

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

“ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ
ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ
ΕΠΑΓΩΓΗ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΜΥΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ”

“ASSESSMENT OF THE EFFECT OF AGING ON
TRANSCRIPTION FACTORS EXPRESSION IN
MUSCLE CELLS”

ΤΟΠΑΛΙΔΟΥ ΣΟΥΣΑΝΑ ΤΟΥ ΚΟΣΜΑ

ΛΑΡΙΣΑ - 2025

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο “Διερεύνηση των μεταβολών των επιπέδων μεταγραφικών παραγόντων κατά την επαγωγή γήρανσης μυϊκών κυττάρων σε καλλιέργεια” εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΨΑΡΡΑ ANNA-MARIA: Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΨΑΡΡΑ ANNA-MARIA: Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ: Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας, την κυρία Ψαρρά Άννα-Μαρία, Καθηγήτρια Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την ευκαιρία να ενταχθώ στην ερευνητική της ομάδα στον εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την πολύτιμη και αξιέπαινη βοήθεια, τις αναρίθμητες γνώσεις και την έμπρακτη υποστήριξη και καθοδήγηση που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής της παρούσας διπλωματικής εργασίας, την κυρία Σκαμνάκη Βασιλική, Επίκουρος Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας καθώς και τον κύριο Δημήτρη Λεωνίδα, καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Επιπλέον, ένα τεράστιο ευχαριστώ αξίζει στην μεταπτυχιακή φοιτήτρια Σουιλεμέζη Σταυρούλα, για όλη την καθοδήγηση, την απεριόριστη υπομονή, γνώση και βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας. Η συμβολή της ήταν καθοριστική και η βοήθεια της ανεκτίμητη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την ομαλή συνεργασία κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τα αδέρφια μου, για την συνεχή στήριξη, την υπομονή και την βοήθεια που μου παρείχαν κατά την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής αλλά και κατά την διάρκεια της φοίτησης μου στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας που συνέβαλαν στην εκπλήρωση των στόχων μου. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω και τους φίλους μου, για την απεριόριστη υπομονή και συμπαράσταση όλα αυτά τα χρόνια.

Πίνακας περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5

ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Μεταγραφικοί παράγοντες (Transcription factors).....	7
1.1.1 Γενικά.....	7
1.1.2 Διαχωρισμός των μεταγραφικών παραγόντων με βάση την δομή τους	8
1.1.3 Μηχανισμός Δράσης μεταγραφικών παραγόντων	10
1.2 Μεταγραφικός παράγοντας p53	12
1.2.1 Γενικά.....	12
1.2.2 Δομή p53 και ισομορφές	13
1.2.3 Δράση – Διαφοροποίηση και γήρανση	15
1.3 Μεταγραφικός παράγοντας p65	15
1.3.1 Γενικά.....	15
1.3.2 Δομή p65 και ισομορφές	16
1.3.3 Δράση – Inflammageing	17
1.4 Πυροσταφυλική αφυδρογονάση (Pyruvate Dehydrogenase, PDH)	18
1.4.1 Γενικά.....	18
1.4.2 Δομή της PDH.....	20
1.4.3 Δράση της PDH, όσον αφορά την γήρανση.....	21
1.5 Μυϊκά Κύτταρα C2C12.....	21
1.6 Γήρανση και D-galactose (D-gal)	21
1.6.1 Γενικά για γήρανση και D γαλακτόζη (D-galactose).....	21
1.6.2 Φυσική γήρανση	22
1.6.3 Επαγόμενη γήρανση.....	23
1.7 Dexamethazone (Dex).....	25
1.7.1 Γενικά.....	25
1.7.2 Δράση.....	25
2. ΣΚΟΠΟΣ	26
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
3.1 Οργανολογία.....	27
3.2 Υλικά.....	28
3.3 Τεχνικές	33
3.3.1 MTT assay	33
3.3.2 Ξεπάγωμα κυττάρων.....	34
3.3.3 Θρυψινοποίηση κυττάρων	34
3.3.4 Επιστροφή κυττάρων	34
3.3.5 Μελέτη επίδρασης D-galactose και Dexamethasone στα C2C12 κύτταρα.....	35
3.3.6 Συλλογή (Harvest) κυττάρων.....	35
3.3.7 Λύση κυττάρων	36
3.3.8. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών και προετοιμασία δειγμάτων για την ανοσοαποτύπωση κατά Western	36

3.3.9. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....	37
3.3.10. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot).....	37
3.3.11. Στατιστική Ανάλυση.....	39
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
4.1 MTT assay.....	39
4.2 Επίδραση της γήρανσης στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων p53 και p65 και της PDH σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα μυϊκών κυττάρων C2C12 41	
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γήρανση των κυττάρων αποτελεί μια μη αντιστρεπτή διαδικασία η οποία αποτελείται από πολλά στάδια και επηρεάζεται από αρκετούς παράγοντες, με αποτέλεσμα την μείωση της ικανότητας διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η προσθήκη κατάλληλων συγκεντρώσεων D-galactose φαίνεται να σχετίζεται με επαγωγή γήρανσης καθώς προκαλεί οξειδωτικό στρες και φλεγμονή με ανάλογο τρόπο με την φυσική γήρανση επιτρέποντας μας να πραγματοποιήσουμε επιθυμητές μελέτες.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη βασικών μορίων, τα οποία εμπλέκονται σε βασικές βιοχημικές πορείες, που επηρεάζονται άμεσα κατά την γήρανση. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι μεταγραφικοί παράγοντες p53 και p65, που εμπλέκονται σε μηχανισμούς ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και ανοσολογικών αποκρίσεων, αντίστοιχα, καθώς και το ένζυμο πυροσταφυλική αφυδρογονάση PDH, κομβικό σημείο ελέγχου του ενεργειακού μεταβολισμού σε μυϊκά κύτταρα C2C12 σε καλλιέργεια, στα οποία είχε επαχθεί γήρανση μέσω D-galactose. Ακόμη, μελετήθηκε και η επίδραση του συνθετικού γλυκοκορτικοειδούς, Dexamethasone (DEX) στα παραπάνω μόρια.

