs), υποδοχέας οιστρογόνων α (ERα), υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR), από πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων ενεργοποιούμενος υποδοχέας άλφα (PPARα), MyoD1, διαφοροποίηση

ABSTRACT

Estrogens and glucocorticoids are steroid hormones (SHs) that affect, among others, the reproductive, immune, cardiovascular and skeletal systems. Through their binding to the respective steroid receptors, the estrogen receptors alpha and beta (ERα and ERβ) and the glucocorticoid receptor (GR) which act as transcription factors, they control the expression of target genes through transcription that takes place both in the nucleus and in the mitochondria. Peroxisomes are subcellular organelles, which contain enzymes that affect many fatty acid metabolic processes such as β-oxidation, and are regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα), a fatty acid activated receptor, which acts as a transcription factor. MyoD is a transcription factor of the Myogenic Regulatory Factors (MRF) family and has an important role in the process of cell differentiation during myogenesis. The aim of the thesis is to study the possible changes in the protein levels of GR,

ER α , PPAR α and the differentiation marker MyoD1 during C2C12 myoblast cell differentiation. At time points of 4 and 6 days upon induction of horse serum induced - C2C12 cells differentiation, in the presence or absence of the steroid hormones E2, DEX or DPN, the protein levels of the receptors were studied in. According to the analysis of our results, obtained after Western blot analysis, and presented as ratios between the protein levels of the receptors normalized to the corresponding levels of β -actin and compared to the corresponding ratio of the non-differentiated cells (non-differentiated, ND) C2C12 (ratio value «1»), the protein levels of ER α increased at C2C12 differentiated cells, leading to the hypothesis that the ER α may have a role at the early stages of skeletal muscle development. The same may be true as far as GR is concerned, with the results needing more investigation and confirmation. PPAR α protein levels showed a progressive decline during differentiation compared to control cells, which can be interpreted as reduced fatty acid and carbohydrate uptake and metabolism. The differentiation marker MyoD1 showed an increase in its protein levels during the progression of myoblast differentiation in line with the existing literature, considered MyoD as a reliable differentiation marker.

Key words: steroid hormones (SHs), estrogen receptor α (ER α), glucocorticoid receptor (GR), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), MyoD1, differentiation

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1 Στεροειδείς ορμόνες και υποδοχείς στεροειδών ορμονών	12
1.2 Οιστρογόνα.....	13
1.2.1 Δομή υποδοχέων οιστρογόνων (ERs).....	14
1.2.2 Μονοπάτια σηματοδότησης του υποδοχέα οιστρογόνων	15
1.3 Γλυκοκορτικοειδή.....	16
1.3.1 Δομή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR).....	18
1.3.2 Μονοπάτια σηματοδότησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.....	19
1.4 Υποδοχέας ενεργοποιούμενος από πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων ισομορφή α (PPARα).....	21
1.4.1 Δομή του PPARα.....	22
1.4.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια του PPARα.....	24
1.4.3 Έκφραση του PPARα	25
1.5 Σκελετικοί μύες	26
1.6 Μυογένεση και οικογένεια Μυογενικών Ρυθμιστικών Παραγόντων (MRFs)	27
1.7 Δομή της MyoD.....	28
1.7.1 Έκφραση της MyoD στους σκελετικούς μύες.....	29
1.8 Τα οιστρογόνα στους σκελετικούς μύες	30
1.9 Γλυκοκορτικοειδή στους σκελετικούς μύες.....	31
1.10 PPARα στους σκελετικούς μύες.....	32
1.11 Κυτταρική διαφοροποίηση	34
1.11.1 Οιστρογόνα στη διαφοροποίηση των σκελετικών μυών	34

1.11.2 Γλυκοκορτικοειδή στη διαφοροποίηση των σκελετικών μυών	35
1.11.3 MyoD στη διαφοροποίηση σκελετικών μυών	36
1.12 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας	37
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	38
2.1.1 Οργανολογία κυτταροκαλλιέργειών	38
2.1.2 Οργανολογία εργαστηριακού χώρου	38
2.2 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	38
2.3 ΧΗΜΙΚΑ.....	39
2.3.1 Αντιδραστήρια.....	39
2.3.2 Διαλύματα	40
2.3.3 Θρεπτικά υλικά	41
2.3.4 Αντισώματα.....	42
2.4 Καλλιέργεια κυττάρων.....	42
2.5 Θρυψινοποίηση κυττάρων	42
2.6 Μέτρηση και επίστρωση κυττάρων	43
2.7 Προσθήκη ουσιών	43
2.8 Συλλογή και λύση κυττάρων	44
2.9 Μέθοδος Bradford.....	45
2.10 Ηλεκτροφόρηση – SDS PAGE.....	45
2.11 Ηλεκτρομεταφορά – Transfer.....	46
2.12 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western.....	46
2.13 Ανάλυση αποτελεσμάτων	47
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	47
3.1 Μελέτη των πιθανών μεταβολών στα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR, ERα, PPARα κατά τη διαφοροποίηση των C2C12 κυττάρων απουσία στεροειδών ορμονών	47

3.2 Μελέτη των πιθανών μεταβολών στα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR, ERα, PPARα κατά τη διαφοροποίηση των C2C12 κυττάρων για 4 και 6 ημέρες απουσία και παρουσία στεροειδών ορμονών	50
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	54
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	60

Περιεχόμενες εικόνες

Εικόνα 1. Χημική δομή ενδογενών οιστρογόνων [3].	13
Εικόνα 2. Δομική απεικόνιση των υποδοχέων οιστρογόνων (ERα και ERβ) [3].	15
Εικόνα 3. Μονοπάτια σηματοδότησης των ERs [3]......	16
Εικόνα 4. Ρύθμιση της έκκρισης γλυκοκορτικοειδούς ορμόνης από τον HPA [6].	17
Εικόνα 5. Δομική απεικόνιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) [7]......	19
Εικόνα 6. Μονοπάτια σηματοδότησης του GR [7]......	21
Εικόνα 7. Δομική απεικόνιση του PPARα [9]......	23
Εικόνα 8. PPRE εξαρτώμενο μονοπάτι σηματοδότησης [9]......	24
Εικόνα 9. PPRE ανεξάρτητο μονοπάτι σηματοδότησης [9]......	24
Εικόνα 10. Διαδικασία της μυογένεσης [10].	28
Εικόνα 11. Δομική απεικόνιση της MyoD [13].	29
Εικόνα 12. Μορφολογική ανάλυση διαφοροποίησης σε κύτταρα C2C12. Α: Μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Β: Στάδιο αρχικής διαφοροποίησης (24 ώρες μετά από στέρωση θρεπτικού). Γ: Πρώιμα στάδια ένωσης μυοβλαστών. Δ: Μέσο στάδιο διαφοροποίησης – Εμφάνιση μυοσωλήνων (3-5 ημέρες). Ε: Τελικό στάδιο διαφοροποίησης – Πολυπύρρηνοι μυοσωλήνες (7-10 ημέρες) [15].	37
Εικόνα 13. Απεικόνιση των πρωτεϊνικών ζωνών που αντιπροσωπεύουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR, ERα, PPARα και MyoD1 σε μη διαφοροποιημένα (ND) και διαφοροποιημένα (DIF) για 2,4,6,8 ημέρες C2C12 κύτταρα απουσία στεροειδών ορμονών..	49

Εικόνα 14. Απεικόνιση των πρωτεϊνικών ζωνών που αντιπροσωπεύουν τις μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων των GR, ERα, PPARα και MyoD1 σε μη διαφοροποιημένα (ND) και διαφοροποιημένα (DIF) έως την 4^η και 6^η ημέρα C2C12 κύτταρα απουσία και παρουσία στεροειδών ορμονών.....53

Περιεχόμενοι πίνακες

Πίνακας 1. Συστατικά των δύο φάσεων του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης...46

Περιεχόμενα διαγράμματα

Διάγραμμα 1. Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων διερεύνησης των πιθανών μεταβολών στα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR, ERα, PPARα και MyoD1 σε σύστημα μη διαφοροποιημένων (ND) και διαφοροποιημένων (DIF) για 2,4,6,8 ημέρες κυττάρων C2C12, απουσία στεροειδών ορμονών. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη και η σύγκριση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται ως προς τη συνθήκη των μη διαφοροποιημένων (ND) C2C12 κυττάρων.
.....48

Διάγραμμα 2. Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων για την πιθανή μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων των GR, ERα, PPARα και MyoD1 σε σύστημα μη διαφοροποιημένων (ND), διαφοροποιημένων (DIF) έως την 4^η και 6^η ημέρα C2C12 κυττάρων, απουσία και παρουσία στεροειδών ορμονών E2, DEX και DPN σε τελικές συγκεντρώσεις (10^{-9} M), (10^{-8} M) και (10^{-8} M) αντίστοιχα. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη και η σύγκριση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται προς τη συνθήκη των μη διαφοροποιημένων (ND) C2C12 απουσία των στεροειδών ορμονών.....51

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Στεροειδείς ορμόνες και υποδοχείς στεροειδών ορμονών

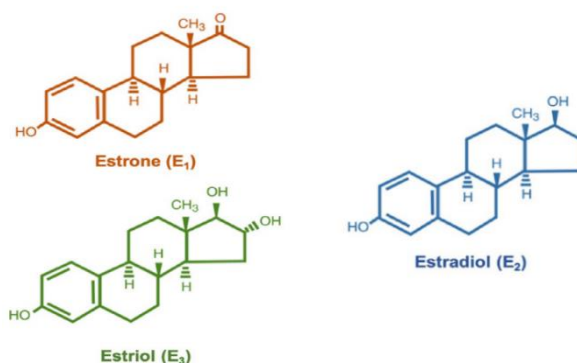
Οι στεροειδείς ορμόνες (Steroid Hormones, SHs) είναι λιπόφιλα μόρια που προέρχονται από το μόριο της χοληστερόλης και παράγονται σε διάφορους αδένες, όπως στον φλοιό των επινεφριδίων (γλυκοκορτικοειδή, μεταλλοκορτικοειδή, ανδρογόνα), στους όρχεις (ανδρογόνα, οιστρογόνα), στις ωοθήκες και στο πλακούντα (οιστρογόνα, προγεστερόνες). Οι SHs ταξιδεύουν στο σώμα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος συνδεδεμένες σε πρωτεΐνες φορείς, τις σφαιρίνες, και διεισδύουν εύκολα στα κύτταρα στόχους μέσω απλής διάχυσης, λόγω της λιποδιαλυτής φύσης τους. Είναι υπεύθυνες για πληθώρα κυτταρικών και φυσιολογικών διεργασιών όπως η σεξουαλική διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός, η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή. Η διατάραξη της φυσιολογικής λειτουργίας των SHs μπορεί να προκαλέσει ασθένειες όπως ο διαβήτης και διάφορους τύπους καρκίνου. Στα κύτταρα στόχους, οι SHs συνδέονται με τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών (Hormone Receptors, SHRs) [1].

Οι SHRs είναι μέλη της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων (Nuclear Receptors, NCRs), οι οποίοι λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Στους SHRs ανήκουν ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER), ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR), ο υποδοχέας ανδρογόνων (AR) και ο υποδοχέας προγεστερόνης (PR). Ενώ οι NCRs ενεργοποιούνται από πληθώρα λιποδιαλυτών σημάτων όπως το ρετινοϊκό οξύ και οι οξυστερόλες, οι SHRs ενεργοποιούνται από τις SHs. Κατόπιν ενεργοποίησης στα κύτταρα στόχους, οι SHRs ρυθμίζουν την μεταγραφή γονιδίων, και είναι υπεύθυνοι για πληθώρα βιολογικών λειτουργιών όπως η κυτταρική διαίρεση και πολλαπλασιασμός, ο μεταβολισμός, η διαφοροποίηση και η αναπαραγωγή. Καθώς αυτοί οι υποδοχείς ρυθμίζουν πολλές διεργασίες, η απορρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας τους μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις. Σε αυτές συγκαταλέγονται αρκετές ασθένειες όπως ο καρκίνος και ο διαβήτης. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους και υπάρχει αυξανόμενος αριθμός μελετών για τον σχεδιασμό αγωνιστών και

ανταγωνιστών προκειμένου να διατηρηθούν οι φυσιολογικές τους δράσεις με όσο το δυνατόν λιγότερες παρενέργειες [1, 2].

1.2 Οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα (estrogens) είναι ομάδα στεροειδών ορμονών γνωστά και ως οι θηλυκές ορμόνες, καθώς παράγονται κατά κύριο λόγο στα ωοθυλάκια, τον πλακούντα και το ωχρό σωματίο. Στα ενδογενή οιστρογόνα συγκαταλέγονται η οιστρόνη (E1), η οιστραδιόλη (E2) και η οιστρόλη (E3). Δομικά αποτελούνται από 18 άνθρακες ($C_{18}H_{24}O_2$) διατεταγμένους σε 3 δακτυλίους κυκλοεξανίου και 1 δακτύλιο κυκλοπεντανίου. Η 17β-οιστραδιόλη αποτελεί το κύριο κυκλοφορούν οιστρογόνο, το οποίο βρίσκεται σε αφθονία πριν την εμμηνόπαυση [3]. Τα οιστρογόνα έχουν σημαντικές επιδράσεις στην ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και τις φυσιολογικές λειτουργίες των αναπαραγωγικών οργάνων. Επιπρόσθετα, επηρεάζουν εκτός του αναπαραγωγικού συστήματος και το ανοσολογικό, καρδιαγγειακό, σκελετικό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Στους άνδρες, αν και τα οιστρογόνα βρίσκονται σε αρκετά χαμηλότερη ποσότητα, είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό του σπέρματος, τη λίμπιντο και την στυτική λειτουργία. Χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων σε άτομα τρίτης ηλικίας ή μετά την εμμηνόπαυση μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα οστεοπόρωσης, χοληστερόλης και αθηροσκλήρωσης ενώ φυσιολογικά επίπεδα συμβάλουν στην αποτροπή απώλειας μυϊκής και οστικής μάζας, που μπορούν να οδηγήσουν σε σαρκοπενία και γενικότερη αδυναμία [3, 4, 5].



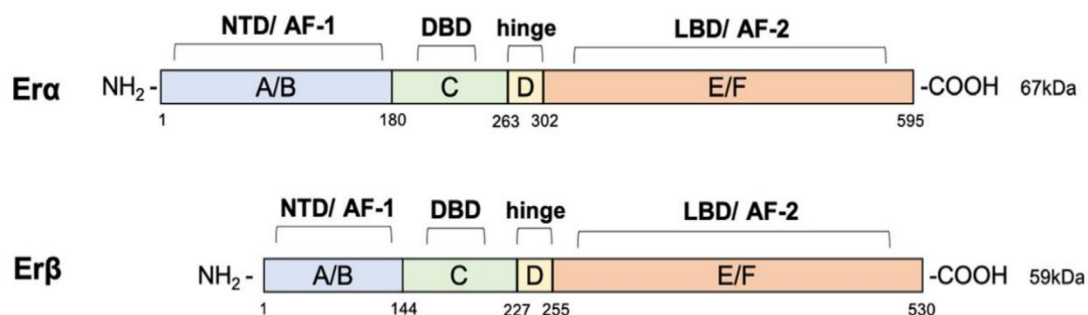
Εικόνα 1. Χημική δομή ενδογενών οιστρογόνων [3].

1.2.1 Δομή υποδοχέων οιστρογόνων (ERs)

Τα οιστρογόνα ως SHs, συνδέονται με τις ισομορφές των υποδοχέων οιστρογόνων α/β (ERα/ERβ). Αυτοί λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες εξαρτώμενοι από τη σύνδεση προσδέτη (οιστρογόνου) και είναι βασικά μέλη των SHRs. Τα γονίδια ESR1 (χρωμόσωμα 6, θέση 6q25.1) και ESR2 (χρωμόσωμα 14, θέση 14q23-24), κωδικοποιούν τον ERα και τον ERβ, αντίστοιχα. Και οι δυο υποδοχείς κωδικοποιούνται από 8 εξόνια. Η πρωτεΐνη του ERα έχει μήκος 595 αμινοξέα και μοριακό βάρος 67 kDa, ενώ του ERβ αποτελείται από 530 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 59 kDa. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο είναι η βραχύτερη αμινοτελική περιοχή (NTD) του ERβ [3].

Οι ERα και ERβ εντοπίζονται στην ανενεργή τους μορφή κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Η δομή τους αποτελείται από 4 βασικές περιοχές. Η λιγότερο συντηρημένη **A/B περιοχή** αποτελεί το αμινοτελικό άκρο (**NTD**) και εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της γονιδιακής trans-μεταγραφής. Περιέχει την περιοχή ενεργοποίησης 1 (AF-1), η οποία ρυθμίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα των ERs, ενεργοποιώντας την ακόμα και χωρίς σύνδεση προσδέτη. Η **περιοχή C** είναι ο τομέας σύνδεσης στο DNA (**DBD**), είναι εξαιρετικά διατηρημένη σε ποσοστό 97%, και αποτελείται από 2 δακτυλίους ψευδαργύρου οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την σύνδεση του υποδοχέα με το DNA. Η περιοχή Proximal box (Pbox) στο πρώτο δακτύλιο είναι απαραίτητη για την αναγνώριση της παλινδρομικής αλληλουχίας DNA των στοιχείων απόκρισης οιστρογόνου (EREs) (αλληλουχία ERE:GGTCAnnnTGACC, όπου n=οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο). Η περιοχή Distal box (Dbox) στο δεύτερο δακτύλιο ψευδαργύρου είναι απαραίτητη για τον διμερισμό των ERs. Η **περιοχή άρθρωσης ή D**, ενώνει τις περιοχές C και E, και είναι συνδεδεμένη με πρωτεΐνες συνοδούς (Chaperone proteins). Αυτή η περιοχή περιλαμβάνει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), το οποίο εκτίθεται μετά την αποδέσμευση του υποδοχέα από τις πρωτεΐνες συνοδούς, και τη σύνδεση του με οιστρογόνο, επιτρέποντας το σύμπλοκο υποδοχέα-οιστρογόνου να μετατοπιστεί στον πυρήνα. Τέλος, η **περιοχή E/F**, γνωστή και ως περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (**LBD**) αποτελεί το καρβοξυτελικό άκρο. Ο σχηματισμός ενός σφαιρικού θύλακα από 12 α-έλικες δέχεται το οιστρογόνο, μαζί με θέσεις δέσμευσης για συν-ενεργοποιητές και συν-καταστολείς της μεταγραφής. Η σύνδεση με οιστρογόνο είναι απαραίτητη

για τη λειτουργία ενεργοποίησης 2 (AF-2). Η AF-2 εμποδίζει την AF-1 να δράσει χωρίς προσδέτη [3, 4].