Η βιωσιμότητα των κυττάρων αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία MTT, ενώ οι μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων των παραγόντων p53 και p65 καθώς και του ενζύμου PDH μετά από προσθήκη 30mg/ml ή 40mg/ml D-galactose για 24 ή 48 ώρες, προσδιορίστηκαν με εφαρμογή Western blotting. Από τη δοκιμασία MTT προέκυψε μια δόσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ της βιωσιμότητας των κυττάρων και της D-galactose καθώς όσο αυξανόταν η συγκέντρωση της D-galactose τόσο μειωνόταν η κυτταρική βιωσιμότητα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το Western Blotting, έδειξαν αύξηση των επιπέδων των υπό μελέτη πρωτεϊνών, υποδεικνύοντας την ενεργοποίηση μονοπατιών που σχετίζονται με κυτταρικό πολλαπλασιασμό, φλεγμονή και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Η προσθήκη της Dexamethasone, οδηγεί σε μερική αποκατάσταση των επιπέδων των p53, p65 και PDH, επιβεβαιώνοντας την αντιφλεγμονώδη και ρυθμιστική της δράση στον ενεργειακό μεταβολισμό και ανάπτυξη των κυττάρων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης προσφέρουν σημαντικές ενδείξεις για το ρόλο των συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων στη μυϊκή γήρανση και ενισχύουν την ανάγκη περαιτέρω έρευνας για τη στοχευμένη αντιμετώπιση των μοριακών διαταραχών που σχετίζονται με αυτήν.

ABSTRACT

Cellular aging is an irreversible process composed of multiple stages and influenced by several factors, ultimately resulting in the reduction of the cells ability to differentiate and proliferate. The administration of D-galactose at certain concentrations appears to be associated with the induction of senescence, as it causes oxidative stress and inflammation in a manner analogous to natural aging, thus allowing the conduction of targeted studies.

In the present study, key molecules, regulators of crucial biological processes affected by aging were investigated. Specifically, the transcription factors p53 and p65 were studied, which are involved in the regulation of the cell cycle and immune responses, respectively, as well as the enzyme pyruvate dehydrogenase (PDH), a pivotal checkpoint in the regulation of energy metabolism. These were examined

in cultured C2C12 muscle cells in which aging was induced through D-galactose administration. Additionally, the effect of the synthetic glucocorticoid Dexamethasone (DEX) on the molecules was also examined.

Cell viability was assessed using the MTT assay, while changes in the protein levels of the factors p53 and p65, as well as the PDH enzyme, following the administration of 30 mg/ml or 40 mg/ml D-galactose for 24 or 48 hours, were determined via Western blotting. The MTT assay revealed a dose-dependent correlation between cell viability and D-galactose concentration. Specifically, increased concentration of D-galactose led to decreased in cell viability/growth. Results from Western blotting demonstrated an upregulation of the protein levels of p53, p65 and PDH, indicating activation of pathways related to cell growth, inflammation, and mitochondrial dysfunction. The administration of Dexamethasone led to a partial recovery of the p53, p65, and PDH protein levels, confirming its anti-inflammatory and regulatory effects on cell growth and energy metabolism.

The findings of this study provide significant evidence for the role of the certain transcription factors in muscle aging and reinforce the need for further research targeting the molecular disruptions associated with this process.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεταγραφικοί παράγοντες (Transcription factors)

1.1.1 Γενικά

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι μια θεμελιώδης διαδικασία, απαραίτητη για όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς καθώς μέσω αυτής μεταφέρεται η γενετική πληροφορία, επιτυγχάνεται η κυτταρική διαφοροποίηση και διατηρείται η ομοιόσταση και η κυτταρική λειτουργία. Οι κύριοι ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι επάγουν ή καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων. (Mitsis et al, 2020).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες (Transcription Factors, TFs) είναι πρωτεΐνες οι οποίες έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται κοντά ή μακριά από τους υποκινητές των γονιδίων-στόχων και ελέγχουν την χρωματίνη και τη μεταγραφή μέσω της δημιουργίας ενός

περίπλοκου συστήματος-συμπλόκου της μεταγραφής, το οποίο μπορεί και ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση. (Lambert et Al, 2018).

Μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες, βλάβες στους ίδιους τους μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και δυσλειτουργίες στη ρύθμιση τους έχουν συνδεθεί άμεσα με διάφορους τύπους καρκίνου, με αυτοάνοσα νοσήματα, νευρολογικές ασθένειες, αναπτυξιακά σύνδρομα, διαβήτη, καρδιαγγειακές ασθένειες (Lee et al, 2013) καθώς και πρόωρη κυτταρική γήρανση (Tilstra et al, 2012).

1.1.2 Διαχωρισμός των μεταγραφικών παραγόντων με βάση την δομή τους

Οι μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούν μόρια τα οποία εμπλέκονται σε ποικίλες διαδικασίες μέσα στα κύτταρα και είναι απαραίτητοι για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Μέχρι και σήμερα, έχουν ανακαλυφθεί περίπου 1.600 διαφορετικοί μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι όμως εμφανίζουν μεταξύ τους αρκετές ομοιότητες σε δομικό επίπεδο διευκολύνοντας έτσι τον διαχωρισμό τους καθώς και την κατανόηση των λειτουργιών τους. (Soto et al, 2022).

Η πλειοψηφία των μεταγραφικών παραγόντων διαθέτει δύο χαρακτηριστικούς τύπους περιοχών για να μπορούν να εκτελέσουν τις απαραίτητες δράσεις τους. Οι περιοχές αυτές είναι η περιοχή δέσμευσης του DNA (DNA-Binding Domain, DBD) καθώς και η εκτελεστική περιοχή (Effector Domain, ED). (Soto et al, 2022).

Η περιοχή δέσμευσης του DNA (DBD), είναι η πιο χαρακτηριστική περιοχή η οποία περιλαμβάνεται σε έναν μεταγραφικό παράγοντα και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές περιοχές στο γονιδίωμα, όπως είναι οι υποκινητές και οι ενισχυτές μεταγραφής. Η συγκεκριμένη περιοχή χαρακτηρίζεται από υψηλή εξελικτική συντήρηση και αποτελεί κριτήριο για την ταξινόμηση των μεταγραφικών παραγόντων σε διάφορες οικογένειες. Οι οικογένειες αυτές παρουσιάζονται παρακάτω στον πίνακα 1.

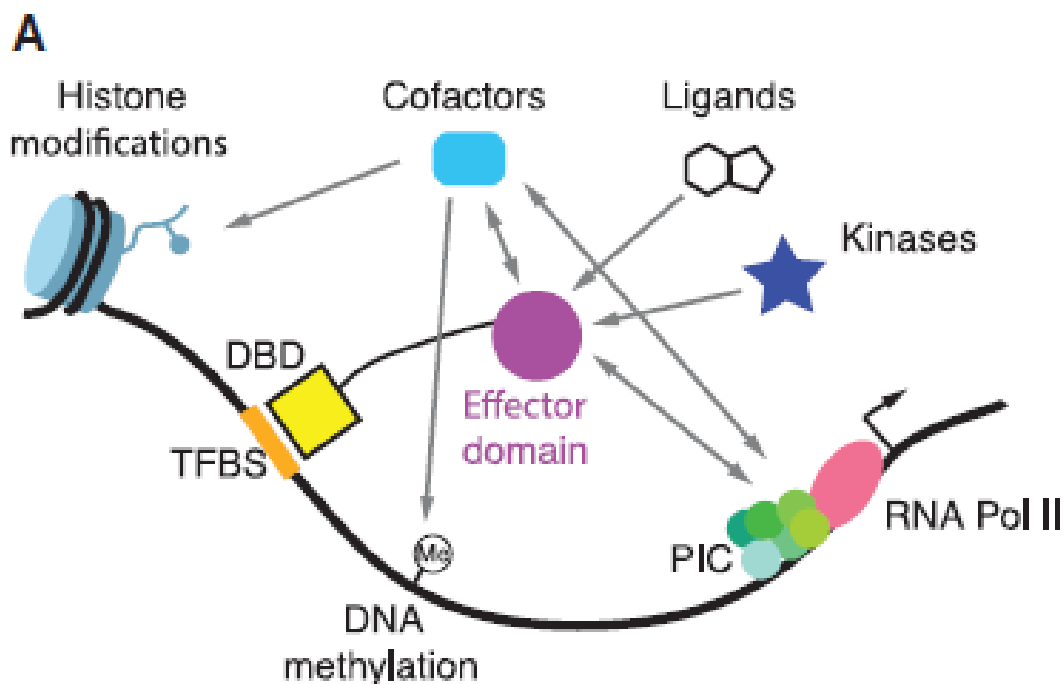
Πίνακας 1: Οι κύριες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων με βάση τη δομή της περιοχής δέσμευσης του DNA

Οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων	Δομή της περιοχής πρόσδεσης DNA (DBD)
Μεταγραφικοί παράγοντες με δακτύλους Ψευδαργύρου (Zinc Finger Domains)	Περιλαμβάνει ιόντα ψευδαργύρου (Zn^{2+}) τα οποία σταθεροποιούν πρωτεϊνικές δομές που μοιάζουν με δάχτυλα διευκολύνοντας έτσι την πρόσδεση στο DNA. Οι συγκεκριμένες δομές είναι αυτές που συναντώνται πιο συχνά στους μεταγραφικούς παράγοντες.

Μεταγραφικοί παράγοντες που φέρουν δομή έλικα - βρόχος - έλικα (Helix – Turn – Helix, HTH)	Αποτελεί από τις πιο διατηρημένες περιοχές πρόσδεσης DNA. Αποτελείται από δύο α-έλικες οι οποίες διαχωρίζονται από έναν βρόγχο. Η δεύτερη έλικα είναι αυτή που εισέρχεται στην διπλή έλικα του DNA και καθορίζει την εξειδίκευση του μεταγραφικού παράγοντα.
Μεταγραφικοί παράγοντες με βασικά φορτισμένη περιοχή και μοτίβο έλικα-βρόχος – έλικα (Basic Helix - Loop – Helix, bHLH)	Περιλαμβάνει μια βασική περιοχή που αναγνωρίζει την κατάλληλη αλληλουχία DNA και δύο έλικες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με ένα loop.
Μεταγραφικοί παράγοντες με βασικά φορτισμένη περιοχή και φερμουάρ λευκίνης (Basic Leucine Zipper, bZIP)	Περιλαμβάνει μια βασική περιοχή που αναγνωρίζει την κατάλληλη αλληλουχία DNA και κατάλοιπα λευκίνης κάθε 7 αμινοξέα.
Μεταγραφικοί παράγοντες με Wings Helix Domain	Περιλαμβάνει τρεις α-έλικες και δύο πτυχωτά φύλλα τα οποία σταθεροποιούνται μεταξύ τους μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η αναγνώριση της αλληλουχίας DNA γίνεται από την τρίτη α-έλικα.
Υπεροικογένεια πυρηνικών υποδοχέων (Nuclear Receptor superfamily)	Περιλαμβάνουν δύο Zinc Finger domains καθώς μια περιοχή αλληλεπίδρασης με προσδέτη (Ligand Binding Domain, LBD) και περιοχές αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (AF domains)

Η εκτελεστική περιοχή (Effector Domain, ED) είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως είναι οι αλληλοεπιδράσεις με συνπαράγοντες ενζύμων, με ένζυμα ή και με μεσολαβητές οδηγώντας έτσι σε αλλαγές στις ιστόνες, αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης του DNA καθώς και στρατολόγηση της RNA pol II.