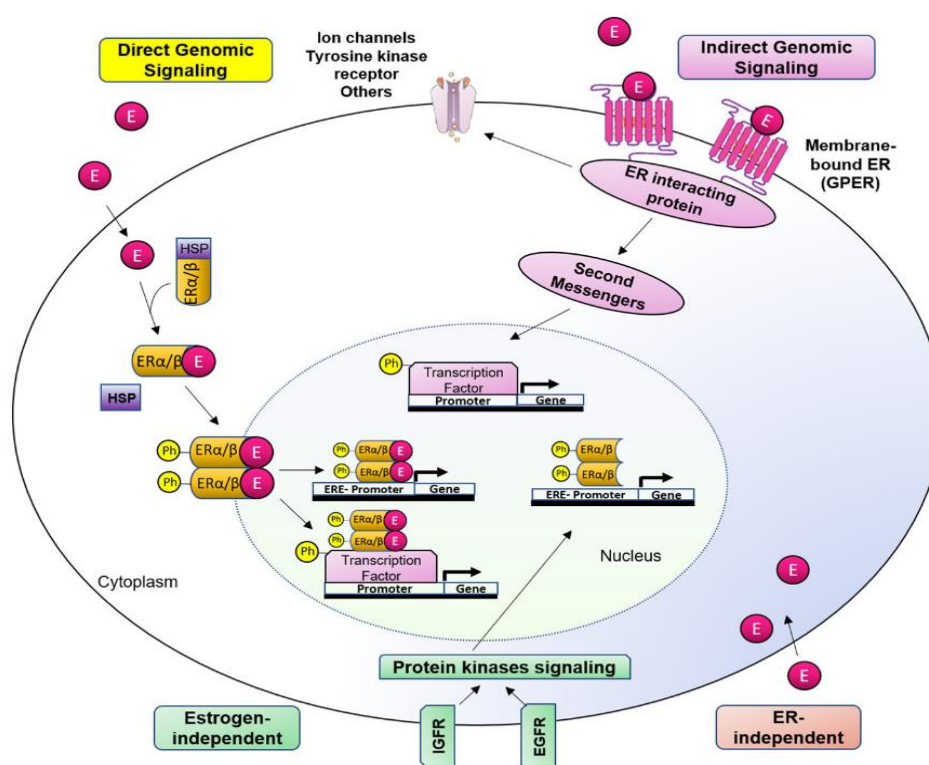


Εικόνα 2. Δομική απεικόνιση των υποδοχέων οιστρογόνων (ERα και ERβ) [3].

1.2.2 Μονοπάτια σηματοδότησης του υποδοχέα οιστρογόνων

Οι σημαντικές δομικές τροποποιήσεις που προκύπτουν από τη δέσμευση των οιστρογόνων, επιτρέπουν στους ERs να διμερίζονται και να μετατοπίζονται στον πυρήνα. Εκεί, μέσω **άμεσης γενωμικής σηματοδότησης**, συνδέονται με μοτίβα των EREs, σε περιοχές ενισχυτών εντός ή κοντά σε προαγωγείς (promoters), και/ή σε 3' αμετάφραστες περιοχές των γονιδίων στόχων, και προκαλούν αλλαγές στη δομή της χρωματίνης, ελέγχοντας τη μεταγραφή των γονιδίων αυτών, μέσω στρατολόγησης συν-ενεργοποιητών και συν-καταστολέων. Τόσο ο ERα όσο και ο ERβ μπορούν να συνδεθούν απευθείας με το DNA, ωστόσο ο ERα μπορεί να ξεκινήσει την μεταγραφή, χωρίς να συνδεθεί άμεσα με το DNA. Αυτή η **έμμεση γενωμική σηματοδότηση** γίνεται μέσω αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, δηλαδή με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον SP1, AP-1 και RUNX1 και στοιχεία απόκρισης αυτών στο DNA, αποτελώντας έναν ακόμα τρόπο με τον οποίο οι ERs ρυθμίζουν την ενεργοποίηση ή καταστολή της έκφρασης ενός γονιδίου στόχου [3]. Οι υποδοχείς οιστρογόνων μπορούν να ξεκινήσουν και **γρήγορα μη γενωμικά μονοπάτια** σηματοδότησης, που έχουν ως αποτέλεσμα έμμεσες αλλαγές γονιδιακής έκφρασης. Ο GRP30, γνωστός και ως υποδοχέας οιστρογόνου συζευγμένος με πρωτεΐνη G, βρίσκεται στις ενδοπλασματικές μεμβράνες και σε αυτές της συσκευής Golgi, και είναι ο τρόπος με τον οποίο τα οιστρογόνα μπορούν να ξεκινήσουν την ενεργοποίηση

μεταγωγής σηματοδότησης όπως το κυκλικό AMP (cAMP) με την παραγωγή ενδοκυτταρικών δεύτερων αγγελιοφόρων, και να ενεργοποιήσουν καταρράκτες σηματοδότησης πρωτεϊνικών κινάσων όπως το PLC/PKC μονοπάτι, τον καταρράκτη Ras/Raf/MAPK, τον καταρράκτη κινάσης PI3K/Akt και την οδό σηματοδότησης cAMP/PKA. Ακόλουθη φωσφορυλίωση μεταγραφικών παραγόντων από αυτές τις κινάσες, έχει την ικανότητα να αλλάξει την λειτουργία και δυνατότητα σύνδεσης τους σε γενωμικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να επηρεαστεί η γονιδιακή έκφραση [3, 4].

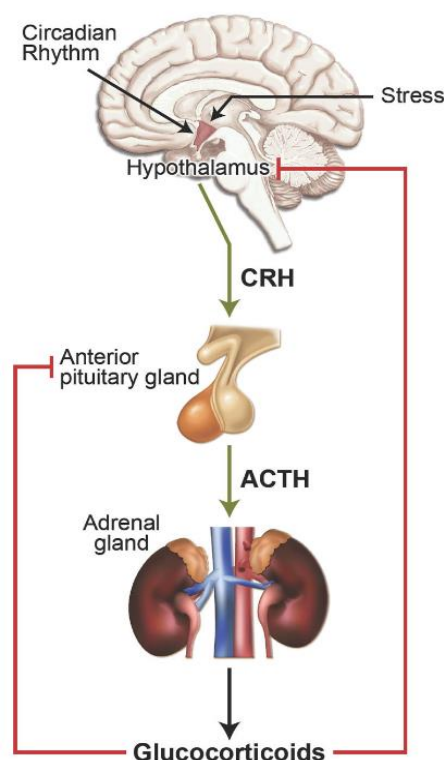


Εικόνα 3. Μονοπάτια σηματοδότησης των ERs [3].

1.3 Γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoids, GCs) είναι στεροειδείς ορμόνες και παράγονται από τον φλοιό των επινεφριδίων, που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA) ως απόκριση στο στρες και τις μεταβολικές αλλαγές [6]. Οι τρεις κύριες ενδογενείς ορμόνες GCs είναι η κορτιζόλη, η κορτικοστερόνη στα τρωκτικά και η κορτιζόνη που είναι

ανενεργή μέχρι να μετατραπεί σε κορτιζόλη ή κορτικοστερόνη από την 11β υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση τύπου 1 (11β-HSD1). Αντίθετα, η 11β HSD τύπου 2 μετατρέπει την ενεργή κορτιζόλη σε ανενεργή κορτιζόνη. Τα GCs έχουν μεγάλη επίδραση σε ποικιλία φυσιολογικών διεργασιών όπως ο μεταβολισμός, η σκελετική ανάπτυξη, η καρδιαγγειακή και ανοσοποιητική λειτουργία καθώς και η αναπαραγωγή. Λόγω των αντιφλεγμονωδών και αναστοκατασταλτικών ιδιοτήτων τους, τα συνθετικά GCs χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία φλεγμονωδών και αυτοάνοσων ασθενειών, την απόρριψη μοσχεύματος οργάνων και τη θεραπεία καρκίνων του λεμφικού συστήματος.



Εικόνα 4. Ρύθμιση της έκκρισης γλυκοκορτικοειδούς ορμόνης από τον HPA [6].

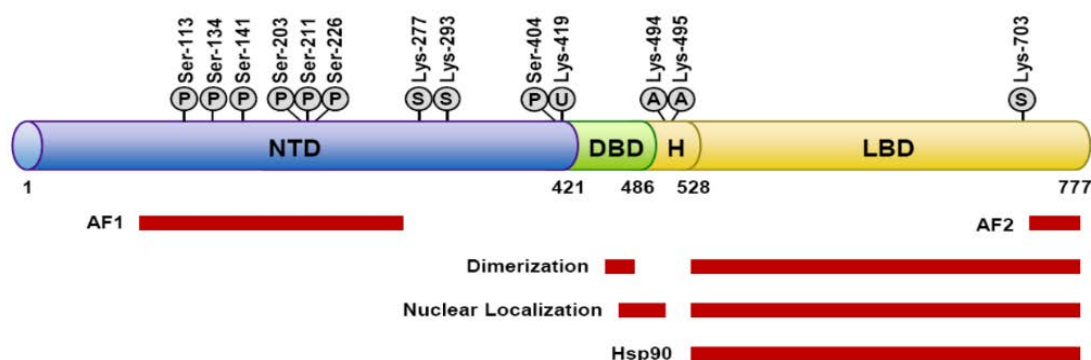
Ωστόσο, τα θεραπευτικά τους οφέλη παρεμποδίζονται από σοβαρές παρενέργειες όπως η οστεοπόρωση, η δερματική ατροφία, ο διαβήτης, το γλαύκωμα και η υπέρταση, όταν χορηγούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Οι φυσιολογικές και φαρμακολογικές ενέργειες των GCs διενεργούνται μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR). Η κυτταρική απόκριση στα GCs είναι ποικιλόμορφη, παρουσιάζοντας μεγάλη ευαισθησία. Η ευαισθησία στα GCs ποικίλει από άτομο σε άτομο, από ιστό σε ιστό του ίδιου ατόμου, ακόμη και εντός του ίδιου κυττάρου κατά τη διάρκεια διαφορετικών σταδίων του κυτταρικού κύκλου. Οι διάφορες ισομορφές του GR υπόκεινται σε διάφορες μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, που ρυθμίζουν περαιτέρω τις ιδιότητες σηματοδότησής τους. Η κυτταρική απόκριση στα GCs προσδιορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις μεμονωμένες δράσεις των ισομορφών GR [6, 7, 8].

1.3.1 Δομή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR)

Όπως και οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERs), ο GR είναι μέλος της υπερικογενείας πυρηνικών υποδοχέων (NCRs). Το γονίδιο του GR (NR3C1), βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 (θέση 5q31) και αποτελείται από 9 εξόνια. Η πιο κλασική και σε μεγαλύτερη ποσότητα ισομορφή του GR είναι ο GRα. Πριν την ενεργοποίησή του, βρίσκεται κατά κύριο λόγο στο κυτταρόπλασμα. Η πρωτεΐνη του αποτελείται από 777 αμινοξέα, μοριακού βάρους 94 kDa και έχει 4 λειτουργικές περιοχές [6, 7].

Η **αμινοτελική περιοχή** ενεργοποίησης της trans-μεταγραφής (**NTD**), είναι η λιγότερο συντηρημένη περιοχή, και μέρος της είναι η προσδετο-ανεξάρτητη μεταγραφική περιοχή 1 (AF-1), η οποία είναι κρίσιμη για την αλληλεπίδραση του GR με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, αναδιαμορφωτές χρωματίνης και τον βασικό μεταγραφικό μηχανισμό. Η AF-1 είναι απαραίτητη για τη μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση. Η **κεντρική περιοχή σύνδεσης στο DNA (DBD)** περιέχει 2 εξαιρετικά διατηρημένους δακτυλίους ψευδαργύρου, που είναι απαραίτητοι για τη σύνδεση της αλληλουχίας των στοιχείων απόκρισης γλυκοκορτικοειδών (GREs) των γονιδίων στόχων, από τον GR. Η περιοχή DBD επίσης περιέχει το σήμα πυρηνικού εντοπισμού 1 (NLS1), το οποίο μοιράζεται με την περιοχή άρθρωσης (H), και τα σήματα πυρηνικής κατακράτησης και εξαγωγής, όλα σημαντικά στον έλεγχο της κυτταρικής μεταφοράς του υποδοχέα. Η περιοχή Dbox που βρίσκεται στο δεύτερο δακτύλιο ψευδαργύρου είναι απαραίτητη για τον φυσιολογικό διμερισμό του GR. Ανάμεσα στην DBD και την LBD, βρίσκεται η **περιοχή άρθρωσης (H)**, η οποία παρέχει ευελιξία για αλλαγές στη διαμόρφωση και αλλοστερικές αλληλεπιδράσεις με τους συμπαράγοντες μεταγραφής, τον βασικό μεταγραφικό εξοπλισμό και το DNA. Σε απόκριση στη σύνδεση στο DNA, η περιοχή άρθρωσης συμμετέχει σε αμφίδρομη σηματοδότηση μεταξύ των περιοχών του υποδοχέα. Η καρβοξυτελική **C-τελική περιοχή** είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση του προσδέτη (**LBD**), σχηματίζοντας έναν υδρόφοβο θύλακα από 12 α-έλικες και 4 β-πτυχωτά φύλλα, που είναι απαραίτητος για την σύνδεση των GCs και τις αλληλεπιδράσεις με συν-ρυθμιστές, παράγοντες μεταγραφής και πρωτεΐνες συνοδούς θερμικού σοκ HSP70/90. Στην LBD περιλαμβάνονται επίσης η προσδετο-εξαρτώμενη

μεταγραφική περιοχή ενεργοποίησης 2 (AF-2) και ένα δεύτερο σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS2) [6, 7].



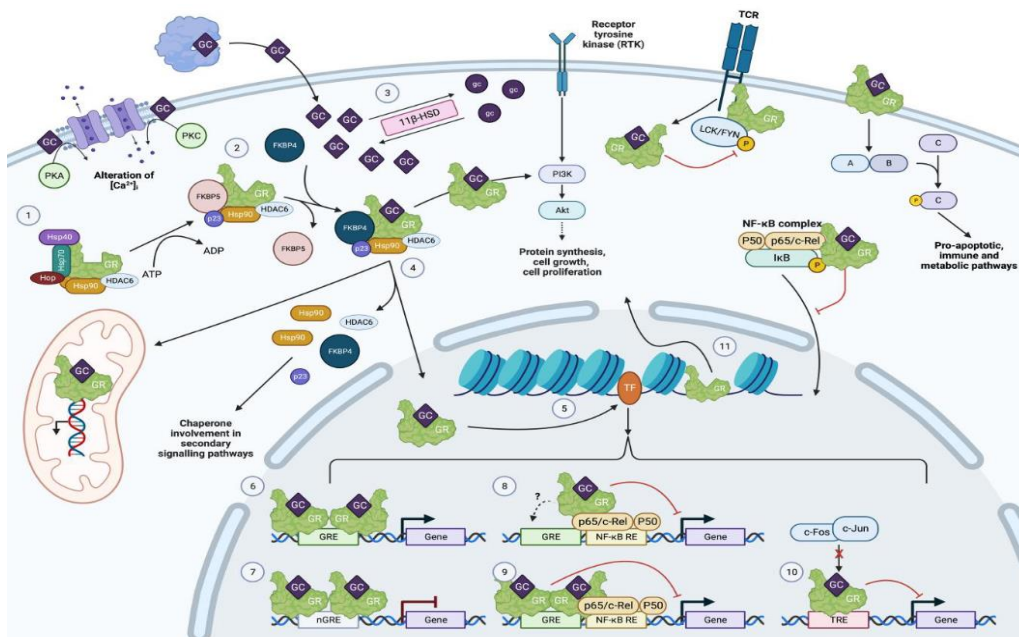
Εικόνα 5. Δομική απεικόνιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) [6].

1.3.2 Μονοπάτια σηματοδότησης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

Ο GR αρχικά εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένος με ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες HSP70/90, αναστοφιλίνες της οικογένειας FK506 (FKBP4, FKBP5), και κινάσες τυροσίνης (c-Src), οι οποίες εμποδίζουν τον GR να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας, διατηρώντας όμως παράλληλα και διαμόρφωση με υψηλή συγγένεια για GCs. Μέσω του **άμεσου μονοπατιού δράσης**, η σύνδεση του GR με τα GCs προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωσή του, ανταλλαγή του FKBP5 για το FKBP4 εντός του συμπλέγματος και απόσπασή του από το σύμπλεγμα πρωτεϊνών, εκθέτοντας έτσι τα NLS1 και NLS2 διευκολύνοντας την πυρηνική μετατόπιση του GR. Με αυτόν τον τρόπο ο GR μπορεί να ξεκινήσει τη μεταγραφική τροποποίηση του γονιδίου στόχου [7]. Τα ομοδιμερή του GR είναι ικανά να συνδέονται με την αλληλουχία των GREs εντός του προαγωγέα, του εσωνίου ή του εξονίου των γονιδίων στόχων για να προκαλέσουν την trans-ενεργοποίησή τους. Η συναινετική αλληλουχία GRE αποτελείται από ένα ατελές παλίνδρομο με δύο ημιθέσεις, κάθε μια από τις οποίες συνδέει συνεργατικά μια υπομονάδα του GR ομοδιμερούς, διαχωρισμένη από έναν κρίσιμο διαχωριστή (spacer) 3 bp που είναι απαραίτητος για να επιτρέψει την κατάλληλη διαμόρφωση του GR. Η δέσμευση των GREs δεν οδηγεί πάντα σε trans-ενεργοποίηση. Η κατάληψη των GREs από τον GR έχει αποδειχτεί πως επάγει

την καταστολή γονιδίων στόχων, υποδηλώνοντας ότι άλλοι μηχανισμοί μπορούν να ρυθμίσουν τη δραστηριότητα GR-GRE. Αρνητικά GREs (nGREs), τα οποία έχουν πιο μεταβλητή αλληλουχία, καταστέλλουν τη μεταγραφή αφού έχουν δεσμευτεί με τα 2 αναστραμμένα μονομερή του GR, αποτρέποντας έτσι την αλληλεπίδραση με τη Dbox και επομένως τον διμερισμό, έχοντας στρατολογήσει αποακετυλάσες καταστολής της ιστόνης. Μέσω **έμμεσων μηχανισμών δράσης**, ο GR αλληλοεπιδρά φυσικά με μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται με το DNA, είτε ενισχύοντας (STAT3) είτε καταστέλλοντας (NF-κB) τη λειτουργία τους. Ο GR μπορεί επίσης να μετακινηθεί στα μιτοχόνδρια και να ρυθμίσει τη μεταγραφή του μιτοχονδριακού DNA [6, 7].

Επιπρόσθετα, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να έχουν **γρήγορες μη γενωμικές επιδράσεις** ύστερα από τη σύνδεση του προσδέτη, με τα αποτελέσματα να εμφανίζονται από μερικά δευτερόλεπτα ως λεπτά, και να μην χρειάζονται αλλαγές στην έκφραση γονιδίων. Για παράδειγμα, τα GCs μπορούν να ενεργοποιήσουν την οδό PI3K/Akt λίγα λεπτά αργότερα από την χορήγηση τους με τρόπο εξαρτώμενο από τον GR. Ο GR αλληλοεπιδρά επίσης με το p65 και το IκBα στο κυτταρόπλασμα, μειώνοντας την είσοδο του p65 στον πυρήνα. Στον πυρήνα ο GR μπορεί ακόμα να αλληλοεπιδράσει και με τον NF-κB καταστέλλοντας τη δραστηριότητά του. Ομοίως ο GR μπορεί επίσης να αποτρέψει τη δραστηριότητα του AP-1 συνδεόμενος με την C-Jun N-τερματική κινάση (JNK) μέσω της LBD του, αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της JNK, αναστέλλοντας στη συνέχεια ανταγωνιστικά την ενεργή JNK στο AP-1. Τα GCs μπορούν επίσης να προκαλέσουν τη μετατόπιση του GR στα μιτοχόνδρια και να ενεργοποιήσουν αποπτωτικές οδούς ανεξάρτητες της γονιδιακής ρύθμισης [6, 7].