Οι ED χωρίζονται σε 3 βασικές κατηγορίες. Τις περιοχές ενεργοποίησης (Activator Domain, AD), τις περιοχές καταστολής (Repressor Domain, RD) καθώς και τις περιοχές που έχουν διπλό ρόλο (Bifunctional Domain, Bif) όπου ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την γονιδιακή έκφραση ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και το αναπτυξιακό στάδιο. (Soto et al, 2022).



Εικόνα 1: Αλληλεπίδραση των εκτελεστικών περιοχών (ED) με συνπαράγοντες, προσδέτες και ένζυμα προκαλώντας αλλαγές στο DNA και την γονιδιακή έκφραση (Soto et al, 2022).

Κάποιοι λίγοι μεταγραφικοί παράγοντες διαθέτουν και κάποια επιπρόσθετα δομικά στοιχεία τα οποία τους παρέχουν μια περαιτέρω εξειδίκευση. Αυτές οι περιοχές μπορεί να είναι:

Περιοχές διμερισμού (Dimerization Domains), οι οποίες είναι απαραίτητες για τον διμερισμό ή ακόμα και των πολυμερισμό των μεταγραφικών παραγόντων επιτρέποντας έτσι την σωστή λειτουργία τους.

Ligand Binding Domains (LBDs), οι οποίες βρίσκονται κυρίως σε πυρηνικούς υποδοχείς και επιτρέπουν αλλαγές στην διαμόρφωση τους λόγω της σύνδεσης με τον κατάλληλο προσδέτη.

Nuclear Localization Signal (NLS), το οποίο λειτουργεί ως οδηγός και διευκολύνει την μεταφορά του μεταγραφικού παράγοντα στον πυρήνα όταν δοθεί το κατάλληλο σήμα. (Jin et al, 2010).

1.1.3 Μηχανισμός Δράσης μεταγραφικών παραγόντων

Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι ύψιστης σημασίας για την σωστή λειτουργία του κυττάρου και οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι αυτοί που παίζουν καθοριστικό ρόλο.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες ανάλογα με τη δράση τους μπορούν να χωριστούν σε δύο βασικούς τύπους, τους γενικούς και τους ειδικούς. Οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες είναι αυτοί οι οποίοι ελέγχουν την έναρξη της μεταγραφής και συμμετέχουν στην συναρμολόγηση του προεναρκτηρίου συμπλόκου, ενώ οι ειδικοί μεταγραφικοί παράγοντες σχετίζονται με τη ρύθμιση της έκφρασης σε συγκεκριμένα γονίδια ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ειδικών μεταγραφικών παραγόντων αποτελούν τόσο ο p53 όσο και

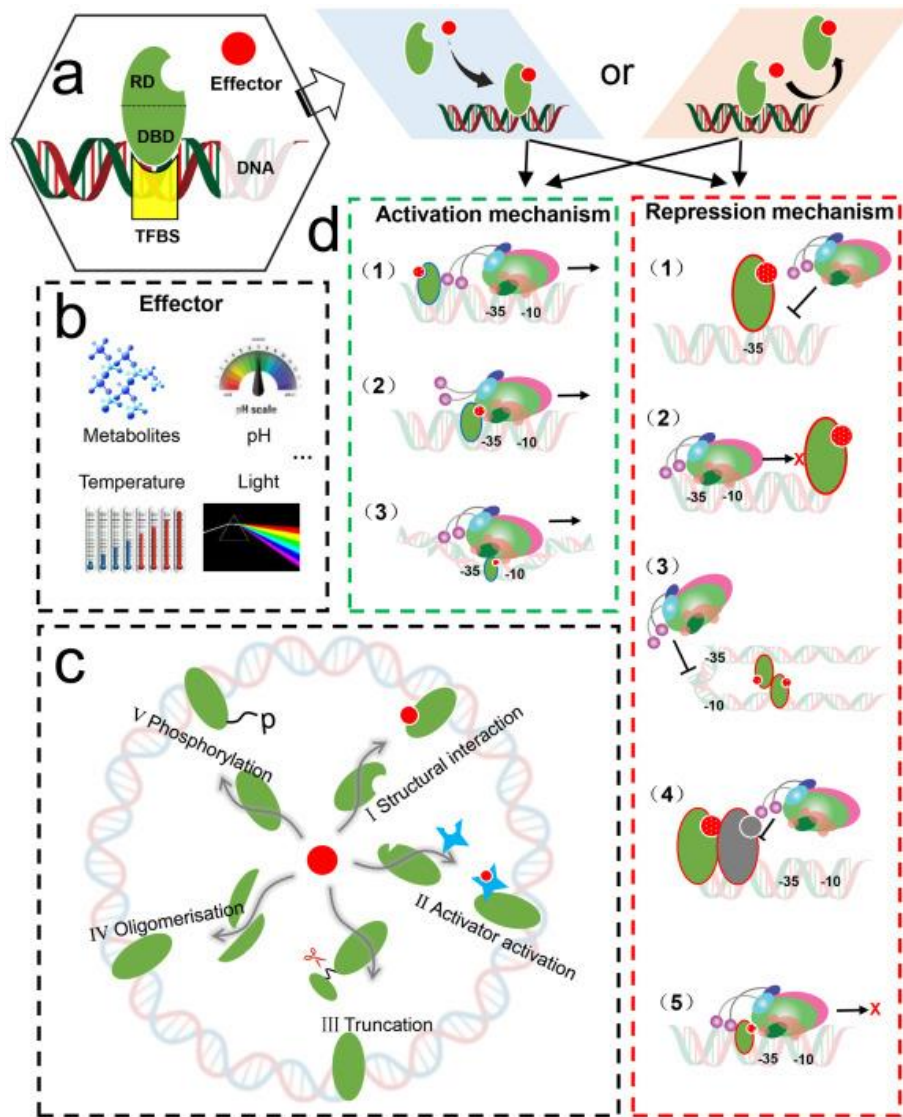
ο NF-κB, ο οποίος αποτελείται από δύο υπομονάδες p65 και p50, οι οποίοι σχετίζονται, μεταξύ άλλων, με διαφοροποίηση και φλεγμονή αντίστοιχα. (Vaquerizas et al, 2009).

Κατά τη διαδικασία της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, οι μεταγραφικοί παράγοντες αναγνωρίζουν στα γονίδια - στόχους συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA οι οποίες ονομάζονται θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (Transcription Factor Binding Site, TFBS), που συνήθως βρίσκονται κοντά στον υποκινητή του γονιδίου – στόχου. Υπεύθυνη για την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα στην θέση πρόσδεσης TFBS είναι η DBD περιοχή του παράγοντα. Από την άλλη πλευρά, όπως αναφέρθηκε ήδη στην προηγούμενη ενότητα, η ED περιοχή του μεταγραφικού παράγοντα είναι υπεύθυνη για την ανίχνευση του σήματος, το οποίο σήμα μπορεί να προκαλέσει την ενεργοποίηση ή την απενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα τροποποιώντας έτσι την ικανότητα πρόσδεσης στην TFBS περιοχή.

Στην περίπτωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης οι μεταγραφικοί παράγοντες επάγουν την στρατολόγηση της κατάλληλης RNA πολυμεράσης (RNA Pol) στον υποκινητή με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγραφής.

Στην περίπτωση της μεταγραφικής καταστολής οι μεταγραφικοί παράγοντες παρεμποδίζουν στερεοχημικά ή προσελκύουν καταστολείς αποτρέποντας την πρόσδεσης της RNA pol με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της μεταγραφής. (He et al, 2023).

Ο παραπάνω μηχανισμός συνοψίζεται στην εικόνα 2, στην οποία απεικονίζεται η δομή και η λειτουργία των μεταγραφικών παραγόντων καθώς και η αλληλεπίδρασή τους με σηματοδοτικά μόρια.



Εικόνα 2: Παρουσιάζονται: Α. Η τυπική δομή των μεταγραφικών παραγόντων, Β. Παραδείγματα σηματοδοτικών μορίων που επάγουν την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων. Γ. Η δράση των σηματοδοτικών μορίων στην ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων. Δ. Μηχανισμοί ενεργοποίησης και καταστολής των γονιδίων στόχων από τους μεταγραφικούς παράγοντες. (He et al, 2023).

1.2 Μεταγραφικός παράγοντας p53

1.2.1 Γενικά

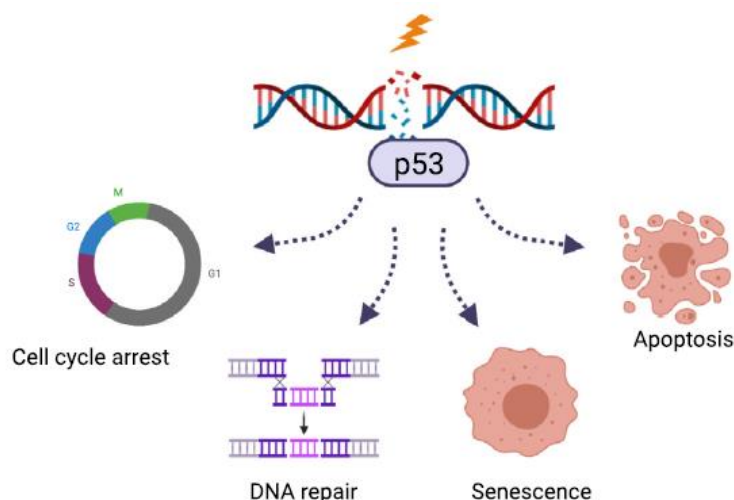
Ο p53 αποτελεί έναν από τους πιο γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες, ο οποίος έχει βασικό ρόλο στη διατήρηση της γενετικής σταθερότητας, στην επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA (DNA Damage Response, DDR) ενώ ταυτόχρονα δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο αποτρέποντας την εμφάνιση καρκίνου στα κύτταρα. Στην επιστημονική κοινότητα χαρακτηρίζεται από πολλούς ως "φύλακας του γονιδιώματος" (guardian of the genome) καθώς επιδρά σε

κρίσιμα σημεία του κυτταρικού κύκλου για να αποτρέψει και να περιορίσει την μεταφορά βλαβών στα θυγατρικά κύτταρα. (Kastenhuber et al, 2017).

Ο p53 είναι μέλος μιας οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων που περιλαμβάνει τα γονίδια p53, p63 και p73 και διαθέτουν όλα παρόμοια γονιδιακή δομή.

Η ενεργοποίηση του p53 προκαλείται από διάφορους παράγοντες, οι οποίοι σχετίζονται κυρίως με το στρες, όπως είναι οι βλάβες στη διπλή έλικα του DNA, το οξειδωτικό στρες, η υποξία κτλ. (Vaddavalli et al, 2022).

Το γονίδιο TP53 αποτελεί το γονίδιο με την υψηλότερη συχνότητα μεταλλάξεων σε περιπτώσεις καρκίνου στον άνθρωπο και η απώλεια λειτουργίας της συγκεκριμένης πρωτεΐνης έχει συσχετιστεί με κακοήθεια των όγκων. Οι μεταλλάξεις που υπόκειται ο p53 χωρίζονται σε 2 κύριες κατηγορίες, τις μεταλλάξεις που επηρεάζουν άμεσα την δέσμευση στο DNA και ονομάζονται DNA contact μεταλλάξεις και τις μεταλλάξεις που προκαλούν λανθασμένη αναδίπλωση της πρωτεΐνης και απώλεια της λειτουργικότητας της και ονομάζονται conformational μεταλλάξεις. Η απώλεια της λειτουργικότητας και δράσης του p53 καθώς και η ανικανότητα δέσμευσης στο DNA σχετίζονται με αποτυχία στην ενεργοποίηση των κατάλληλων γονιδίων στόχων και κατ' επέκταση σε καταστολή της αντικαρκινικής δράσης της πρωτεΐνης. (Vaddavalli et al, 2022).