Εικόνα 6. Μονοπάτια σηματοδότησης του GR [7].

1.4 Υποδοχέας ενεργοποιούμενος από πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων ισομορφή α (PPARα)

Τα υπεροξεισώματα είναι υποκυτταρικά οργάνιδια τα οποία περιέχουν ένζυμα που επηρεάζουν πολλές μεταβολικές διεργασίες των λιπαρών οξέων. Η δράση των υπεροξεισωμάτων ελέγχεται από τους υποδοχείς του πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs), οι οποίοι ανήκουν στην υπεροικογένεια των NCRs, και λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων. Υπάρχουν τρεις γνωστές ισομορφές, ο PPARα, PPARβ/δ και ο PPARγ, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια NR1C1, NR1C2 και NR1C3 αντίστοιχα. Οι δύο τελευταίες ισομορφές σε σύγκριση με τον PPARα, δεν προκαλούν ανάπτυξη υπεροξεισωμάτων στα ποντίκια μετά την ενεργοποίησή τους. Μπορούν να ενεργοποιηθούν από ενδογενείς προσδέτες όπως μεταβολίτες λιπαρών οξέων και συνθετικές ενώσεις όπως φαινοφιβράτες και αντιδιαβητικά φάρμακα θειαζολιδινεδιόνης [9, 10]. Ο PPARα ρυθμίζει την γλυκονεογένεση, τον μεταβολισμό λιποπρωτεϊνών και χολικών οξέων, την παραγωγή τριγλυκεριδίων και την οξείδωση λιπαρών οξέων μέσω μιτοχονδριακών, υπεροξεισωματικών και μικροσωμικών οδών. Σε ιστούς με υψηλά ποσοστά οξείδωσης λιπαρών οξέων, όπως η καρδιά, το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες, είναι

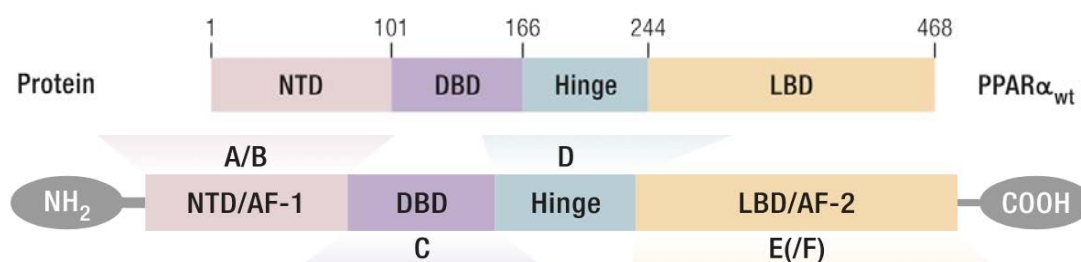
κρίσιμος στη δέσμευση, ενεργοποίηση, επιμήκυνση, και αποκορεσμό των λιπαρών οξέων, διατηρώντας την ομοιόσταση τους. Ακόμα, μπορεί να αναστείλει την έκφραση ορισμένων γονιδίων επηρεάζοντας αρνητικά προ-φλεγμονώδεις μεταγραφικούς παράγοντες, όπως τον NF-κB, AP-1 και STAT. Μετά τον ετεροδιμερισμό με τον υποδοχέα ρετινοειδών (RXR), το σύμπλοκο PPARα-RXR επηρεάζει πολλές πτυχές της φυσιολογικής και παθολογικής κυτταρικής φυσιολογίας, όπως η ομοιόσταση της γλυκόζης, ο μεταβολισμός λιπαρών οξέων, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η φλεγμονή και ο καρκίνος [9, 10].

1.4.1 Δομή του PPARα

Ο PPARα κατόπιν ενεργοποίησης παρουσιάζει πυρηνική μετατόπιση, η οποία ενισχύεται από τη σύνδεση προσδέτη και Ca^{2+} σηματοδότηση. Έτσι οι κυτταρικές διεργασίες του μπορούν να επηρεαστούν από εσωτερικά ή εξωτερικά σήματα. Το γονίδιο του PPARα βρίσκεται στον άνθρωπο και τον ποντικό στα χρωμοσώματα 22 και 15 αντίστοιχα, αποτελείται από 8 εξόνια, κωδικοποιώντας πρωτεΐνη 468 αμινοξέων που έχει ομολογία 91%, μοριακό βάρος 55 kDa, και αποτελείται από 4 λειτουργικές περιοχές [9].

Η **περιοχή A/B** trans-ενεργοποίησης προσδέτη αποτελεί το αμινοτελικό άκρο (**NTD**), έχει χαμηλή μεταγραφική δραστηριότητα και περιέχει την μεταγραφική περιοχή ενεργοποίησης 1 (AF-1) η οποία είναι ικανή να λειτουργεί χωρίς προσδέτη. Για μεταγραφή μέσω AF-1 σε αυτή την περιοχή, είναι απαραίτητος ο σχηματισμός δευτερογενών δομών. Διαγραφή της περιοχής οδηγεί σε τροποποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του PPARα με τρόπο εξαρτώμενο από το γονίδιο. Ακόμα, οι **μέτα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs)** ενισχύουν την λειτουργικότητα του PPARα, μέσω φωσφορυλίωσης της A/B περιοχής, οδηγώντας σε ενίσχυση ή καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητάς του. Για παράδειγμα, ως απόκριση σε μιτογόνα ερεθίσματα, όπως η υψηλή συγκέντρωση ινσουλίνης, η μεταγραφική δραστηριότητα αυξάνεται με τη μεσολάβηση της MAPK φωσφορυλίωσης της σερίνης 12 και 21. Αντιθέτως, ο PPARα είναι πιο ουβικουιτινωμένος και ανοικοδομείται όταν η σερίνη 73 φωσφορυλιώνεται από την κινάση συνθάσης

γλυκογόνου 3 (GSK3). Τέλος, αυτή η περιοχή ίσως διαθέτει σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS). Η **περιοχή C** ή περιοχή σύνδεσης στο DNA (**DBD**), περιέχει 2 πολύ καλά συντηρημένους δακτυλίους ψευδαργύρου, που είναι υπεύθυνοι για τη φυσική αλληλεπίδραση με το DNA. Το ετεροδιμερές PPARα-RXR, έχοντας ενεργοποιηθεί από σύνδεση προσδέτη, συνδέεται μέσω των στοιχείων απόκρισης PPAR (PPREs) στο DNA. Σύνδεση προσδέτη και στους δυο υποδοχείς ταυτόχρονα οδηγεί σε συνεργατική δράση. Η **περιοχή εύκαμπτης άρθρωσης D** συνδέει τη DBD με την περιοχή σύνδεσης του προσδέτη E (LBD). Αυτή η περιοχή δεσμεύει πρωτεΐνες συν-καταστολείς όπως τον NCoR όταν ο υποδοχέας είναι στην ανενεργή του κατάσταση, και χρησιμεύει ως στόχος για PTMs, όπως η φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση C και η σουμοϋλίωση. Μετάλλαξη σε μια θέση φωσφορυλίωσης στην περιοχή άρθρωσης του PPARα, μπορεί να αναστείλει τον διμερισμό. Επίσης, η περιοχή μπορεί να εμποδίσει τη σύνδεση του PPARα στο DNA, ενεργώντας ως κατασταλτικός παράγοντας. Η περιοχή ίσως φέρει σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS). Η **περιοχή σύνδεσης προσδέτη E (LBD)**, δημιουργεί μια κοιλότητα σχήματος Υ, γνωστή ως θύλακας σύνδεσης προσδέτη (LBP), η οποία είναι πιο λιπόφιλη από άλλους PPARs, γεγονός που εξηγεί την υψηλότερη τάση του PPARα να δεσμεύει κορεσμένα λιπαρά οξέα. Επιπρόσθετα, η LBD περιέχει την μεταγραφική περιοχή ενεργοποίησης 2 (AF-2), η οποία μετά τη σύνδεση προσδέτη υφίσταται διαμορφωτικές αλλαγές που επιτρέπουν την αλληλεπίδραση της με διάφορους συν-ενεργοποιητές που φέρουν μοτίβα LXXLL (L= λευκίνη, X= οποιοδήποτε αμινοξύ), όπως την πρωτεΐνη δέσμευσης στοιχείου απόκρισης cAMP (CBP)/p300 και τον συνενεργοποιητή-1 του υποδοχέα στεροειδούς (SRC-1/NCoA-1). Οι AF-1 και AF-2, μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή σε συνεργασία, με αποτέλεσμα τη δυνατότερη μεταγραφή και συνεπώς έκφραση του PPARα [9].

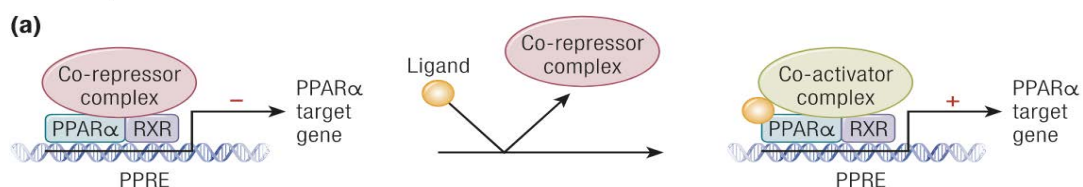


Εικόνα 7. Δομική απεικόνιση του PPARα [9].

1.4.2 Σηματοδοτικά μονοπάτια του PPARα

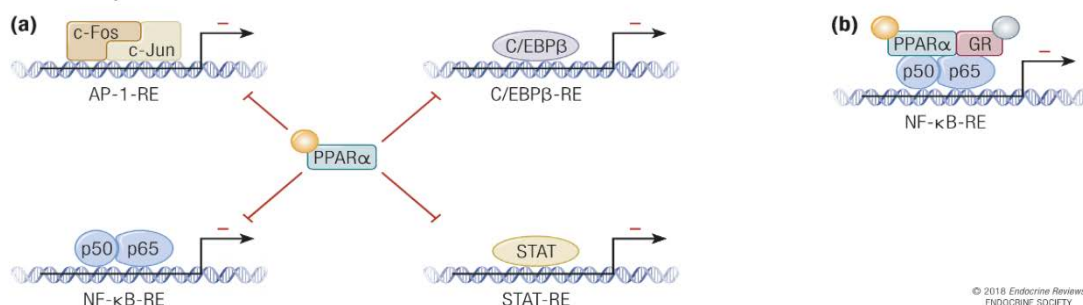
Τα μονοπάτια σηματοδότησης του PPARα μπορεί να είναι PPRE εξαρτώμενα ή όχι. Το **εξαρτώμενο από PPRES μονοπάτι σηματοδότησης** του PPARα γίνεται μέσω της σύνδεσης του με αυτά. Σε περίπτωση έλλειψης συγκεκριμένων προσδετών, το ετεροδιμερές PPARα/RXR συνδέεται στο PPRE στην περιοχή του προαγωγέα του γονιδίου στόχου και στρατολογεί συμπλέγματα συν-καταστολέων, διατηρώντας τα γονίδια στόχους του PPARα σε σιωπηλή κατάσταση (καταστολή ανεξάρτητη προσδέτη). Μόλις γίνει η σύνδεση προσδέτη, οι συν-καταστολείς απομακρύνονται και σύμπλοκα συν-ενεργοποιητών στρατολογούνται, και συνδέονται με το ετεροδιμερές PPARα/RXR, επάγοντας έτσι την έκφραση των γονιδίων στόχων. Στο **μη εξαρτώμενο από PPRES μονοπάτι σηματοδότησης**, ο PPARα αλληλοεπιδρά άμεσα με προ-φλεγμονώδεις μεταγραφικούς παράγοντες όπως τους NF-κΒ, AP-1 και STAT για να ρυθμίσει αρνητικά τους στόχους τους. Αυτό οδηγεί σε αντιφλεγμονώδεις αποκρίσεις οι οποίες είναι ανεξάρτητες της σύνδεσης με DNA. Επιπλέον, ταυτόχρονη ενεργοποίηση και φυσική αλληλεπίδραση του GR και του PPARα οδηγεί σε αυξημένη καταστολή της ενεργοποιούμενης από TNF IL-6 μεταγραφικής δραστηριότητας [9].

PPRE-dependent



Εικόνα 8. PPRE εξαρτώμενο μονοπάτι σηματοδότησης [9].

PPRE-independent



Εικόνα 9. PPRE ανεξάρτητο μονοπάτι σηματοδότησης [9].

1.4.3 Έκφραση του PPARα

Η γονιδιακή έκφραση του PPARα επηρεάζεται από φυσιολογικές μεταβλητές και είναι κρίσιμη στη λειτουργία του μεταβολισμού και της φλεγμονής. Μερικές από τις πιο χαρακτηριστικές μεταβλητές αποτελούν το άγχος, τα γλυκοκορτικοειδή (GCs), οι αυξητικές ορμόνες (GHs), η ινσουλίνη, η λεπτίνη και οι κίρκαδικοί ρυθμοί, οι οποίοι είναι σημαντικοί ρυθμιστές της έκφρασης του PPARα. Κατά τη διάρκεια αντιδράσεων στρες, τα επίπεδα του PPARα αυξάνονται. Η νηστεία αυξάνει την έκφραση του στο ήπαρ, βελτιώνοντας την β-οξειδωση λιπαρών οξέων και παρέχοντας ενέργεια σε άλλους ιστούς. Σε κατάσταση σίτισης, προάγει τη λιπογένεση, ιδιαίτερα στο ήπαρ, αυξάνοντας τη σύνθεση λιπαρών οξέων από διαιτητικούς υδατάνθρακες [9]. Η λεπτίνη, ορμόνη που παράγεται από λιποκύτταρα, ενισχύει την έκφραση του στο ήπαρ, στα μυϊκά κύτταρα και στα β-κύτταρα του παγκρέατος, αλλά όχι στον λιπώδη ιστό. Αυτή η επαγωγή μπορεί να συνδέεται με αλλαγές στη ροή των λιπαρών οξέων και την ενεργοποίηση της AMP πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK). Η αδιπονεκτίνη, μια αντιφλεγμονώδης αδιποκίνη, ενεργοποιεί τον συν-ενεργοποιητή του PPARα/γ PGC-1α, οδηγώντας τον PPARα σε αυξημένη δραστηριότητα. Αντίθετα, η GH και η ινσουλίνη μειώνουν την έκφραση του PPARα, τη μεταγραφική του δραστηριότητα και λειτουργία του. Παρατεταμένη έκθεση σε ινσουλίνη, μειώνει τα επίπεδα του PPARα μέσω φωσφορυλίωσης του στην περιοχή AF-1.

Η έκφραση του PPARα στα ποντίκια έχει κίρκαδικό μοτίβο, αυξάνεται δηλαδή κατά τη διάρκεια της ημέρας ταιριάζοντας με τους χρόνους νηστείας των νυκτόβιων αυτών ζώων. Στα ηπατοκύτταρα αρουαίου, ο PPARα ελέγχεται μεταγραφικά από τα γλυκοκορτικοειδή, μέσω του GR. Εκεί η έκφραση του ακολουθεί έναν ημερήσιο κύκλο παρόμοιο με την κορτικοστερόνη, και αυξάνεται κατά τη διάρκεια του στρες. Τα GCs επηρεάζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες BMAL1 και CLOCK, και πρωτεΐνες όπως την PARbZlp, τα οποία έχουν αντίκτυπο στην ημερήσια κίρκαδική ρύθμιση [9].

Υψηλά επίπεδα γλυκόζης επηρεάζουν την αλληλεπίδραση του PPARα με συν-ενεργοποιητές, επηρεάζοντας διάφορες λειτουργίες διαφορετικών ιστών. Η γλυκόζη αυξάνει την έκφραση του PPARα στα μακροφάγα και ενισχύει τη σύνδεση του με το PPRE του προαγωγέα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης

(LPL). Ωστόσο, μειώνει την έκφρασή του στα β-κύτταρα του παγκρέατος, οδηγώντας σε μειωμένη οξείδωση των λιπαρών οξέων και αυξημένη σύνθεση φωσφολιπιδίων και τριγλυκεριδίων, η οποία είναι υπαίτια για την γλυκολιποτοξικότητα των β-κυττάρων. Φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο TNF-α, IL-1β και IL-6 μειώνουν επίσης την έκφραση του PPARα. Η αλληλεπίδραση με άλλους NCRs, όπως ο υποδοχέας βιταμίνης D, και ο ανταγωνισμός με τον συνεργάτη σύνδεσης RXR, μπορεί να επηρεάσουν την ενεργοποίηση του PPARα. Ο κύκλος εργασιών του ρυθμίζεται από την ειδικότητα και τη διαθεσιμότητα του προσδέτη.

Τέλος, η έκφραση του PPARα μειώνεται με την ηλικία, όπως φαίνεται από χαμηλότερα επίπεδα mRNA σε ηλικιωμένα ποντίκια και συσχετίζεται με ταυτόχρονη αύξηση φλεγμονών και μείωση οξείδωσης λιπαρών οξέων. Η ατομική ποικιλομορφία στην έκφραση του PPARα δείχνει ότι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν σημαντικά τον έλεγχό του [9].

1.5 Σκελετικοί μύες

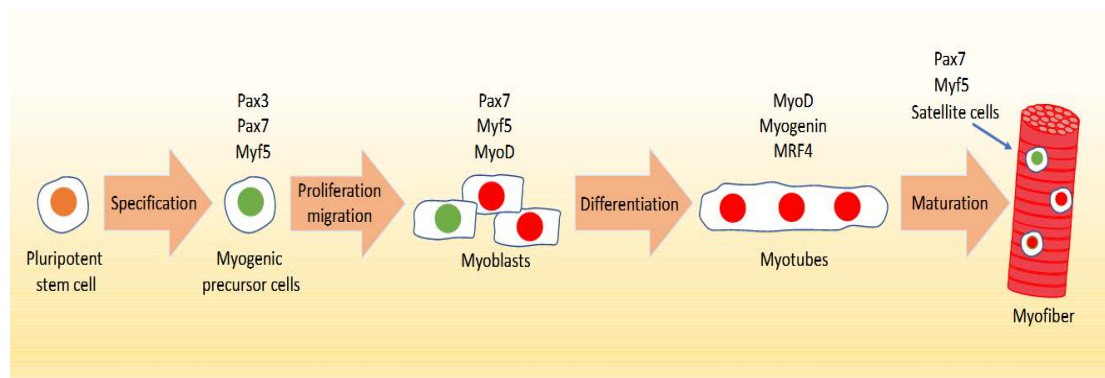
Οι σκελετικοί μύες αποτελούν τον μεγαλύτερο ιστό στους ανθρώπους με ποσοστό 40%, έχουν τεράστια αναγεννητική ικανότητα και είναι απαραίτητοι για τη φυσιολογική κίνηση του σώματος, τον μεταβολισμό του λίπους και των υδατανθράκων. Αποτελούνται από πολλούς τύπους κυττάρων αλλά το κύριο δομικό και λειτουργικό συστατικό τους είναι τα μονοπύρηνα βλαστοκύτταρα, τα οποία ονομάζονται δορυφορικά κύτταρα. Υπάρχουν 3 τύποι μυϊκών ινών, ο τύπος I (αργά οξειδωτικοί), ο τύπος IIA (ταχέως οξειδωτικοί) και ο τύπος IIX (ταχέως γλυκολυτικοί). Με το πέρασ της ηλικίας, οι σκελετικοί μύες τείνουν να συρρικνώνονται και να αλλάζουν μυϊκό τύπο, ιδιαίτερα οι τύπου IIA. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη αντοχή στην άσκηση λόγω μειωμένης μιτοχονδριακής ποσότητας και ενζύμων, και την εμφάνιση αρνητικών συνεπειών όπως η παχυσαρκία και τα μεταβολικά σύνδρομα. Η σαρκοπενία και η αδυναμία έχουν συσχετιστεί με τη μείωση ορμονικών επιπέδων και την μεγάλη ηλικία [11, 12].