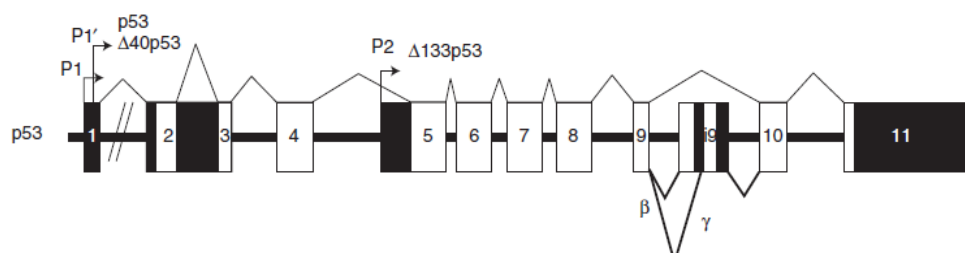


Εικόνα 3: Η δράση του p53 ως απόκριση στις βλάβες στο DNA μηχανισμών επιδιόρθωσης βλαβών DNA, απόπτωσης, γήρανσης και τερματισμό κυτταρικού κύκλου. (Vaddavalli et al, 2022).

1.2.2 Δομή p53 και ισομορφές

Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 είναι μια πρωτεΐνη που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην βιωσιμότητα του κυτάρου. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον μεταγραφικό παράγοντα p53 στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και πιο συγκεκριμένα στον μικρό βραχίονα (TP53, Gene ID: 7157). Το συγκεκριμένο γονίδιο αποτελείται από 11 εξόνια τα οποία παρεμβάλλονται από 10 ιντρόνια, ενώ το εξόνιο 1 δεν μεταγράφεται. Το συγκεκριμένο γονίδιο διαθέτει δύο λειτουργικούς υποκινητές, οι οποίοι λειτουργούν ανεξάρτητα, έναν στο εξόνιο 1 και έναν δεύτερο στο ιντρόνιο 4. Το ιντρόνιο 9 μπορεί να ματιστεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους με αποτέλεσμα να εκφράζονται πρωτεΐνες με διαφορετικό καρβοξυ-τελικό άκρο. Το ιντρόνιο 2 επίσης υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα με αποτέλεσμα να προκύπτουν πρωτεΐνες στις οποίες απουσιάζουν τα πρώτα 40 αμινοξέα. Έτσι,

συνολικά από το γονίδιο μπορούν να εκφραστούν 9 διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης : p53, p53b, p53g, D133p53, D133p53b, D133p53g, D40p53, D40p53b, and D40p53g οι οποίες όμως περιέχουν διαφορετικές περιοχές στην πρωτεΐνη λόγω του εναλλακτικού ματίσματος (Khoury et al, 2011).



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου TP53 στον άνθρωπο (Homo Sapiens). Το γονίδιο αποτελείται από 11 εξόνια και 10 ιντρόνια από τα οποία προκύπτουν πολλαπλές ισομορφές λόγω εναλλακτικού ματίσματος. (Khoury et al, 2011)

Παρά τις διαφορές στην τελική παραγόμενη πρωτεΐνη, όλες οι ισομορφές διαθέτουν μια χαρακτηριστική δομή η οποία αποτελείται από:

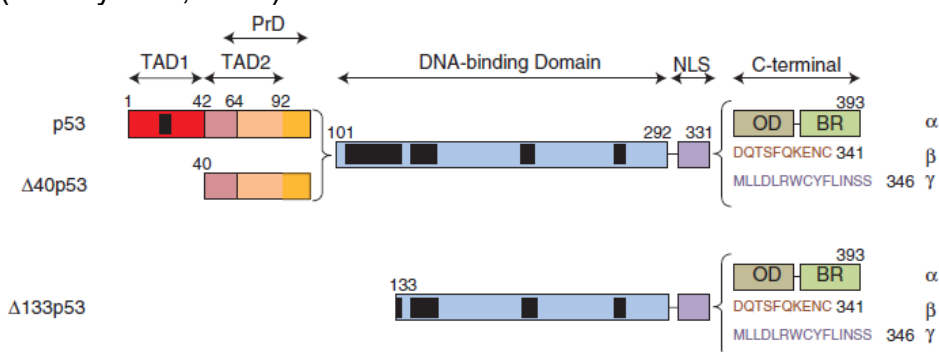
Μια περιοχή TAD (Transactivation Domain), στην οποία γίνεται η πρόσδεση των μεταγραφικών συμπαραγόντων καθώς και του παράγοντα MDM2 ο οποίος είναι υπεύθυνος για την αποικοδόμιση του p53.

Μια περιοχή πλούσια σε προλίνη, η οποία συμβάλλει στην σταθερότητα της πρωτεΐνης.

Μια περιοχή πρόσδεσης με το DNA (DNA Binding Domain, DBD), η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα σε κατάλληλες περιοχές DNA. Η συγκεκριμένη περιοχή είναι αυτή που υφίσταται την πλειοψηφία των μεταλλάξεων.

Μια περιοχή NLS (Nuclear Localization Signal), η οποία είναι υπεύθυνη για την μεταφορά της παραγόμενης πρωτεΐνης από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.

Μια καρβοξυ-τελική περιοχή η οποία αποτελεί στόχο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στην οποία περιλαμβάνονται μια περιοχή ολιγοδιμερισμού (Oligomerization Domain, OD) και μια βασική περιοχή (Basic Region, BR). (Khoury et al, 2011)



Εικόνα 5: Οι βασικές ισομορφές του παράγοντα p53 στον άνθρωπο (Homo sapiens). Οι ισομορφές μεταξύ τους διαφέρουν ως προς την παρουσία δομικών περιοχών. (Khoury et al, 2011).

1.2.3 Δράση – Διαφοροποίηση και γήρανση

Ο παράγοντας p53 αποτελεί βασικό μόριο στην απόκριση του κυττάρου σε στρεσογόνες καταστάσεις καθώς ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση, τον κυτταρικό κύκλο, την επιδιόρθωση του DNA (Huang et al., 2023), την διαφοροποίηση των κυττάρων και τη γήρανση (Vaddavalli et al., 2022). Το είδος και η διάρκεια της απόκρισης εξαρτώνται από το ερέθισμα, την ισομορφία του p53 που εκφράζεται και τον κυτταρικό τύπο (Vousden et al., 2009).