1.6 Μυογένεση και οικογένεια Μυογενικών Ρυθμιστικών Παραγόντων (MRFs)

Μυογένεση ονομάζεται η πολυ-σταδιακή διαδικασία κατά την οποία αδιαφοροποίητα κύτταρα εξελίσσονται σε μυϊκά παράγοντας μυϊκό ιστό, την οποία ελέγχουν τα μέλη της οικογένειας των Μυογενικών Ρυθμιστικών Παραγόντων (MRFs). Στην πρώιμη ανάπτυξη, ένα από τα τρία στρώματα γεννητικών κυττάρων του εμβρύου, το «μεσόδερμα» ή το μεσαίο στρώμα, διαχωρίζεται σε σωμίτες. Με τη σειρά του, το ανώτερο στρώμα κάθε σωμίτη διαιρείται σε μυοτόμο και αρχίζει να απελευθερώνει μυϊκά προγονικά κύτταρα (MPCs). Στην αρχή της εμβρυϊκής μυογένεσης, τα MPC στο μυοτόμο αρχίζουν να εκφράζουν Pax3/7, γεννώντας μυϊκά πρόδρομα κύτταρα γνωστά ως «εμβρυονικοί μυοβλάστες». Οι μυοβλάστες στη συνέχεια αναπτύσσονται σε μυοκύτταρα, τα οποία αρχίζουν να συντήκονται ως απόκριση στον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (FGF) και παράγουν πρωτογενείς μυοσωλήνες, οι οποίοι χρησιμεύουν ως πλατφόρμα για τη στρατολόγηση περισσότερων εμβρυϊκών μυοβλαστών. Ως αποτέλεσμα, δημιουργούνται περισσότεροι μυοσωλήνες. Στο τέλος της εμβρυϊκής μυογένεσης, οι μυϊκές ίνες περικλείονται από το βασικό έλασμα. Τα Pax3/7 θετικά προγονικά μυϊκά κύτταρα (MPCs) μεταναστεύουν κάτω από το έλασμα προς την πλάγια πλευρά της ώριμης μυϊκής ίνας και διαφοροποιούνται σε δορυφορικά βλαστοκύτταρα (Satellite Stem Cells, SatSCs) στον μεταγεννητικό σκελετικό μυ. Στη συνέχεια, τα SatSCs αναλαμβάνουν την ηγεσία στην αναγέννηση των μυών και στην παραγωγή μυϊκών ινών, παραλληλίζοντας την επανενεργοποίηση των Myf5 και Pax3/7 κατά τη μεταγεννητική περίοδο. Σαν αποτέλεσμα, σχηματίζονται SatSCs μεταξύ του βασικού ελάσματος (βασική μεμβράνη) και της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ τα κύτταρα βρίσκονται σε ηρεμία. Τα SatSCs ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια τραυματισμού για την αποκατάσταση των τραυματισμένων μυϊκών ινών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση μιας σειράς βιομορίων, που ενισχύουν την ανάπτυξη μυοβλαστών σε πολυπύρηνες μυϊκές ίνες [10, 11].

Τα μέλη της οικογένειας MRF (Myf5, MyoD, myogenin και MRF4), είναι μεταγραφικοί παράγοντες που διέπουν τα διαφορετικά στάδια της μυογένεσης ελέγχοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων κατά την εμβρυϊκή και μεταγεννητική ανάπτυξη. Αν και τα MRF γονίδια

εκφράζονται αποκλειστικά σε μυογονικά κύτταρα, υπάρχουν διαφορές στις πρωτεϊνικές περιοχές και τα χρονικά στάδια έκφρασης τους στη μυογένεση, υποδεικνύοντας διαφορετικούς ρόλους στη διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων [13].



Εικόνα 10. Διαδικασία της μυογένεσης [10].

1.7 Δομή της MyoD

Η MyoD είναι απαραίτητος μεταγραφικός παράγοντας για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των σκελετικών μυών. Καθορίζει τη μοίρα των πρόδρομων κυττάρων, δεσμεύοντάς τα στη μυογονική γραμμή και μετατρέποντάς τα σε μυοβλάστες. Συνδέεται με ρυθμιστικές αλληλουχίες γονιδίων ειδικών για τους μύες μέσω της αναγνώρισης του μοτίβου E-box (CANNTG), ρυθμίζοντας έτσι την θετική τους έκφραση, και συνεργάζεται με άλλα MRFs για να προκαλέσουν μυϊκή ανάπτυξη. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας MRF έχουν παρόμοια δομή με κάποιες μικρές διαφορές [13].

Η πρωτεΐνη MyoD έχει μοριακό βάρος 45 kDa και αποτελείται από μια λιγότερο διατηρημένη **αμινοτελική περιοχή (NH2)**, μια άκρως συντηρημένη **βασική περιοχή Helix-Loop-Helix (bHLH)** και μια **C-τερματική περιοχή**. Η NH2 περιλαμβάνει μια περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης, την C/H, η οποία είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή των μυϊκών γονιδίων. Η περιοχή bHLH είναι απαραίτητη για τη δραστηριότητα της MyoD εφόσον συνδέεται με το DNA μέσω των μοτίβων E-box και διμερίζεται με άλλες πρωτεΐνες bHLH. Αυτή η περιοχή είναι πολύ καλά διατηρημένη σε όλα τα MRF και είναι κρίσιμη για την ικανότητα της MyoD να προάγει μυογένεση. Η MyoD απαιτεί δύο αμινοξέα από τη βασική

περιοχή, την αλανίνη και τη θρεονίνη (A, T), γνωστά ως μυογονικός κώδικας, για να ενεργοποιήσει το πρόγραμμα μεταγραφής των μυών, και χάνει το μυογονικό δυναμικό της όταν αυτά αλλοιωθούν. Στο καρβοξυτελικό άκρο, βρίσκεται η C-τερματική περιοχή μέρος της οποίας είναι η περιοχή Έλικά III, απαραίτητη για την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών, και είναι ειδική της MyoD παρέχοντας ισχυρότερες δυνατότητες διαφοροποίησης των μυών από άλλα MRF [13].



Εικόνα 11. Δομική απεικόνιση της MyoD [13].

1.7.1 Έκφραση της MyoD στους σκελετικούς μύες

Η φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης επάγει ενεργοποίηση της ρύθμισης μέσω MyoD. Κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, εκφράζεται σε συγκεκριμένες θέσεις στους σωμίτες και είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των σκελετικών μυών. Η έκφρασή της ρυθμίζεται μέσω μορίων σηματοδότησης που παράγονται από περιβάλλοντες ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του νευρικού σωλήνα. Η δραστηριότητά της ελέγχεται από βασικές οδούς σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των Sonic Hedgehog (Shh), των πρωτεϊνών Wnt, των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών (BMPs) και του υποδοχέα Notch. Η σηματοδότηση Shh διεγείρει τις MyoD και Myf5, ενώ η σηματοδότηση Wnt ενεργοποιεί αυτά τα γονίδια τόσο μέσω των κανονικών συμπλεγμάτων β-κατενίνης/Tcf όσο και μέσω ανεξάρτητων μη κανονικών οδών. Αντίθετα, τα BMPs και η σηματοδότηση Notch διατηρούν τα προγονικά κύτταρα σε αδιαφοροποίητη κατάσταση και αναστέλλουν την παραγωγή MRF. Η MyoD συντονίζει την έκφραση μυϊκών γονιδίων αλληλοεπιδρώντας με ποικιλία συμπαραγόντων και μεταγραφικών παραγόντων, όπως c-Jun, Jdp2, Meis και Runx1. Αλληλοεπιδρά επίσης με τα Pax3, Pax7 και FoxO3 σε δορυφορικά κύτταρα και στους πολλαπλασιαζόμενους μυοβλάστες για ρύθμιση της μυϊκής ανάπτυξης. Επίσης, είναι ικανή να πυροδοτήσει μυογένεση σε ποικιλία μη μυϊκών κυττάρων υπό καλλιέργεια και ενεργοποιεί τον παράγοντα μυοκυτταρικής ενίσχυσης 2

(MEF2), ο οποίος ρυθμίζει μυϊκά γονίδια συνδυαζόμενος με άλλα MRFs [13, 14].

Επιπλέον, η MyoD ενεργοποιεί μια μεταγραφική οδό αλληλοεπιδρώντας με ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και αναστέλλοντας τη σηματοδότηση κυτοκίνης, προκαλώντας διακοπή του κυτταρικού κύκλου, η οποία είναι απαραίτητη για την αλλαγή από τον πολλαπλασιασμό στη διαφοροποίηση. Κατά τη διαφοροποίηση, διεγείρει την παραγωγή μυογενίνης (myogenin), ώστε να γίνει η διαφοροποίηση των μυοβλαστών σε μυοσωλήνες, ενώ παράλληλα μειώνει την έκφραση Myf5, η οποία είναι υπεύθυνη για τον πολλαπλασιασμό τους. Ακόμα, η MyoD συμμετέχει στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, η οποία είναι απαραίτητη για τον έλεγχο των γονιδίων. Ως μεταγραφικός παράγοντας, μπορεί να φτάσει σε γονίδια εντός περιοριστικών ρυθμίσεων χρωματίνης και να ξεκινήσει αναδιαμόρφωση, για να βοηθήσει την ανάπτυξη μυών, αλληλοεπιδρώντας με τους παράγοντες Pbx/Meis μέσω της Έλικας III, οι οποίοι βρίσκονται σε προαγωγείς ανενεργών γονιδίων-στόχων της. Η ακετυλίωση της MyoD και των πλευρικών ιστονών της, που προκαλείται από σύμπλοκα ακετυλοτρανσφεράσης ιστόνης (HAT) όπως το p300, στρατολογεί σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης SWI/SNF, τα οποία ανοίγουν θέσεις σύνδεσης DNA για τα MRF και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως το Mef2. Αυτός ο μηχανισμός προσελκύει επίσης την RNA πολυμεράση II για μεταγραφή και τη διατηρεί σε κατάσταση ετοιμότητας για επακόλουθη ενεργοποίηση. Στους ώριμους μύες, η MyoD απαιτείται για ενεργοποίηση δορυφορικών κυττάρων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αναγέννηση των μυών και την υπερτροφία μετά από βλάβη. Όταν ο μυς τραυματίζεται, αυτά τα δορυφορικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και εξελίσσονται σε μυοβλάστες, τα οποία βοηθούν στην αποκατάσταση και ανάπτυξη των μυών [13, 15, 16].

1.8 Τα οιστρογόνα στους σκελετικούς μύες

Τα οιστρογόνα φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της μυϊκής μάζας, αλλά και στη διατήρηση της ομοιόστασης της. Μέσω της δράσης των υποδοχέων τους στα δορυφορικά κύτταρα, αναγεννούν τους μύες, συμβάλλοντας στην πρόληψη περισσότερων μέτα-τραυματισμών. Ακόμα,

προάγουν την αναγέννηση των μυών και μειώνουν τις βλάβες που προκαλούνται μετά την άσκηση αναστέλλοντας τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ποντίκια με ωοθηκεκτομή (OVX), οιστρογόνα που χορηγήθηκαν πριν από άσκηση, οδήγησαν σε υψηλότερους αριθμούς και δραστηριότητα δορυφορικών κυττάρων. Ακόμα, ποντίκια OVX έδειξαν μείωση στο ποσοστό ατροφίας που είχε προκληθεί από αδράνεια μετά από πρόσληψη οιστρογόνων, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε στα ποντίκια μάρτυρες, τα οποία παρουσίαζαν μειωμένη παραγωγή δύναμης και μειωμένη μυϊκή αναγέννηση. Ορμονοθεραπεία (HRT) με οιστρογόνα έδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα, ενισχύοντας την ενζυματική δραστηριότητα των LPL, CPT1 και της βραχείας αλυσίδας β-υδροξυακυλο-CoA αφυδρογονάσης (β-HAD) τόσο σε ανθρώπους και ζώα, υποδηλώνοντας τροποποίηση μεταβολικών οδών. Επιπρόσθετα, ζωικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η ηλικία και το φύλο μπορεί να ρυθμίζουν τις επιδράσεις των οιστρογόνων στους σκελετικούς μύες [4, 5].

1.9 Γλυκοκορτικοειδή στους σκελετικούς μύες

Οι σκελετικοί μύες είναι σημαντικός στόχος των GCs, όπου ρυθμίζουν πρωτίστως τον μεταβολισμό των πρωτεϊνών και της γλυκόζης. Κάτω από στρεσογόνες συνθήκες, όπως η νηστεία και η πείνα, τα κυκλοφορούντα GCs αυξάνονται, μειώνοντας τη σύνθεση πρωτεϊνών και αυξάνοντας την πρωτεόλυση για την παραγωγή αμινοξέων ως πρόδρομο για την ηπατική γλυκονεογένεση, με τη γλυκόζη που παράγεται να λειτουργεί ως καύσιμο για τον εγκέφαλο. Η χρόνια ή υπερβολική έκθεση σε GCs προκαλεί ατροφία και αδυναμία. Τα GCs διατηρούν επίσης τη γλυκόζη του πλάσματος αναστέλλοντας την πρόσληψη και χρήση της στους σκελετικούς μύες και επιτρέπουν την επαγόμενη από επινεφρίνη γλυκογονόλυση. Αυτός ο προσαρμοστικός μηχανισμός διατηρεί αρκετή γλυκόζη σε κυκλοφορία για να τροφοδοτήσει τον εγκέφαλο κατά τη διάρκεια στρες. Η μείωση του επιπέδου των διαθέσιμων βιοδραστικών GCs έχει αποδειχθεί πως βελτιώνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη σε ζωικά μοντέλα [8].

Τα GCs δρουν ανταγωνιστικά στις επιδράσεις της ινσουλίνης μέσω της ανασταλτικής τους δράσης στην απορρόφηση, τη χρήση και τη σύνθεση

γλυκόζης ενώ προάγουν τη διάσπαση του γλυκογόνου. Η μείωση των επιπέδων GCs με επινεφριδεκτομή ή αναστολή της 11β-HSD1 βελτιώνει την διεγειρόμενη από την ινσουλίνη κάθαρση γλυκόζης στους σκελετικούς μυς σε παχύσαρκους και διαβητικούς αρουραίους. Η αντίσταση στην ινσουλίνη συσχετίζεται με αυξημένη έκφραση του GR σε διαβητικούς ασθενείς και τα επίπεδα του επιστρέφουν στο φυσιολογικό ως απόκριση στη θεραπεία ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο τα GCs επηρεάζουν τον μεταβολισμό της γλυκόζης των σκελετικών μυών χρήζει περαιτέρω διερεύνησης [8].

Η θεραπεία με GCs προκαλεί καταβολική απόκριση στους σκελετικούς μύες, οδηγώντας σε μείωση του μεγέθους τους. Αυτός είναι ένας κοινός φαινότυπος σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο διαβήτης, η μεταβολική οξέωση και η σήψη. Ο φαινότυπος μυϊκής ατροφίας προκαλείται από αυτόνομες επιδράσεις του GR τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η θεραπεία με συνθετικά GCs όπως η δεξαμεθαζόνη (DEX) έχει μειώσει σημαντικά τις κυτταρικές διαμέτρους σε μυοσωλήνες C2C12 ποντικού και L6 αρουαίου. Η μυϊκή ατροφία που προκάλεσε η DEX, καταργήθηκε πλήρως σε ποντίκια με GR νοκ-άουτ (MGRKO). Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν τον βασικό ρόλο του GR και των γονιδίων-στόχων του, στον ρυθμιζόμενο με γλυκοκορτικοειδή μεταβολισμό πρωτεϊνών. Η αναγνώριση των βασικών αιτιολογικών γονιδίων-στόχων του GR που είναι υπεύθυνα για τη μυϊκή ατροφία, είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη επιλεκτικών ρυθμιστών του, διατηρώντας τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του αλλά με λιγότερο αρνητικό αντίκτυπο, κάτι που είναι σημαντικό στη θεραπεία ασθενών με φλεγμονώδεις νόσους που στοχεύουν τους μύες ή τους πνεύμονες [8].

1.10 PPARα στους σκελετικούς μύες

Οι τύποι μυϊκών ινών και η άσκηση αντοχής συνδέονται στενά με την έκφραση του PPARα, κυρίως στις μυϊκές ίνες Τύπου I. Αρουραίοι που έλαβαν θεραπεία με τον αγωνιστή του PPARα φαινοφιβράτη, εμφάνισαν σημαντική τροποποίηση 26 γονιδίων στον μυ του πέλματος (Τύπου I) αλλά όχι στον τετρακέφαλο μηριαίο μυ (Τύπου IIA), υποδεικνύοντας ότι η ενεργοποίηση του

PPARα είναι ειδική προς τον τύπο της μυϊκής ίνας. Ο PPARα διεγείρεται νωρίς στη διαδικασία διαφοροποίησης μυϊκών κυττάρων που αναπτύσσονται *in vitro*.

Στους σκελετικούς μύες, η δραστηριότητα του PPARα είναι απαραίτητη για τον μεταβολισμό λιπιδίων και υδατανθράκων. Η συσσώρευση τριακυλογλυκερόλης (TAG) σε διαφοροποιημένους ανθρώπινους μυοσωλήνες μειώνεται και η οξείδωση των λιπιδίων διεγείρεται *in vitro* από ισχυρούς αγωνιστές όπως ο GW7647. Επιπλέον, ο GW7647 αυξάνει την έκφραση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης κινάσης (PDK) 4, η οποία φωσφορυλιώνει το σύμπλοκο της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης για να αποτρέψει την οξείδωση των υδατανθράκων. Ο αγωνιστής του PPARα WY14643, ο διαβήτης που προκαλείται από στρεπτοζοτοκίνη ή η ασιτία, είναι καταστάσεις που αυξάνουν τα επίπεδα λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας, ενεργοποιούν τον PPARα και διεγείρουν το PDK4 στον γαστροκνήμιο μυ αρουραίου [17].

Τα γονίδια που εμπλέκονται στην εισαγωγή και δέσμευση λιπαρών οξέων, στη σύνθεση TAG και στη β-οξείδωση εκφράζονται συχνότερα σε διαγονιδιακά ποντίκια με σκελετικούς μύες που υπερεκφράζουν PPARα, με τα γονίδια που εμπλέκονται στη χρήση της γλυκόζης να ρυθμίζονται αρνητικά. Παρά το γεγονός ότι προστατεύονται από την παχυσαρκία που προκαλείται από τη δίαιτα, αυτά τα ζώα παρουσιάζουν μειωμένη βασική και διεγειρόμενη από την ινσουλίνη απορρόφηση γλυκόζης στους σκελετικούς μύες και αποκτούν δυσανεξία στη γλυκόζη. Παρά την αύξηση βάρους που προκαλείται από υψηλά λιπαρά και τα αυξημένα επίπεδα TAG στους μύες, ζώα PPARα-null παρουσιάζουν καλύτερη ανοχή στη γλυκόζη, επιταχυνόμενη απομάκρυνση της που διεγείρεται από την ινσουλίνη, και αυξημένη πρόσληψη της στους σκελετικούς μύες. Επιπλέον, η οξείδωση των λιπαρών οξέων στους σκελετικούς μύες είναι σημαντικά χαμηλότερη σε ποντίκια PPARα-null που λιμοκτονούν από ό,τι σε ποντίκια άγριου τύπου (WT), ωστόσο σε ζώα που τρέφονται, η οξείδωση λιπαρών οξέων σε PPARα-null και WT ποντίκια ήταν παρόμοια. Η ενεργοποίηση του PPARα έχει συνδεθεί σε σπάνιες περιπτώσεις με μυϊκή διάσπαση (ραβδομύολυση) και αδυναμία (μυοπάθεια) τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα.

Λόγω της αυξημένης υπεροξειδωμικής και μιτοχονδριακής β-οξείδωσης και του οξειδωτικού στρες, οι ίνες τύπου I είναι ιδιαίτερα ευάλωτες. Ο PPARα

φαίνεται επίσης να προστατεύει από βλάβη της ισχαιμίας στους σκελετικούς μυς, την καρδιά και το ήπαρ [17].

1.11 Κυτταρική διαφοροποίηση

Κυτταρική διαφοροποίηση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία βλαστοκύτταρα μετατρέπονται σε πιο εξειδικευμένες κυτταρικές σειρές και αποκτούν νέες λειτουργίες μέσω της έκφρασης γονιδίων και πρωτεϊνών. Η διαφοροποίηση συμβαίνει ως απόκριση σε κάποιο σήμα όπως αλλαγή στο θρεπτικό μέσο, αλλαγή του κυτταρικού περιβάλλοντος, ενεργοποίηση ή καταστολή κάποιου μορίου σηματοδότησης ή αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου. Ορισμένοι τύποι βλαστοκυττάρων μπορούν να διαφοροποιηθούν πιο εύκολα σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές. Τα κύτταρα C2C12 είναι μια αθάνατη κυτταρική σειρά μυοβλαστών που προέρχεται από δορυφορικά κύτταρα ενηλίκου ποντικού. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν μέσω στέρησης θρεπτικού μέσου σε μυοβλάστες, και παρέχουν ένα πολύ χρήσιμο πειραματικό μοντέλο για τη διερεύνηση της μυογένεσης, της διαφοροποίησης και της μυϊκής ανάπτυξης [12, 18].

1.11.1 Οιστρογόνα στη διαφοροποίηση των σκελετικών μυών

Η επίδραση της 17β-οιστραδιόλης (E2) στη διαφοροποίηση των σκελετικών μυών σε μυοβλάστες αρουραίων L6 και μυοβλάστες ποντικών C2C12 έχουν μελετηθεί [19]. Η έρευνα επικεντρώνεται στη συμμετοχή των ERα και ERβ και των σχετικών οδών σηματοδότησης. Η E2 προκαλεί μετατόπιση της GLUT-4 (πρωτεΐνη μεταφοράς γλυκόζης 4) στην κυτταρική μεμβράνη των μυοβλαστών L6 εντός 15 λεπτών. Ύστερα από 6 ώρες, η έκφραση της μυογενίνης αυξάνεται και 24 ώρες αργότερα η έκφραση της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MHC) αυξάνεται επίσης. Αυτές οι επιδράσεις είναι δόσο-εξαρτώμενες και κορυφώνονται μεταξύ 1 και 10 nM. Οι μυοβλάστες L6 εμφανίζουν διαφοροποίηση, βελτιωμένη ευθυγράμμιση και σύντηξη σε πολυπύρηνους μυοσωλήνες μετά από 7 ημέρες χορήγησης με E2. Ο αναστολέας ER ICI-182,780 εμποδίζει τις λειτουργίες της E2, επιβεβαιώνοντας

τη δράση της μέσω μηχανισμών που συντονίζονται από τους ERs. Οι μυοβλάστες L6, εκφράζουν και τον ERβ και τον ERα, με τον τελευταίο να είναι η πιο άφθονη ισομορφή. Η E2 ξεκινά την διαδικασία της διαφοροποίησης ενεργοποιώντας τα μονοπάτια σηματοδότησης Akt και p38, τα οποία είναι απαραίτητα για τη μετατόπιση της GLUT-4 και τη παραγωγή μυογενίνης ενώ η αναστολή τους μειώνει τα επίπεδα διαφοροποίησης. Ο ERβ-εκλεκτικός αγωνιστής DPN (διαρυλοπροπιονιτρίλιο) δε μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση της Akt, αλλά ο ERα-εκλεκτικός αγωνιστής PPT (προπυλοπυραζολική τριόλη) μπορεί και αναπαράγει τα αποτελέσματα της E2 σε δείκτες διαφοροποίησης. Η διαφοροποίηση που προκαλείται από την E2 μειώνεται μετά από καταστροφή του ERα. Τα αποτελέσματα του πειράματος επιβεβαιώθηκαν όταν η E2 αύξησε τη μετατόπιση GLUT-4, τα επίπεδα μυογενίνης και της MHC στους C2C12 μυοβλάστες. Μέσω σηματοδότησης από τον ERα, η E2 συμβάλλει σημαντικά στην έναρξη ανάπτυξης των σκελετικών μυών, υποδεικνύοντας πιθανούς μηχανισμούς μέσω των οποίων τα οιστρογόνα μπορούν να επηρεάσουν τη φυσιολογία των μυών.

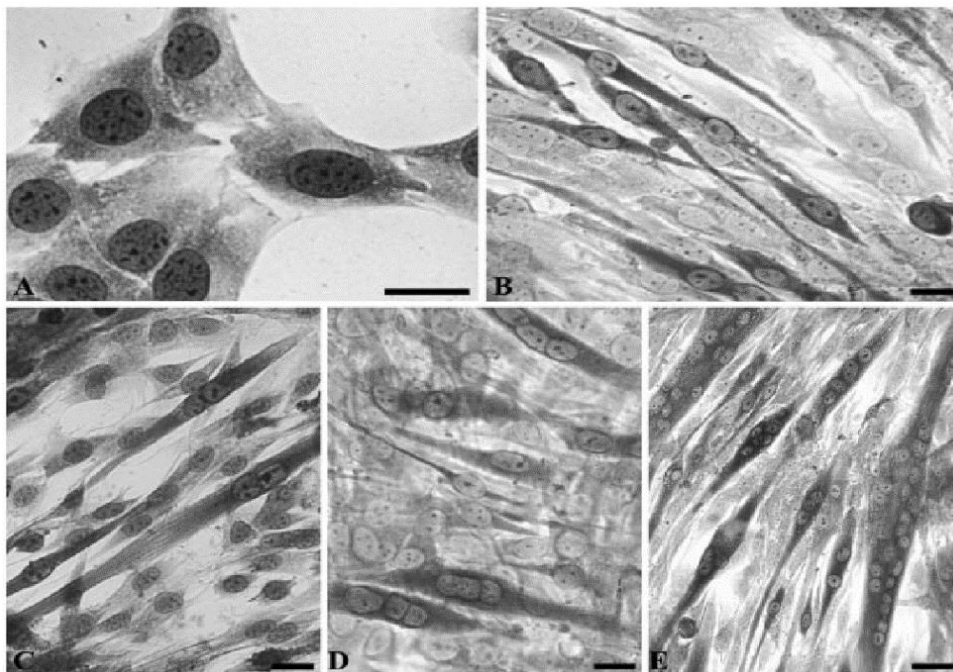
1.11.2 Γλυκοκορτικοειδή στη διαφοροποίηση των σκελετικών μυών

Βιβλιογραφία [20] υποστηρίζει ότι η δεξαμεθαζόνη (DEX), ένα δημοφιλές συνθετικό γλυκοκορτικοειδές, επηρεάζει τη διαδικασία διαφοροποίησης των κυττάρων C2C12. Η μελέτη αποκάλυψε ότι η επίδραση της DEX στη μυογένεση, ήταν είτε πριν είτε μετά την έναρξη της διαφοροποίησης μυοβλαστών. Η DEX προκάλεσε ατροφία σε διαφοροποιημένους C2C12 μυοβλάστες, η οποία χαρακτηρίστηκε από μειωμένες διαμέτρους μυοσωλήνων και αυξημένη έκφραση ατροφικών δεικτών όπως η ατρογίνη-1 και η μυοστατίνη. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε συμφωνία με παλαιότερη μελέτη [21]. Αντίθετα, η προσθήκη DEX σε μη διαφοροποιημένους μυοβλάστες επιτάχυνε τη διαδικασία διαφοροποίησης, αυξάνοντας τη διάμετρο των μυοσωλήνων και τα επίπεδα πρωτεΐνης MHC. Σημαντικός παράγοντας που ελήφθη υπόψη ήταν ο χρόνος προσθήκης της DEX, με τη χορήγηση 48 ωρών κατά το στάδιο του μυοβλάστη να βελτιώνει σημαντικά τη μυογονική διαφοροποίηση και τον δείκτη σύντηξης των μυοβλαστών.

1.11.3 MyoD στη διαφοροποίηση σκελετικών μυών

Αντικείμενο μελέτης τα τελευταία χρόνια αποτελεί ο μεταγραφικός παράγοντας MyoD, ο οποίος είναι σημαντικός δείκτης διαφοροποίησης, μαζί με άλλα MRFs, κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης στους C2C12 μυοβλάστες [15]. Μορφολογικά, οι αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες στο πρώτο τους στάδιο ορίζονται ως αυστηρά μονοπύρηντοι, επίπεδοι και διάσπαρτοι σε όλο το υπόστρωμα. Η πρωτεΐνη MyoD είναι παρούσα ακόμη και πριν από την έναρξη της διαφοροποίησης. Τα επίπεδα του mRNA της MyoD παραμένουν σταθερά, σύμφωνα με παλαιότερες έρευνες, και η πρωτεΐνη φαίνεται στους πυρήνες αυτών των κυττάρων. Μία ημέρα μετά τη στέρηση του θρεπτικού, οι μυοβλάστες αρχίζουν να επιμηκύνονται, να πυκνώνουν και να ευθυγραμμίζονται, όλα ενδεικτικά χαρακτηριστικά της διαφοροποίησης. Η έκφραση της MyoD αυξάνεται δραματικά, όπως και ο αριθμός των θετικών-MyoD κυττάρων. Ο ανοσοφθορισμός αποκαλύπτει ότι εντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό στον πυρήνα. Η ημέρα 2 σηματοδοτεί την έναρξη της σύντηξης μυοβλαστών, με αποτέλεσμα διπύρηντα κύτταρα με δείκτη σύντηξης 8%. Από τις ημέρες 3 έως 5, αρχίζουν να σχηματίζονται πολυπύρηντοι μυοσωλήνες, υποδεικνύοντας ότι αυτή είναι η ενδιάμεση φάση της διαφοροποίησης, με εκτιμώμενο δείκτη σύντηξης 35%. Οι μυοσωλήνες αναπτύσσονται καθώς προχωρά η διαδικασία σύντηξης, υποδηλώνοντας διαφοροποίηση τελικού σταδίου με δείκτη σύντηξης 60%. Τα επίπεδα της MyoD αρχίζουν να μειώνονται καθώς προχωρά η διαφοροποίηση και καθ' όλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης, παραμένει σταθερά στον πυρήνα. Η MyoD δεν παρατηρείται στο κυτταρόπλασμα, υποδηλώνοντας γρήγορη πυρηνική μεταφορά και αποικοδόμηση μετά τη σύνθεση. Η μικροσκοπία ηλεκτρονίων έδειξε ότι η MyoD είναι κυρίως παρόν σε τομείς χρωματίνης, περιοχές που συνδέονται με την ενεργή μεταγραφή, υποστηρίζοντας τη λειτουργία της στον μεταγραφικό έλεγχο. Αυτά τα ευρήματα συνάδουν με τη λειτουργία της ως κύριο ρυθμιστή στη διαφοροποίηση των μυών. Τα επίπεδα πρωτεΐνης της παρουσιάζουν ταχεία αύξηση στο πρώιμο στάδιο της διαφοροποίησης αλλά μείωση στο μεσαίο και τελικό στάδιο, σύμφωνα με ανασοαποτύπωση κατά Western.

Αντίθετα, τα επίπεδα mRNA της δεν δείχνουν καμία αλλαγή, υποδεικνύοντας ότι ρυθμίζεται μέτα-μεταφραστικά.



Εικόνα 12. Μορφολογική ανάλυση διαφοροποίησης σε κύτταρα C2C12. Α: Μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Β: Στάδιο αρχικής διαφοροποίησης (24 ώρες μετά από στέρηση θρεπτικού). Γ: Πρώιμα στάδια ένωσης μυοβλαστών. Δ: Μέσο στάδιο διαφοροποίησης – Εμφάνιση μυοσωλήνων (3-5 ημέρες). Ε: Τελικό στάδιο διαφοροποίησης – Πολυπύρρηνοι μυοσωλήνες (7-10 ημέρες) [15].

1.12 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Ο σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των πιθανών μεταβολών των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (GR), οιστρογόνων ισομορφής α (ER α), πολλαπλασιαστική υπεροξεισωμάτων ισομορφής α (PPAR α) και του δείκτη διαφοροποίησης MyoD1 κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης κυττάρων μυοβλαστών C2C12. Για την καλύτερη δυνατή αποσαφήνιση του ρόλου των υποδοχέων στη διαδικασία της διαφοροποίησης των κυττάρων C2C12 σε δύο συγκεκριμένα διαφορετικά χρονικά διαστήματα εξέλιξης της διαδικασίας, αυτό των 4 και 6 ημερών στοχευμένα, μελετήθηκαν οι πιθανές μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων σε συνδυασμό με την παρουσία και απουσία των στεροειδών ορμονών E2, DEX και DPN.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

2.1.1 Οργανολογία κυτταροκαλλιεργειών

- Επωαστήρας (Thermo Electron Corporation)
- Απαγωγός (Tel Star AV-30/70)
- Αυτόματος πιπεταδόρος (HTL Lab Solution)
- Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Newbauer)
- Ανάστροφο Μικροσκόπιο-(αντίθετης φάσης) (A. Kruss Optronic Germany)
- Υδατόλουτρο (Selecta)
- Φυγόκεντρος (Entrofriger-BLII/PS Selecta)

2.1.2 Οργανολογία εργαστηριακού χώρου

- Ζυγός (Kern EN)
- Ζυγός (Kern 440-47N)
- Πιπέτες - Air displacement pipettes όγκων 0,1-2 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l
- Θερμοκυκλοποιητής (KISKER)
- Quick spin (Nippon Genetics Europe GmbH)
- Sonicator (Hielscher Ultrasound Technologies, model UP400S)
- Vortex (Bio Vortex V1)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad mini-PROTEAN tetra cell)
- Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (transfer) (Biorad mini-trans Blot)
- Αναδευτήρας (Heidolph Rotamax)
- Φωτόμετρο (Spectronic 20 GENESYS TM)
- Σετ εμφάνισης μεμβρανών (W.B Kodak)

2.2 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- Φλάσκες ανάπτυξης κυτάρων επιφάνειας 25 cm^2 και 75 cm^2 (Sarstedt)

- Πιάτα ανάπτυξης κυττάρων 150x20 mm (Sarstedt)
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur (Kimble)
- Τετράγωνες καλυπτρίδες (Sigma)
- Αντικειμενοφόρες πλάκες (Sigma)
- Σιφώνια Serological Pipette 2, 5, 10 ml (Sarstedt)
- Πλαστικά σωληνάρια τύπου eppendorfs 1,5 ml (Sarstedt)
- Βαθμονομημένοι σωλήνες με καπάκι-falcons 15, 50ml (Sarstedt)
- Tips αυτόματων πιπετών (Sarstedt)
- Μεμβράνες νιτροκυταρίνης (Amersham Protran)
- Διηθητικά χαρτιά Whatman (Sigma)
- Φωτογραφικό φιλμ ανίχνευσης σήματος (Fuji)

2.3 ΧΗΜΙΚΑ

2.3.1 Αντιδραστήρια

- Ammonium persulfate, APS (Sigma)
- Bis acrylamide 40% w/v (Bio-rad)
- Sodium Dodecyl Sulfate, SDS (Sigma)
- Temed (Applichem)
- ECL A + ECL B (Santa Cruz)
- Bradford protein assay (Bio-rad)
- Tween 20 (Sigma)
- Developer (Fuji)
- Fixer (Fuji)
- DTT (Serva)
- Phenyl Methyl Sulfonyl Floride, PMSF (Serva)
- Protease inhibitors (Sigma)
- Β-μερκαπτοαιθανόλη (Reidel de Haen)
- Brophonelol blue (Fluka)
- Protein marker (ProteinTech)
- Skimmed milk powder (Regilait)
- Αιθανόλη, EtOH 100% v/v (Sigma)

- Μεθανόλη, MeOH 100% v/v (Sigma)
- Ακετόνη 100% v/v (Sigma)
- PBS 10x (Gibco)
- Trypsin-EDTA 5% w/v 10x (Gibco)
- DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine (Gibco)
- DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, χωρίς phenol red, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine (Gibco)
- Horse Serum cis (HRS) 2% v/v (Gibco)
- Γλυκίνη (Serva)
- Tris-base (Merk)
- NaCl (Panreac)
- HCL (Merk)

2.3.2 Διαλύματα

- **DDT 1M:** Για 10ml διαλύονται 1.54gr DDT 1M σε ddH₂O. Γίνεται ανάδευση, aliquots και αποθήκευση στους -20°C.
- **PMSF 200mM:** Για παρασκευή 2ml διαλύονται 0.07gr PMSF 200 mM σε ισοπροπανόλη. Δημιουργία aliquots 200μl και αποθήκευση στους -20°C.
- **Tris 20mM pH 7.5:** Ανάμειξη 20μl stock διαλύματος Tris 1M pH 7.5 (4°C) με 980μl ddH₂O. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Lysis buffer:** 20mM Tris pH 7.5, 250mM NaCl, 0.5% v/v Triton 100X, 3mM EDTA, 1mM DTT, 0.1mM PMSF, protease inhibitors. Αποθήκευση τους 4°C.
- **APS 10% w/v:** 0.1gr APS σε 1ml ddH₂O. Αποθήκευση στους -20°C.
- **Διάλυμα Bradford:** Αραίωση αποθέματος 5x σε 1x με ddH₂O.
- **Sample buffer 4x:** 1M Tris pH 6.8, 10% v/v SDS, 10% v/v γλυκερόλη, 5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% v/v κυανό της βρωμοφαινόλης. Αποθήκευση στους -20°C.
- **Tris-HCL 1.5M pH 8.8:** Για παρασκευή 0.2lt διαλύονται 36.342gr Tris σε dH₂O, γίνεται ρύθμιση pH με προσθήκη HCL 12N και συμπληρώνεται ο τελικός όγκος dH₂O. Αποθήκευση στους 4°C.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης-Running buffer 10x:** Διάλυση 30.3gr Tris-base και 144gr γλυκίνης σε Υπερικό 1lt ddH₂O. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης-Running buffer 1x:** 10% v/v Running buffer 10x, 1% v/v SDS, 89% v/v dH₂O. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς-Transfer buffer 10x:** 10% v/v Running buffer 10x, 20% v/v MeOH, 0.5% v/v SDS. Συμπληρώνουμε με dH₂O. Αποθήκευση στους 4°C.
- **TBS 10x:** Διάλυση 24g Tris-base (MB 121,1) και 88g NaCl (MB 58,4) σε Υπερικό 1lt dH₂O, ρύθμιση pH στα 7.4-7.6 με προσθήκη HCL 12N. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- **TBS-T 1x:** 10% v/v TBS 10x, 90% v/v dH₂O και προσθήκη 1ml Tween 20. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-PBS 10x:** 2gr KLC, 2.4gr KH₂PO₄, 17.8gr Na₂HPO₄·2H₂O και 80gr NaCl σε Υπερικό 1lt. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBS-T 1x:** 10% v/v PBS 1x σε Υπερικό 1lt και προσθήκη 1ml tween 20. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διαλύματα εμφάνισης σήματος:** Ανάμειξη 1:3.5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (developer ή fixer) σε dH₂O. Διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτάδι.