Όταν το p53 ενεργοποιείται λόγω παρατεταμένου ή ισχυρού σήματος, όπως είναι σε χρόνιο οξειδωτικό στρες ή σε μείωση του μήκους των τελομερών, τότε το κύτταρο οδηγείται σε γήρανση και όχι σε διαφοροποίηση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ROS, την ενεργοποίηση αποπτωτικών σημάτων και την καταστολή μονοπατιών του μεταβολισμού, όπως είναι το μονοπάτι του PGC-1α υπεύθυνο για τη βιογένεση των μιτοχονδρίων και την διατήρηση της ενεργειακής ομοιόστασης. Ακόμη, ισομορφές, όπως η p44 (Δ40p53) έχει αποδειχθεί πως επιταχύνουν τη γήρανση, επηρεάζοντας τη σηματοδότηση IGF-1/*PTEN* και οδηγώντας σε μειωμένο πολλαπλασιασμό και πρόωρη γήρανση σε μοντέλα ποντικών (Vaddavalli et al, 2022).

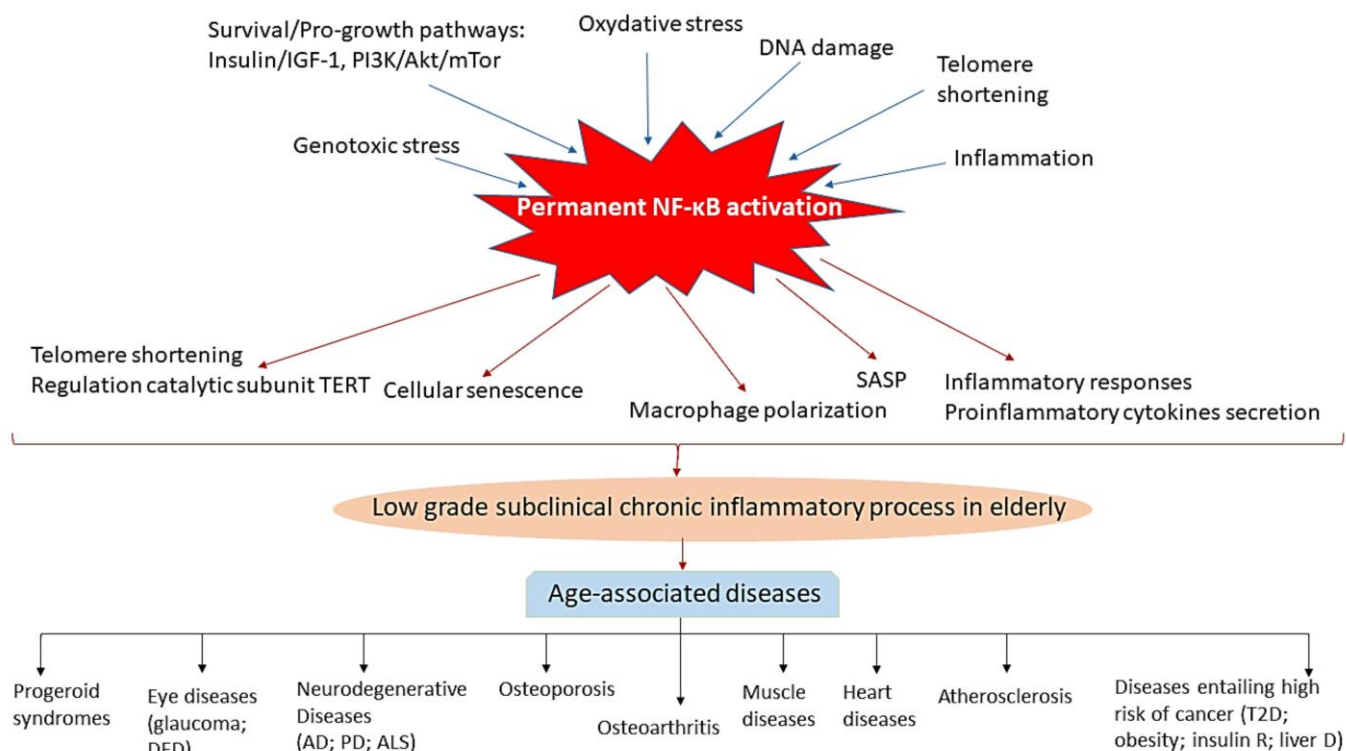
1.3 Μεταγραφικός παράγοντας p65

1.3.1 Γενικά

Ο p65, αποτελεί μια από τις βασικότερες υπομονάδες του παράγοντα NF-κΒ. Ο πυρηνικός παράγοντας NF-κΒ (Nuclear Factor kappa B) είναι μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και με την ενεργοποίηση του μεταφέρεται και δρα στον πυρήνα. Ως μεταγραφικός παράγοντας είναι υπεύθυνος για τη μεταγραφή γονιδίων και την ενεργοποίηση μηχανισμών σε κύτταρα, που σχετίζονται με την άμυνα έναντι φλεγμονής, όπως είναι τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα T- και B-λεμφοκύτταρα, καθώς και την απόπτωση (Giridharan et al, 2018).

Η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου παράγοντα επάγεται από διάφορους παράγοντες και κυτταρικά ερεθίσματα όπως είναι οι κυτοκίνες, το οξειδωτικό στρες, η μόλυνση από παθογόνα και οι βλάβες στο DNA. (Kannan et al, 2025).

Η απορρύθμιση του NF-κΒ φαίνεται πως σχετίζεται με πληθώρα ασθενειών που εμφανίζονται κυρίως κατά την γήρανση, όπως είναι τα αυτοάνοσα νοσήματα, η αρθρίτιδα, ο καρκίνος, το άσθμα και άλλα. (Kannan et al, 2025).