2.3.3 Θρεπτικά υλικά

- DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine.
- DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, χωρίς phenol red, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine με 2% v/v horse serum cis (HRS) ως μέσο διαφοροποίησης των κυττάρων μυοβλαστών C2C12.

2.3.4 Αντισώματα

Η παραγωγή των αντισωμάτων γίνεται με διάλυση τους σε TBS-T 1x και αποβουτυρωμένο γάλα 2%. Αποθηκεύονται στους -20°C.

1. Πρωτογενή αντισώματα έναντι

- Αντι-ERα (ProteinTech)
- Αντι-GR-G5 (Santa Cruz)
- Αντι-PPARα (Santa Cruz)
- Αντι-MyoD1 (ProteinTech)
- Αντι-β-actin (ProteinTech)

2. Δευτερογενή αντισώματα έναντι

- Mouse IgG-HRP (Pierce)
- Rabbit IgG-HRP (Pierce)

2.4 Καλλιέργεια κυττάρων

Η καλλιέργεια κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε είναι η C2C12 μυοβλαστών, η οποία προέρχεται από δορυφορικά κύτταρα ενηλίκου ποντικού. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των κυττάρων είναι το DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine ενώ για τη διαφοροποίηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, χωρίς phenol red, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine με 2% v/v horse serum cis (HRS). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στους 37°C και σε 5% CO₂.

2.5 Θρυψινοποίηση κυττάρων

Θρυψινοποίηση είναι η τεχνική που χρησιμοποιεί το πρωτεολυτικό ένζυμο της θρυψίνης, το οποίο πέπτει το καρβοξυτελικό άκρο των αμινοξέων της αργινίνης ή λυσίνης, ώστε να διαχωρίσει τα συσσωματωμένα κύτταρα της καλλιέργειας και να αποτρέψει τη δημιουργία κορεσμού και πολλών στρώσεων

κυττάρων στη φλάσκα, που θα κάνουν δύσκολη τη παρατήρηση τους στο μικροσκόπιο. Μετά από απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού της φλάσκας, χορηγείται θρυψίνη σε ποσότητα ανάλογη της καλλιέργειας και η φλάσκα τοποθετείται πίσω στον επωαστικό κλίβανο. Μετά το πέρας 2-3 λεπτών, γίνεται ο έλεγχος της δράσης της στο μικροσκόπιο, όπου τα θρυψινοποιημένα κύτταρα θα πρέπει να παρατηρούνται ως στρογγυλά και σε εναιώρημα, ιδανικά μεμονωμένα. Μεγάλος χρόνος έκθεσης στη θρυψίνη οδηγεί σε κυτταροτοξικότητα. Κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα πέρασμα γήρατος για την εκάστοτε κυτταρική σειρά (passage). Για την απενεργοποίηση της θρυψίνης, προσθέτουμε θρεπτικό σε τετραπλάσια ποσότητα, από την ποσότητα της θρυψίνης που προστέθηκε. Ακολούθως, το περιεχόμενο της φλάσκας τοποθετείται σε falcon και φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου στα 1000rpm/5min. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου και γίνεται επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε θρεπτικό μέσο ώστε να γίνει επανακαλλιέργεια τους.

2.6 Μέτρηση και επίστρωση κυττάρων

Απαραίτητο για την εκτέλεση των πειραμάτων είναι η μέτρηση των κυττάρων μετά τη θρυψινοποίηση, η οποία γίνεται με τη μεταφορά 10μl σε καλυπτρίδα στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, και μέτρηση τους στο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια γίνεται η αναγωγή σε ml και υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων. Στο πείραμα μας τα κύτταρα C2C12 κυμαίνονταν στα 210000. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (RT) στα 1000rpm/5 λεπτά, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα των κυττάρων διαλυτοποιήθηκε σε DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine σε πιάτα 6 θέσεων (6 well plates), τα οποία τοποθετήθηκαν στον κλίβανο για επώαση.

2.7 Προσθήκη ουσιών

Στο πείραμα διαφοροποίησης απουσία στεροειδών ορμονών στα χρονικά διαστήματα των 2,4,6 και 8 ημερών, επιστρώσαμε 2 πιάτα

καλλιέργειας, ένα με μη διαφοροποιημένα (ND) C2C12 κύτταρα και ένα με διαφοροποιημένα (DIF), με θρεπτικό μέσο DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine. Μετά από 24 ώρες αφαιρέσαμε το θρεπτικό μέσο στο πιάτο των DIF, και προσθέσαμε νέο θρεπτικό DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, χωρίς phenol red, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine με 2% v/v horse serum cis (HRS) ως μέσο διαφοροποίησης. Ακολούθησε ανανέωση του θρεπτικού μέσου κάθε 2 ημέρες και συλλογή των κυττάρων στο επιθυμητό χρονικό διάστημα της διαφοροποίησης. Μαζί με την συλλογή των χρονικά τελευταίων διαφοροποιημένων (DIF) C2C12 κυττάρων, έλαβε μέρος και η συλλογή των μη διαφοροποιημένων (ND). Στο πείραμα διαφοροποίησης των C2C12 απουσία/παρουσία στεροειδών ορμονών σε στοχευμένο χρόνο 4 και 6 ημερών, επιστρώσαμε 3 πιάτα: μη διαφοροποιημένα (ND), διαφοροποιημένα (DIF) έως την 4η και 6η ημέρα αντίστοιχα, με θρεπτικό μέσο DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine. Μετά το πέρας 24 ωρών, αφαιρέθηκε το θρεπτικό και προστέθηκε DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, χωρίς phenol red, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine με 2% v/v horse serum cis (HRS) ως μέσο διαφοροποίησης στα DIF έως τη 4^η και 6^η ημέρα πιάτα. Την τέταρτη ημέρα ανανεώθηκε το θρεπτικό και προστέθηκαν οι ορμόνες E2 σε τελική συγκέντρωση (10^{-9} M), DEX (10^{-8} M) και DPN (10^{-8} M). Την 6^η ημέρα συλλέξαμε το πιάτο των DIF 4 ημερών και την 8^η ημέρα συλλέχθηκε το πιάτο των DIF 6 ημερών και το πιάτο των ND.

2.8 Συλλογή και λύση κυττάρων

Για την συλλογή των κυττάρων απομακρύνεται το θρεπτικό και γίνεται πλύση των κυττάρων με PBS 1x. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε eppendorfs με scrapper, τοποθετημένα σε πάγο και φυγοκεντρήθηκαν στα 2500rpm/5 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και έγινε αποθήκευση του ιζήματος στους -80°C. Ακολούθως έγινε σε πάγο η λύση των κυττάρων σε Lysis buffer για 25 λεπτά. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε και λύση με υπερήχους (sonication) 5 φορές με έκθεση 1sec για κάθε δείγμα με ενδιάμεση παύση 25 δευτερολέπτων και ένταση 40%, για διάσπαση των πιθανών υπολειμμάτων νουκλεϊκών οξέων.

2.9 Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της ολικής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης των βιολογικών δειγμάτων. Βασίζεται στην απορρόφηση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία μεταβάλλει το χρώμα της από καφέ σε μπλε όταν προσδένεται με πρωτεΐνες του δείγματος. Το αρχικό διάλυμα Bradford 5x αραιώνεται με ddH₂O σε 1x, και το δείγμα πριν τη μέτρηση περιέχει 1μl εξεταζόμενης πρωτεΐνης/1000μl διάλυμα Bradford 1x. Εφόσον τα δείγματα παραμείνουν στο σκοτάδι για 20-30 λεπτά, φωτομετρούνται στα 595nm. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση του δείγματος υπολογίζεται από τον τύπο $y=0,034x+0,01$ και προκύπτει μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης BSA. Με βάση τα αποτελέσματα, δημιουργούνται δείγματα με κατάλληλες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, sample buffer 4x και Tris 20mM pH 7.5, και είναι έτοιμα για ηλεκτροφόρηση, πριν από την οποία προηγείται η θέρμανση τους σε θερμοκυκλοποιητή για 3-5 λεπτά στους 95°C.

2.10 Ηλεκτροφόρηση – SDS PAGE

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το μοριακό τους βάρος. Οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες λόγω του SDS κινούνται προς την θετικά φορτισμένη άνοδο, μέσω εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου. Η SDS-PAGE απαιτεί δυο φάσεις για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η πρώτη φάση είναι η επιστοίβαξη των δειγμάτων στο gel επιστοίβαξης (stacking gel σταθερής συγκέντρωσης), υπεύθυνο για τη σωστή, ομοιόμορφη και ισοϋψή έναρξη της SDS-PAGE, ενώ τη δεύτερη φάση αποτελεί το gel διαχωρισμού (separating gel 10%), υπεύθυνο για το σωστό διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Στο σύστημα γίνεται εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου 90 Volt.

Πίνακας 1. Συστατικά των δύο φάσεων του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης.

Separating gel 10%		Stacking gel	
ddH ₂ O	2,425 ml	ddH ₂ O	2,025 ml
Tris-HCL pH 8.8	1,25 ml	Tris-HCL pH 6.8	0,21 ml
SDS 10% w/v	50 μ l	SDS 10% w/v	25 μ l
Bis Acr. 40% w/v	1,25 ml	Bis Acr. 40% w/v	0,25 ml
Temed	2,5 μ l	Temed	2,5 μ l
APS 10% w/v	25 μ l	APS 10% w/v	12,5 μ l

2.11 Ηλεκτρομεταφορά – Transfer

Ακολουθώντας της SDS-PAGE γίνεται η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτική πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0.45 μ M διαμέτρου πόρων. Η μεμβράνη και η πηκτική βρίσκονται σε επαφή μέσω διαμόρφωσης σάντουιτς ανάμεσα σε ένα ζευγάρι σφουγγαριών και δυο ζευγάρια Whatman, μεταφέρονται σε transfer buffer, και βρίσκονται υπό ηλεκτρομαγνητική τάση 0.35A για 70 λεπτά σε πάγο.

2.12 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην οποία έχουν μεταφερθεί επιτυχώς οι πρωτεΐνες, επωάζεται υπό ανάδευση σε διάλυμα blocking με 10% w/v αποβουτυρωμένο γάλα σκόνης σε TBS-T 1x για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου προς αποφυγή σύνδεσης των πρωτογενών αντισωμάτων σε μη ειδικές θέσεις. Στη συνέχεια γίνεται επώαση overnight με το πρωτογενές αντίσωμα στους 4°C. Μετά την αφαίρεση του, ακολουθούν 5 πλύσεις των 5 λεπτών υπό ανάδευση σε TBS-T 1x, επώαση υπό ανάδευση του δευτερογενούς αντισώματος σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και 3 πλύσεις των 5 λεπτών ξανά με TBS-T 1x. Τελικώς γίνεται στη μεμβράνη η ισόπωση προσθήκη των υποστρωμάτων ECL A και B για 3 λεπτά στο σκοτάδι σε μοριακό βάρος ενδιαφέροντος και τοποθετείται σε ειδική κασετίνα έκθεσης με

φιλμ στο σκοτάδι. Με την έκθεση των φιλμ στα developer και fixer για 1 λεπτό έκαστος, γίνεται η μονιμοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών.

2.13 Ανάλυση αποτελεσμάτων

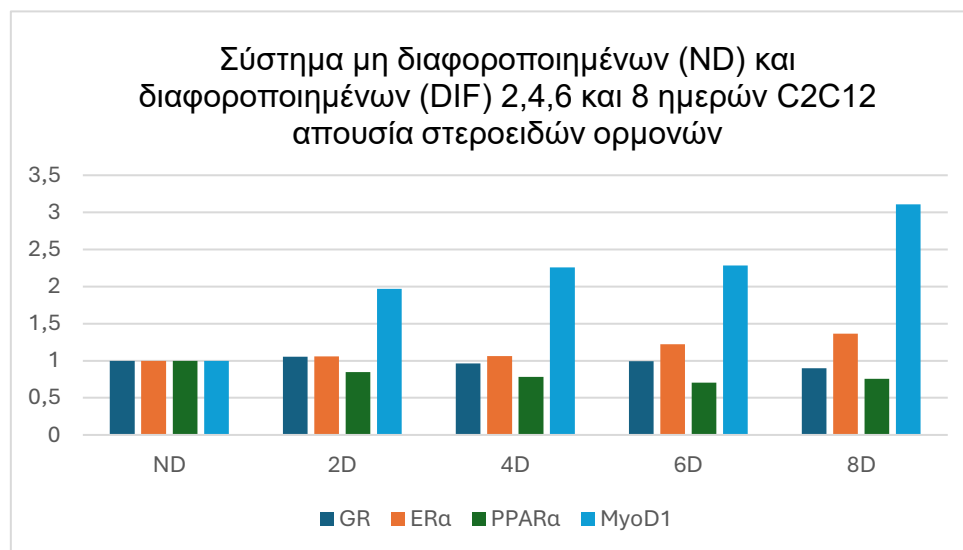
Η κανονικοποίηση των πειραματικών δεδομένων έγινε μέσω του Microsoft Office Excel και η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών μέσω του προγράμματος ImageJ. Στην τελική απεικόνιση των πρωτεϊνών βοήθησε το πρόγραμμα Adobe Photoshop CC.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μελέτη των πιθανών μεταβολών στα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR, ERα, PPARα κατά τη διαφοροποίηση των C2C12 κυττάρων απουσία στεροειδών ορμονών

Με στόχο να αποσαφηνιστεί όσο το δυνατόν καλύτερα ο ρόλος των υποδοχέων GR, ERα και PPARα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των C2C12 απουσία στεροειδών ορμονών, χρησιμοποιήθηκε σύστημα μη διαφοροποιημένων (ND) και διαφοροποιημένων κυττάρων (DIF) C2C12, κατά τα χρονικά διαστήματα 2,4,6 και 8 ημερών μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης. Και στα δύο συστήματα έγινε αρχική χρήση του θρεπτικού μέσου DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine ενώ για την επαγωγή διαφοροποίησης στο σύστημα των DIF C2C12 κυττάρων έγινε απομάκρυνση του αρχικού θρεπτικού μέσου μετά από 24 ώρες και προστέθηκε DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, χωρίς phenol red, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine με 2% v/v horse serum cis (HRS). Ακολούθησε ανανέωση του θρεπτικού μέσου κάθε 2 ημέρες και συλλογή των κυττάρων στο επιθυμητό χρονικό διάστημα της διαφοροποίησης. Μαζί με την συλλογή των χρονικά τελευταίων διαφοροποιημένων (DIF) C2C12 κυττάρων, έλαβε μέρος και η συλλογή των μη διαφοροποιημένων (ND). Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν οι μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR, ERα και PPARα μέσω της μεθόδου ανασοαποτύπωσης κατά Western. Επίσης

μελετήθηκαν οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων της MyoD1 καθώς αποτελεί σημαντικό δείκτη διαφοροποίησης των C2C12 κυττάρων και η πρωτεΐνη της β-ακτίνης ως μόριο κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων.

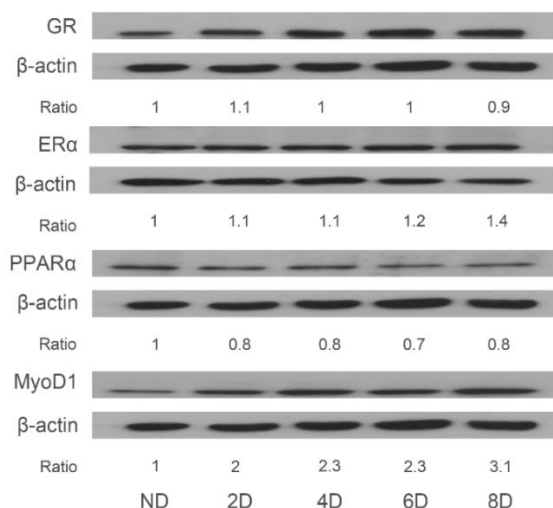


Διάγραμμα 1. Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων διερεύνησης των πιθανών μεταβολών στα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR, ERα, PPARα και MyoD1 σε σύστημα μη διαφοροποιημένων (ND) και διαφοροποιημένων (DIF) για 2,4,6,8 ημέρες κυττάρων C2C12, απουσία στεροειδών ορμονών. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη και η σύγκριση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται ως προς τη συνθήκη των μη διαφοροποιημένων (ND) C2C12 κυττάρων.

Στο **Διάγραμμα 1** παρατηρούμε ελάχιστη ως μηδαμινή μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα GR καθ' όλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης, συγκριτικά με τα μη διαφοροποιημένα (ND) C2C12 κύτταρα. Αντιθέτως, ο υποδοχέας ERα φαίνεται να παρουσιάζει αύξηση στα πρωτεϊνικά του επίπεδα τις ημέρες 6 και 8 της διαφοροποίησης με ποσοστά 20% και 40% αντίστοιχα, όταν αυτά συγκρίνονται με τα ND C2C12. Επιπλέον, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα PPARα φαίνεται να μειώνονται προοδευτικά και σταθερά με τη πάροδο της διαφοροποίησης σε ποσοστό 20-30%, συγκριτικά με τα ND C2C12. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του δείκτη διαφοροποίησης MyoD1 παρουσιάζουν αυξητική τάση σε όλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης, με

μέγιστο να παρατηρείται την 8^η ημέρα της διαφοροποίησης, σημειώνοντας 3 φορές αύξηση συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες.

Αποτελέσματα Western Blot :

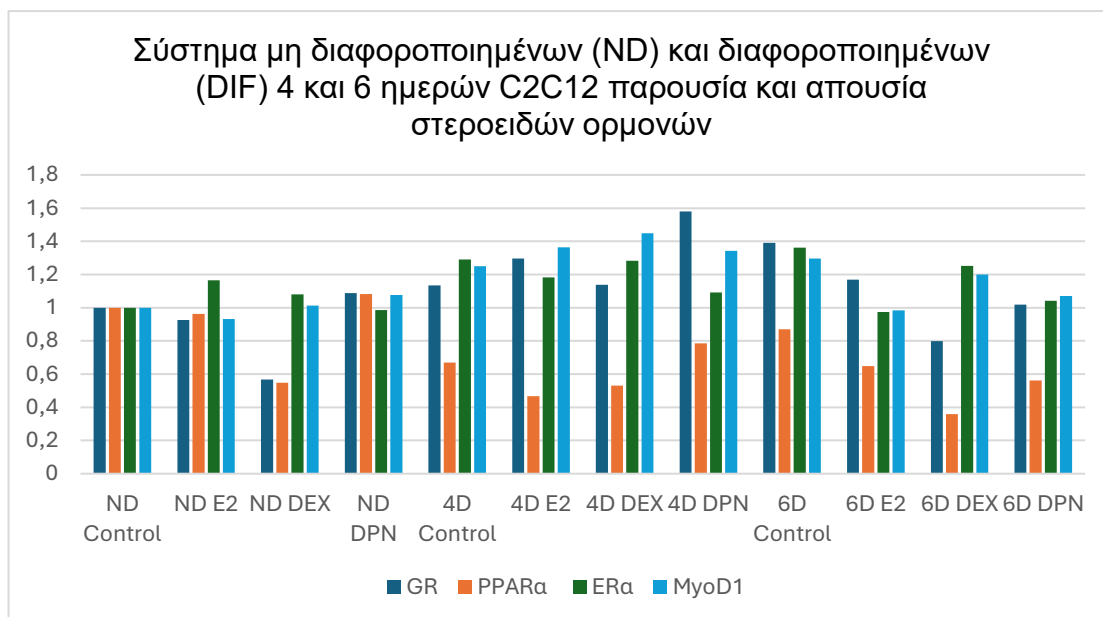


Εικόνα 13. Απεικόνιση των πρωτεϊνικών ζωνών που αντιπροσωπεύουν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR, ERα, PPARα και MyoD1 σε μη διαφοροποιημένα (ND) και διαφοροποιημένα (DIF) για 2,4,6,8 ημέρες C2C12 κύτταρα απουσία στεροειδών ορμονών.

Μετά την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών, τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγοι μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων και της β-ακτίνης κανονικοποιημένα ως προς τον αντίστοιχο λόγο στα μη διαφοροποιημένα (ND) κύτταρα C2C12. Παρατηρούμε πως ο GR παραμένει σταθερός σε όλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Ο ERα παρουσιάζει αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων στις ημέρες 6 και 8 με ποσοστά αύξησης 20% και 40% αντίστοιχα όταν αυτά συγκρίνονται με τα ND C2C12. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα μειώνονται προοδευτικά και σταθερά μέχρι το πέρας της διαφοροποίησης, κατά περίπου 20-30%, σε σύγκριση με τα ND C2C12. Ο δείκτης διαφοροποίησης MyoD1 παρουσιάζει αυξητική τάση των πρωτεϊνικών του επιπέδων από την επαγωγή της διαφοροποίησης, με τη μέγιστη αύξηση να παρατηρείται την 8^η ημέρα της διαφοροποίησης, σημειώνοντας 3 φορές αύξηση συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες.

3.2 Μελέτη των πιθανών μεταβολών στα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR, ERα, PPARα κατά τη διαφοροποίηση των C2C12 κυττάρων για 4 και 6 ημέρες απουσία και παρουσία στεροειδών ορμονών

Με στόχο να αποσαφηνιστεί όσο το δυνατόν καλύτερα ο ρόλος των υποδοχέων GR, ERα και PPARα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των C2C12 κυττάρων απουσία και παρουσία στεροειδών ορμονών σε στοχευμένο χρονικό διάστημα, χρησιμοποιήθηκε σύστημα μη διαφοροποιημένων (ND), διαφοροποιημένων (DIF) έως την 4^η ημέρα και διαφοροποιημένων (DIF) έως την 6^η ημέρα C2C12 κυττάρων. Και στα 3 συστήματα έγινε αρχική χρήση του θρεπτικού μέσου DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine. Στα συστήματα των DIF έως τις 4 και 6 ημέρες αντίστοιχα, έγινε απομάκρυνση του αρχικού θρεπτικού μέσου μετά από 24 ώρες επίστρωσης των κυττάρων και προστέθηκε DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, χωρίς phenol red, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine με 2% v/v horse serum cis (HRS) ως μέσο διαφοροποίησης των κυττάρων. Την τέταρτη ημέρα ανανεώθηκε το θρεπτικό και προστέθηκαν οι ορμόνες E2 σε τελική συγκέντρωση (10^{-9} M), DEX (10^{-8} M) και DPN (10^{-8} M). Την 6^η ημέρα έγινε συλλογή των DIF 4 ημερών και την 8^η ημέρα έγινε η συλλογή των DIF 6 ημερών, καθώς και των ND C2C12. Ακολούθως, διερευνήθηκαν τα επίπεδα των πρωτεϊνών μέσω της μεθόδου ανασοαποτύπωσης κατά Western. Επίσης μελετήθηκαν οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων της MyoD1 καθώς αποτελεί σημαντικό δείκτη διαφοροποίησης των C2C12 κυττάρων και η πρωτεΐνη της β-ακτίνης ως μόριο κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων.

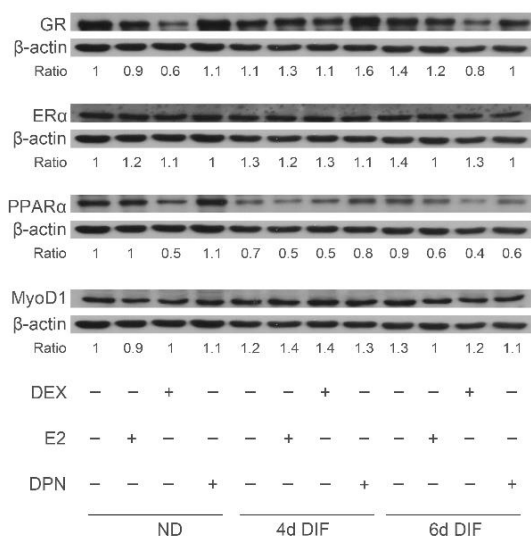


Διάγραμμα 2. Διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της διερεύνησης των πιθανών μεταβολών των πρωτεϊνικών επιπέδων των GR, ERα, PPARα και MyoD1 σε σύστημα μη διαφοροποιημένων (ND), και διαφοροποιημένων (DIF) έως την 4^η και 6^η ημέρα διαφοροποίησης C2C12 κυττάρων, απουσία και παρουσία στεροειδών ορμονών E2, DEX και DPN σε τελικές συγκεντρώσεις $10^{-9}M$, $10^{-8}M$ και $10^{-8}M$ αντίστοιχα. Ως μόριο κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη και η σύγκριση των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται ως προς τη συνθήκη των μη διαφοροποιημένων (ND) C2C12 κυττάρων απουσία των στεροειδών ορμονών.

Στο **Διάγραμμα 2** παρατηρούμε πως τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων GR, ERα και της πρωτεΐνης MyoD1 αυξάνονται κατά τη διαφοροποίηση τόσο την 4^η όσο και την 6^η ημέρα διαφοροποίησης (σύγκριση 4Dcontrol/NDcontrol, 6Dcontrol/NDcontrol). Αντίθετα τα πρωτεϊνικά επίπεδα PPARα μειώνονται. Η αύξηση του GR κατά την 4^η ημέρα διαφοροποίησης γίνεται πιο έντονη παρουσία της E2 με ποσοστό 25% και ακόμα εντονότερη με την παρουσία του DPN με ποσοστό 55%, συγκριτικά με τα μη διαφοροποιημένα (ND) C2C12 κύτταρα. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα η παρουσία DPN δεν προκάλεσε μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων που μελετήθηκαν. Ομοίως και η παρουσία E2, με μόνη διαφορά την επαγωγή μικρής αύξησης (κατά 20%) στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα. Το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές DEX προκάλεσε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR

και PPARα, δράση που επιβεβαιώνεται και από δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας [20]. Όπως προαναφέρθηκε, στα διαφοροποιημένα κύτταρα την 4^η ημέρα διαφοροποίησης, παρατηρείται αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των GR, ERα και MyoD1 και μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα. Η δράση αυτή ενισχύεται κατά την 6^η ημέρα διαφοροποίησης με την αύξηση στον GR, ERα και MyoD1 να φθάνει στο 50%, ενώ τα επίπεδα PPARα παραμένουν μειωμένα σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Την 4^η ημέρα διαφοροποίησης οι ορμόνες DEX, E2, και DPN προκαλούν περαιτέρω αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της MyoD1 (σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς, 4D control) υποδηλώνοντας τη συμμετοχή των ορμονών αυτών στη διαδικασία της διαφοροποίησης. Την 6^η ημέρα διαφοροποίησης η δράση αυτή εξασθενεί, πιθανόν επειδή έχει ολοκληρωθεί πλέον η διαδικασία της διαφοροποίησης και η παρουσία του παράγοντα διαφοροποίησης (HRS) αρκεί για την διαφοροποίηση των κυττάρων. Όσο αφορά την επίδραση ορμονών στα επίπεδα GR και ERα σε διαφοροποιημένα κύτταρα, παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων GR παρουσία E2 και DPN κατά την 4^η ημέρα διαφοροποίησης, δράση που εξασθενεί και αντιστρέφεται κατά την 6^η ημέρα της διαφοροποίησης (σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς, 4D control και 6D control, αντίστοιχα). Όσο αφορά τα επίπεδα ERα, η παρουσία ορμονών δεν τα μεταβάλλει σημαντικά κατά την 4^η ημέρα διαφοροποίησης (σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς, 4D control) ενώ κατά την 6^η ημέρα διαφοροποίησης παρατηρείται μία μείωση των επιπέδων του (σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς, 6D control). Οι παρατηρήσεις αυτές πιθανόν να υποδηλώνουν μία μεγαλύτερη εμπλοκή των υποδοχέων κατά τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης.

Αποτελέσματα Western Blot :



Εικόνα 14. Απεικόνιση των πρωτεϊνικών ζωνών που αντιπροσωπεύουν τις μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων των GR, ERα, PPARα και MyoD1 σε μη διαφοροποιημένα (ND) και διαφοροποιημένα (DIF) έως την 4^η και 6^η ημέρα C2C12 κύτταρα απουσία και παρουσία στεροειδών ορμονών.

Μετά την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών, τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγοι μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων και της β-ακτίνης κανονικοποιημένα ως προς τον αντίστοιχο λόγο στα μη διαφοροποιημένα (ND) κύτταρα C2C12. Παρατηρούμε πως τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων GR, ERα και της πρωτεΐνης MyoD1 αυξάνονται κατά τη διαφοροποίηση τόσο την 4^η όσο και την 6^η ημέρα διαφοροποίησης (σύγκριση 4Dcontrol/NDcontrol, 6Dcontrol/NDcontrol). Αντίθετα τα πρωτεϊνικά επίπεδα PPARα μειώνονται. Η αύξηση του GR κατά την 4^η ημέρα διαφοροποίησης γίνεται πιο έντονη παρουσία της E2 με ποσοστό 25% και ακόμα εντονότερη με την παρουσία του DPN με ποσοστό 55%, συγκριτικά με τα μη διαφοροποιημένα (ND) C2C12 κύτταρα. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα η παρουσία DPN δεν προκάλεσε μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων που μελετήθηκαν. Ομοίως και η παρουσία E2, με μόνη διαφορά την επαγωγή μικρής αύξησης (κατά 20%) στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα. Το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές DEX προκάλεσε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR και PPARα. Όπως προαναφέρθηκε, στα διαφοροποιημένα κύτταρα την 4^η ημέρα διαφοροποίησης, παρατηρείται αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των GR, ERα και MyoD1 και μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα. Η δράση αυτή ενισχύεται κατά την 6^η ημέρα διαφοροποίησης με την αύξηση στον

GR, ERα και MyoD1 να φθάνει στο 50%, ενώ τα επίπεδα PPARα παραμένουν μειωμένα σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Την 4^η ημέρα διαφοροποίησης οι ορμόνες DEX, E2, και DPN προκαλούν περαιτέρω αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της MyoD1 (σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς, 4D control) υποδηλώνοντας τη συμμετοχή των ορμονών αυτών στη διαδικασία της διαφοροποίησης. Την 6^η ημέρα διαφοροποίησης η δράση αυτή εξασθενεί, πιθανόν επειδή έχει ολοκληρωθεί πλέον η διαδικασία της διαφοροποίησης και η παρουσία του παράγοντα διαφοροποίησης (HRS) αρκεί για την διαφοροποίηση των κυττάρων. Όσο αφορά την επίδραση ορμονών στα επίπεδα GR και ERα σε διαφοροποιημένα κύτταρα, παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων GR παρουσία E2 και DPN κατά την 4^η ημέρα διαφοροποίησης, δράση που εξασθενεί και αντιστρέφεται κατά την 6^η ημέρα της διαφοροποίησης (σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς, 4D control και 6D control, αντίστοιχα). Όσο αφορά τα επίπεδα ERα, η παρουσία ορμονών δεν τα μεταβάλλει σημαντικά κατά την 4^η ημέρα διαφοροποίησης (σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς, 4D control) ενώ κατά την 6^η ημέρα διαφοροποίησης παρατηρείται μία μείωση των επιπέδων του (σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς, 6D control). Οι παρατηρήσεις αυτές πιθανόν να υποδηλώνουν μία μεγαλύτερη εμπλοκή των υποδοχέων κατά τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι **στεροειδείς ορμόνες (SHs)** είναι λιπόφιλα μόρια που έχουν την δυνατότητα να εισέλθουν εύκολα στα κύτταρα και να ασκούν τις βιολογικές τους δράσεις μέσω σύνδεσης με τους αντίστοιχους **υποδοχείς στεροειδών ορμονών (SHRs)**, οι οποίοι ανήκουν στην υπεροικογένεια των **πυρηνικών υποδοχέων (NCRs)** και λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζοντας την μεταγραφή γονιδίων στόχων κατόπιν ενεργοποίησής τους. Είναι υπεύθυνοι για πληθώρα βιολογικών λειτουργιών όπως η κυτταρική διαίρεση και πολλαπλασιασμός, ο μεταβολισμός, η αναπαραγωγή, η διαφοροποίηση και η απορρύθμιση της φυσιολογικής τους λειτουργίας μπορεί να προκαλέσει πολλές ασθένειες όπως καρκίνο, διαβήτη και στειρότητα. Στους SHRs ανήκουν ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER), ο υποδοχέας

γλυκοκορτικοειδών (GR), ο υποδοχέας ανδρογόνων (AR) και ο υποδοχέας προγεστερόνης (PR) [1, 2].

Τα **οιστρογόνα** (estrogens) είναι μια ομάδα στεροειδών ορμονών γνωστές και ως οι θηλυκές ορμόνες, καθώς παράγονται κατά κύριο λόγο στα ωοθυλάκια, τον πλακούντα και το ωχρό σωματίο. Στα ενδογενή οιστρογόνα συγκαταλέγονται η οιστρόνη (E1), η οιστραδιόλη (E2) και η οιστρόλη (E3). Η 17β-οιστραδιόλη αποτελεί το κύριο κυκλοφορούν οιστρογόνο. Έχουν σημαντικές επιδράσεις στην ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και τις φυσιολογικές λειτουργίες των αναπαραγωγικών οργάνων. Επιπρόσθετα, επηρεάζουν ιστούς εκτός του αναπαραγωγικού συστήματος, όπως το ανοσολογικό, καρδιαγγειακό, σκελετικό και κεντρικό νευρικό σύστημα. Τα οιστρογόνα αποτελούν τον προσδέτη των υποδοχέων οιστρογόνων (ERs) [3]. Τα **γλυκοκορτικοειδή** (Glucocorticoids, GCs) είναι επίσης στεροειδείς ορμόνες. Το κυριότερο ενδογενές GC είναι η κορτιζόλη. Έχουν μεγάλη επίδραση σε ποικιλία φυσιολογικών διεργασιών όπως ο μεταβολισμός, η σκελετική ανάπτυξη, η καρδιαγγειακή και ανοσοποιητική λειτουργία καθώς και η αναπαραγωγή. Οι φυσιολογικές και φαρμακολογικές ενέργειες των GCs διενεργούνται μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR) [6, 7]. Τα **υπεροξεισώματα** είναι υποκυτταρικά οργανίδια που περιέχουν ένζυμα, τα οποία επηρεάζουν πολλές μεταβολικές διεργασίες των λιπαρών οξέων. Τα υπερξεισώματα σχετίζονται με τους υποδοχείς τους, PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), οι οποίοι ενεργοποιούνται από λιπαρά οξέα και ρυθμίζουν τον μεταβολισμό τους. Συγκεκριμένα, ο PPARα ρυθμίζει την γλυκονεογένεση, τον μεταβολισμό λιποπρωτεϊνών και χολικών οξέων, τη παραγωγή τριγλυκεριδίων και την οξείδωση λιπαρών οξέων [9].

Οι **σκελετικοί μύες** αποτελούν τον μεγαλύτερο ιστό στους ανθρώπους με ποσοστό 40%, έχουν τεράστια αναγεννητική ικανότητα και είναι απαραίτητοι για τη φυσιολογική κίνηση του σώματος, τον μεταβολισμό του λίπους και των υδατανθράκων. Το κύριο δομικό και λειτουργικό συστατικό τους είναι τα μονοπύρρηνα βλαστοκύτταρα, τα οποία ονομάζονται δορυφορικά κύτταρα [11, 12]. **Μυογένεση** ονομάζεται η πολυ-σταδιακή διαδικασία κατά την οποία αδιαφοροποίητα κύτταρα εξελίσσονται σε μυϊκά, παράγοντας μυϊκό ιστό. Η διαδικασία αυτή ελέγχεται από τα μέλη της οικογένειας των Μυογενικών Ρυθμιστικών Παραγόντων (MRFs) [11]. Τα μέλη της οικογένειας **MRF** (Myf5,

MyoD, myogenin και MRF4), είναι μεταγραφικοί παράγοντες που διέπουν τα διαφορετικά στάδια της μυογένεσης ελέγχοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων κατά την εμβρυϊκή και μεταγεννητική ανάπτυξη [13]. Η **MyoD** είναι απαραίτητος μεταγραφικός παράγοντας για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των σκελετικών μυών. Καθορίζει τη μοίρα των πρόδρομων κυττάρων, δεσμεύοντάς τα στη μυογονική γραμμή και μετατρέποντάς τα σε μυοβλάστες [13].

Τα **οιστρογόνα** έχουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της μυϊκής μάζας και στη διατήρηση της ομοιόστασης των **σκελετικών μυών**. Μέσω της δράσης των υποδοχέων οιστρογόνων στα δορυφορικά κύτταρα, αναγεννούν τους μύες και συμβάλλουν στην πρόληψη περισσότερων μέτα-τραυματισμών. Προάγουν την αναγέννηση των μυών και μειώνουν τις βλάβες που προκαλούνται μετά την άσκηση αναστέλλοντας τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις [4, 5]. Τα **γλυκοκορτικοειδή** ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των πρωτεϊνών και της γλυκόζης στους **σκελετικούς μύες**. Στρεσογόνες συνθήκες, όπως η νηστεία προκαλούν αύξηση των GCs, μειώνοντας τη σύνθεση πρωτεϊνών και αυξάνοντας την πρωτεόλυση για παραγωγή αμινοξέων ως πρόδρομο για την ηπατική γλυκονεογένεση, με τη γλυκόζη που παράγεται να λειτουργεί ως καύσιμο για τον εγκέφαλο. Χρόνια ή υπερβολική έκθεση σε GCs προκαλεί μυϊκή ατροφία [8]. Στους **σκελετικούς μύες**, η δραστηριότητα του **PPARα** είναι απαραίτητη για τον μεταβολισμό των λιπιδίων και υδατανθράκων. Η ενεργοποίηση του PPARα είναι ειδική προς τον τύπο της μυϊκής ίνας [17].

Κυτταρική διαφοροποίηση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία βλαστοκύτταρα μετατρέπονται σε πιο εξειδικευμένες κυτταρικές σειρές και αποκτούν νέες λειτουργίες μέσω της έκφρασης γονιδίων. Τα **κύτταρα C2C12** είναι μια αθάνατη κυτταρική σειρά **μυοβλαστών** που προέρχεται από δορυφορικά κύτταρα ενήλικου ποντικού τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν μέσω στέρησης θρεπτικού μέσου σε μυοβλάστες [12, 18]. Μελέτες έχουν δείξει πως η χορήγηση στεροειδών ορμονών όπως η **E2** (17β-οιστραδιόλη) [19] και η **DEX** (δεξαμεθαζόνη) [20] μπορούν να επάγουν μυϊκή διαφοροποίηση όταν χορηγούνται στο στάδιο των μυοβλαστών. Η **MyoD** είναι ο κύριος μεταγραφικός παράγοντας/δείκτης διαφοροποίησης που είναι

απαραίτητος για την καταστολή του πολλαπλασιασμού και έναρξη διαφοροποίησης των μυοβλαστών [15].

Στη μελέτη μας, διερευνήθηκαν οι πιθανές μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών (GR), οιστρογόνων ισομορφής α (ERα), πολλαπλασιαστή υπεροξεισωμάτων ισομορφής α (PPARα) και του δείκτη διαφοροποίησης MyoD1 κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης κυττάρων μυοβλαστών C2C12. Για την καλύτερη δυνατή αποσαφήνιση του ρόλου των υποδοχέων στη διάρκεια της διαφοροποίησης των κυττάρων C2C12 σε δύο συγκεκριμένα διαφορετικά χρονικά διαστήματα εξέλιξης της διαδικασίας, αυτό των 4 και 6 ημερών στοχευμένα, μελετήθηκαν οι πιθανές μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων σε συνδυασμό με την παρουσία και απουσία των στεροειδών ορμονών E2, DEX και DPN. Στο πείραμα μας με απουσία στεροειδών ορμονών, χρησιμοποιήθηκε σύστημα μη διαφοροποιημένων (ND) και διαφοροποιημένων κυττάρων (DIF) C2C12, κατά τα χρονικά διαστήματα 2,4,6 και 8 ημερών μετά την επαγωγή της διαφοροποίησης. Και στα δύο συστήματα έγινε αρχική χρήση του θρεπτικού μέσου DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine ενώ για την επαγωγή της διαφοροποίησης στο σύστημα των DIF C2C12 κυττάρων έγινε απομάκρυνση του αρχικού θρεπτικού μέσου μετά από 24 ώρες και προστέθηκε DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, χωρίς phenol red, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine με 2% v/v horse serum cis (HRS). Ακολούθησε ανανέωση του θρεπτικού μέσου ανά 2 ημέρες και συλλογή των κυττάρων στο επιθυμητό χρονικό διάστημα της διαφοροποίησης. Μαζί με την συλλογή των χρονικά τελευταίων διαφοροποιημένων (DIF) C2C12 κυττάρων, έλαβε μέρος και η συλλογή των μη διαφοροποιημένων (ND). Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν οι μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR, ERα και PPARα μέσω της μεθόδου ανασοαποτύπωσης κατά Western. Επίσης μελετήθηκαν οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων της MyoD1 καθώς αποτελεί σημαντικό δείκτη διαφοροποίησης των C2C12 κυττάρων και η πρωτεΐνη της β-ακτίνης ως μόριο κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων.

Σύμφωνα με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, που παρουσιάζονται ως λόγοι μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων κανονικοποιημένων ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της β-ακτίνης και συγκρινόμενα με τον

αντίστοιχο λόγο στα μη διαφοροποιημένα (ND) κύτταρα C2C12 (τιμή λόγο «1»), ο GR φάνηκε να παραμένει σταθερός σε όλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Ο ERα παρουσίασε αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων στις ημέρες 6 και 8 με ποσοστά 20% και 40% αντίστοιχα όταν αυτά συγκρίθηκαν με τα ND C2C12 κύτταρα. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα έδειξαν προοδευτική και σταθερή μείωση μέχρι το πέρας της διαφοροποίησης, περίπου 20-30%, σε σύγκριση με τα ND C2C12 κύτταρα. Τέλος, ο δείκτης διαφοροποίησης MyoD1 έδειξε αυξητική τάση των πρωτεϊνικών της επιπέδων από την επαγωγή της διαφοροποίησης, με τη μέγιστη αύξηση να παρατηρείται την 8^η ημέρα της διαφοροποίησης, σημειώνοντας 3 φορές αύξηση συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες.

Σε δεύτερο πείραμα μας, με σκοπό να διερευνήσουμε σε στοχευμένο χρόνο τις μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων GR, ERα και PPARα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των C2C12 απουσία/παρουσία στεροειδών ορμονών, χρησιμοποιήσαμε σύστημα μη διαφοροποιημένων (ND), διαφοροποιημένων (DIF) έως την 4^η ημέρα και έως την 6^η ημέρα C2C12 κυττάρων. Και στα 3 συστήματα έγινε αρχική χρήση του θρεπτικού μέσου DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, με phenol red, 10% v/v FBS, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine. Στα συστήματα των DIF έως τις 4 και 6 ημέρες αντίστοιχα, έγινε απομάκρυνση του αρχικού θρεπτικού μέσου μετά από 24 ώρες και προστέθηκε DMEM high glucose, 4 gr glucose/L, χωρίς phenol red, 1% v/v P/S, 1% v/v L-glutamine με 2% v/v horse serum cis (HRS) ως μέσο διαφοροποίησης των κυττάρων. Την τέταρτη ημέρα ανανεώθηκε το θρεπτικό και προστέθηκαν οι ορμόνες E2 σε τελική συγκέντρωση (10^{-9} M), DEX (10^{-8} M) και DPN (10^{-8} M). Την 6^η ημέρα έγινε συλλογή των DIF έως την 4^η ημέρα και την 8^η ημέρα έγινε η συλλογή των DIF έως την 6^η ημέρα, καθώς και των ND C2C12 κυττάρων. Ακολούθως, διερευνήθηκαν οι μεταβολές στα πρωτεϊνικά επίπεδα των GR, ERα και PPARα μέσω της μεθόδου ανασοαποτύπωσης κατά Western. Επίσης μελετήθηκαν οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων της MyoD1 καθώς αποτελεί σημαντικό δείκτη διαφοροποίησης των C2C12 κυττάρων και η πρωτεΐνη της β-ακτίνης ως μόριο κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων.

Σύμφωνα με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, που παρουσιάζονται ως λόγοι μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων κανονικοποιημένων

ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της β-ακτίνης και συγκρινόμενα με τον αντίστοιχο λόγο στα μη διαφοροποιημένα (ND) κύτταρα C2C12 (τιμή λόγο «1»), παρατηρούμε πως τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων GR, ERα και της πρωτεΐνης MyoD1 αυξάνονται κατά τη διαφοροποίηση τόσο την 4^η όσο και την 6^η ημέρα διαφοροποίησης (σύγκριση 4Dcontrol/NDcontrol, 6Dcontrol/NDcontrol). Αντίθετα τα πρωτεϊνικά επίπεδα PPARα μειώνονται. Η αύξηση του GR κατά την 4^η ημέρα διαφοροποίησης γίνεται πιο έντονη παρουσία της E2 με ποσοστό 25% και ακόμα εντονότερη με την παρουσία του DPN με ποσοστό 55%, συγκριτικά με τα μη διαφοροποιημένα (ND) C2C12 κύτταρα. Στα μη διαφοροποιημένα κύτταρα η παρουσία DPN δεν προκάλεσε μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων που μελετήθηκαν. Ομοίως και η παρουσία E2, με μόνη διαφορά την επαγωγή μικρής αύξησης (κατά 20%) στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα. Το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές DEX προκάλεσε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR και PPARα. Όπως προαναφέρθηκε, στα διαφοροποιημένα κύτταρα την 4^η ημέρα διαφοροποίησης, παρατηρείται αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων των GR, ERα και MyoD1 και μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του PPARα. Η δράση αυτή ενισχύεται κατά την 6^η ημέρα διαφοροποίησης με την αύξηση στον GR, ERα και MyoD1 να φθάνει στο 50%, ενώ τα επίπεδα PPARα παραμένουν μειωμένα σε σχέση με τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Την 4^η ημέρα διαφοροποίησης οι ορμόνες DEX, E2, και DPN προκαλούν περαιτέρω αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της MyoD1 (σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς, 4D control) υποδηλώνοντας τη συμμετοχή των ορμονών αυτών στη διαδικασία της διαφοροποίησης. Την 6^η ημέρα διαφοροποίησης η δράση αυτή εξασθενεί, πιθανόν επειδή έχει ολοκληρωθεί πλέον η διαδικασία της διαφοροποίησης και η παρουσία του παράγοντα διαφοροποίησης (HRS) αρκεί για την διαφοροποίηση των κυττάρων. Όσο αφορά την επίδραση ορμονών στα επίπεδα GR και ERα σε διαφοροποιημένα κύτταρα, παρατηρούμε αύξηση των επιπέδων GR παρουσία E2 και DPN κατά την 4^η ημέρα διαφοροποίησης, δράση που εξασθενεί και αντιστρέφεται κατά την 6^η ημέρα της διαφοροποίησης (σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς, 4D control και 6D control, αντίστοιχα). Όσο αφορά τα επίπεδα ERα η παρουσία ορμονών δεν τα μεταβάλλει σημαντικά κατά την 4^η ημέρα διαφοροποίησης (σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς, 4D control) ενώ κατά την 6^η ημέρα διαφοροποίησης παρατηρείται μία μείωση των

επιπέδων του (σύγκριση με τις συνθήκες αναφοράς, 6D control). Οι παρατηρήσεις αυτές πιθανόν να υποδηλώνουν μία μεγαλύτερη εμπλοκή των υποδοχέων κατά τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης.

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με την ανάλυση των αποτελεσμάτων, που παρουσιάζονται ως λόγοι μεταξύ των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων κανονικοποιημένων ως προς τα αντίστοιχα επίπεδα της β-ακτίνης και συγκρινόμενα με τον αντίστοιχο λόγο στα μη διαφοροποιημένα (ND) κύτταρα C2C12 (τιμή λόγο «1»), τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ERα φάνηκαν να σημειώνουν αύξηση, οδηγώντας στην υπόθεση πως ο ERα πιθανόν να έχει ρόλο στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των σκελετικών μυών. Το ίδιο ενδεχομένως να ισχύει και όσο αφορά τον GR, με τα αποτελέσματα να χρήζουν περισσότερης διερεύνησης και επιβεβαίωσης. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα του PPARα σημείωσαν κλιμακωτή πτώση κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες, γεγονός που μπορεί να ερμηνευτεί ως μειωμένη πρόσληψη και μεταβολισμό λιπαρών οξέων και υδατανθράκων. Ο δείκτης διαφοροποίησης MyoD1 έδειξε αύξηση των πρωτεϊνικών του επιπέδων κατά την εξέλιξη της διαφοροποίησης των μυοβλαστών συμβαδίζοντας με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, αποτελώντας έναν αξιόπιστο δείκτη.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Beato, M. 'Steroid Hormone Receptors: An Update'. *Human Reproduction Update* 6, τχ. 3 (1 Μάιος 2000): 225–36. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.3.225>.
2. Sever, R., και C. K. Glass. 'Signaling by Nuclear Receptors'. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5, τχ. 3 (1 Μάρτιος 2013): a016709–a016709. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016709>.
3. Fuentes, Nathalie, και Patricia Silveyra. 'Estrogen Receptor Signaling Mechanisms'. Στο *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 116:135–70. Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>.
4. Yoh, Kenta, Kazuhiro Ikeda, Kuniko Horie, και Satoshi Inoue. 'Roles of Estrogen, Estrogen Receptors, and Estrogen-Related Receptors in Skeletal Muscle: Regulation of Mitochondrial Function'. *International Journal of*

- Molecular Sciences* 24, τχ. 3 (17 Ιανουάριος 2023): 1853.
<https://doi.org/10.3390/ijms24031853>.
5. Ikeda, Kazuhiro, Kuniko Horie-Inoue, και Satoshi Inoue. 'Functions of Estrogen and Estrogen Receptor Signaling on Skeletal Muscle'. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 191 (Ιούλιος 2019): 105375.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105375>.
 6. Oakley, Robert H., και John A. Cidlowski. 'The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease'. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132, τχ. 5 (Νοέμβριος 2013): 1033–44.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007>.
 7. Lockett, Jack, Warrick J Inder, και Vicki L Clifton. 'The Glucocorticoid Receptor: Isoforms, Functions, and Contribution to Glucocorticoid Sensitivity'. *Endocrine Reviews* 45, τχ. 4 (12 Ιούλιος 2024): 593–624.
<https://doi.org/10.1210/endrev/bnae008>.
 8. Kuo, Taiyi, Charles A. Harris, και Jen-Chywan Wang. 'Metabolic Functions of Glucocorticoid Receptor in Skeletal Muscle'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 380, τχ. 1–2 (Νοέμβριος 2013): 79–88.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.03.003>.
 9. Bougarne, Nadia, Basiel Weyers, Sofie J Desmet, Julie Deckers, David W Ray, Bart Staels, και Karolien De Bosscher. 'Molecular Actions of PPARα in Lipid Metabolism and Inflammation'. *Endocrine Reviews* 39, τχ. 5 (1 Οκτώβριος 2018): 760–802. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00064>.
 10. Manickam, Ravikumar, Kalina Duszka, και Walter Wahli. 'PPARs and Microbiota in Skeletal Muscle Health and Wasting'. *International Journal of Molecular Sciences* 21, τχ. 21 (29 Οκτώβριος 2020): 8056.
<https://doi.org/10.3390/ijms21218056>.
 11. Alheib, Omar, Lucília P. da Silva, Il Keun Kwon, Rui L. Reis, και Vitor M. Correlo. 'Preclinical Research Studies for Treating Severe Muscular Injuries: Focus on Tissue-Engineered Strategies'. *Trends in Biotechnology* 41, τχ. 5 (Μάιος 2023): 632–52.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.09.010>.
 12. Asakura, Atsushi, και Nobuaki Kikyo. 'Immunofluorescence Analysis of Myogenic Differentiation'. Στο *Methods in Cell Biology*, 170:117–25. Elsevier, 2022. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2022.02.010>.

13. Hernández-Hernández, J. Manuel, Estela G. García-González, Caroline E. Brun, και Michael A. Rudnicki. 'The Myogenic Regulatory Factors, Determinants of Muscle Development, Cell Identity and Regeneration'. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 72 (Δεκέμβριος 2017): 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.010>.
14. Zhou, Di, Yan Wang, Rong Yang, Fu Wang, Zhonghai Zhao, Xin Wang, Lingling Xie, κ.ά. 'The MyoD1 Promoted Muscle Differentiation and Generation by Activating CCND2 in Guanling Cattle'. *Animals* 12, τχ. 19 (26 Σεπτέμβριος 2022): 2571. <https://doi.org/10.3390/ani12192571>.
15. Ferri, Paola, Elena Barbieri, Sabrina Burattini, Michele Guescini, Alessandra D'Emilio, Laura Biagiotti, Paolo Del Grande, Antonio De Luca, Vilberto Stocchi, και Elisabetta Falcieri. 'Expression and Subcellular Localization of Myogenic Regulatory Factors during the Differentiation of Skeletal Muscle C2C12 Myoblasts'. *Journal of Cellular Biochemistry* 108, τχ. 6 (15 Δεκέμβριος 2009): 1302–17. <https://doi.org/10.1002/jcb.22360>.
16. Tapscott, Stephen J. 'The Circuitry of a Master Switch: Myod and the Regulation of Skeletal Muscle Gene Transcription'. *Development* 132, τχ. 12 (15 Ιούνιος 2005): 2685–95. <https://doi.org/10.1242/dev.01874>.
17. Burri, Lena, G. Hege Thoresen, και Rolf K. Berge. 'The Role of PPAR α Activation in Liver and Muscle'. *PPAR Research* 2010 (2010): 1–11. <https://doi.org/10.1155/2010/542359>.
18. Pittenger, Mark F., and Candace L. Kerr. "Stem cells." In *Elsevier eBooks*, 13–69, 2023. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824459-3.00002-0>.
19. Galluzzo, Paola, Chiara Rastelli, Pamela Bulzomi, Filippo Acconcia, Valentina Pallottini, και Maria Marino. '17 β -Estradiol Regulates the First Steps of Skeletal Muscle Cell Differentiation via ER- α -Mediated Signals'. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 297, τχ. 5 (Νοέμβριος 2009): C1249–62. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00188.2009>.
20. Han, Der-Sheng, Wei-Shiung Yang, και Tung-Wei Kao. 'Dexamethasone Treatment at the Myoblast Stage Enhanced C2C12 Myocyte Differentiation'. *International Journal of Medical Sciences* 14, τχ. 5 (2017): 434–43. <https://doi.org/10.7150/ijms.18427>.
21. Marinus F. W. te Pas, Pieter R. de Jong & Frans J. Verburg. 'Glucocorticoid Inhibition of C2C12 Proliferation Rate and Differentiation Capacity in

Relation to mRNA Levels of the MRF Gene Family'. *Molecular Biology Reports*, τχ. 27 (2000): 87–98. <https://doi.org/10.1023/a:1007120921064>.