Εικόνα 6: Παρουσίαση των παραγόντων που προκαλούν συνεχή ενεργοποίηση του παράγοντα φλεγμονής NF-κΒ κατά την γήρανση. Παράγοντες όπως το οξειδωτικό στρες, οι βλάβες στο DNA, η μείωση του μήκους των τελομερών και η φλεγμονή ενεργοποιούν τον φλεγμονής NF-κΒ, ο οποίος με την σειρά του προκαλεί αλλαγές σχετιζόμενες με γήρανση όπως είναι η έκκριση κυτοκινών, η περαιτέρω μείωση κυτοκινών και άλλα. Οι παραπάνω αλλαγές προκαλούν την εμφάνιση χρόνιας φλεγμονής, η οποία οδηγεί σε ανάπτυξη ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία όπως είναι οι νευροεκφυλιστικές νόσοι και καρδιαγγειακές νόσοι, ο καρκίνος και άλλα. (García-García et al, 2021).

1.3.2 Δομή p65 και ισομορφές

Ο παράγοντας NF-κΒ είναι διμερές, όμο- ή ετεροδιμερές, το οποίο σχηματίζεται από πέντε πιθανές υπομονάδες στα θηλαστικά: το p65 (ή RELa), RELb c-REL, NF-κΒ1 (p105/p50) και NF-κΒ2 (p100/p52). Η πιο συχνή μορφή του NF-κΒ που συναντάται είναι το διμερές p65/p50. (Riedlinger et al, 2018).

Ο p65 κωδικοποιείται από το γονίδιο RELa το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 και συγκεκριμένα στο εξόνιο 13. Μπορεί να υποστεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση και ακετυλίωση, που επηρεάζουν τη δραστηριότητά του. Μέχρι σήμερα δεν έχουν καταγραφεί πολλές ισομορφές του p65 με ισχυρή λειτουργική διαφοροποίηση, ωστόσο μεταλλάξεις ή τροποποιήσεις της περιοχής TAD επηρεάζουν σημαντικά την απόκρισή του στο στρες και τη φλεγμονή. (RELa, Gene ID 5970).

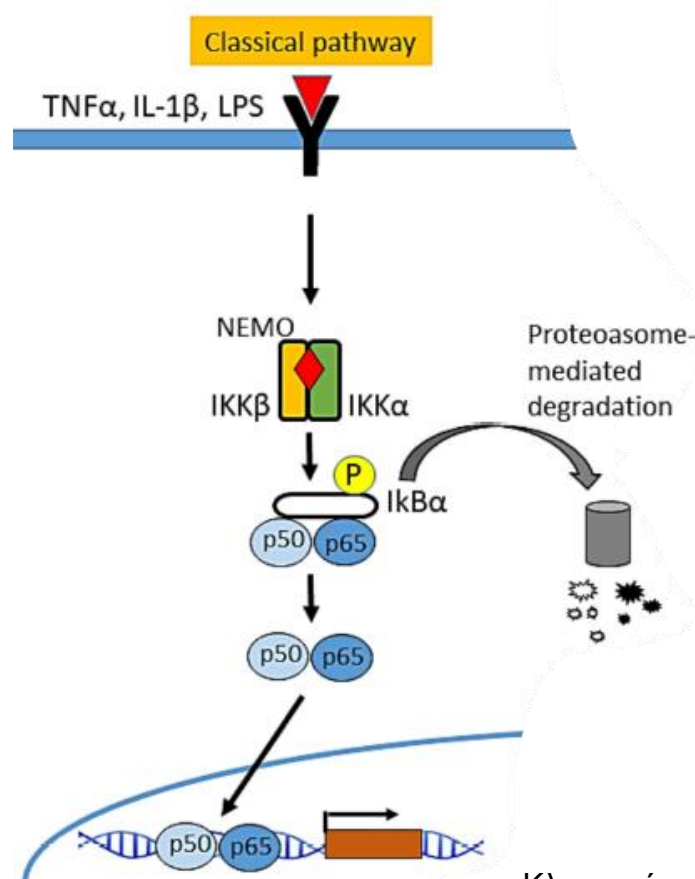
Το p65, το RELb και το c-REL έχουν μια συντηρημένη περιοχή RHD (REL Homology Domain), η οποία αποτελεί περιοχή πρόσδεσης DNA καθώς και μια περιοχή TAD (Trans-Activity Domain), η οποία βρίσκεται στο C-τελικό άκρο και είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. (Gilmore, 2006).



Εικόνα 7: Οι δομές των βασικών πρωτεϊνών που απαρτίζουν τον παράγοντα NF-κΒ. Η υπομονάδα p65 (RelA) αποτελείται από μια RHD περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA καθώς και μια TAD περιοχή που είναι υπεύθυνη για την μεταγραφική ενεργοποίηση (Gilmore, 2006).

1.3.3 Δράση – Inflammageing

Σε κατάσταση ηρεμίας, ο NF-κΒ βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή κατάσταση λόγω της σύνδεσής του με την πρωτεΐνη IκΒ, η οποία αποτρέπει την μεταφορά του στον πυρήνα. Όταν εμφανιστεί το κατάλληλο σήμα όπως είναι για παράδειγμα η έκκριση κυτοκινών ή το οξειδωτικό στρες, τότε ενεργοποιείται το σύμπλοκο κινάσων IKK, το οποίο φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη IκΒ επάγοντας έτσι την ουβικιτίνωση της και την μεταφορά της στο πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση. Έτσι, ο NF-κΒ είναι ελεύθερος και μεταφέρεται στον πυρήνα όπου αλληλοεπιδρά με κατάλληλες αλληλουχίες DNA και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων. (García-García et al, 2021).



Εικόνα 8: Κλασσικό μονοπάτι ενεργοποίησης και δράσης του παράγοντα p65 στο σύμπλοκο NF-κΒ. Παράγοντες όπως οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες και οι λιποσακχαρίτες (LPS), ενεργοποιούν τον σύμπλοκο κινάσων IKK το οποίο φωσφορυλιώνει και οδηγεί σε αποικοδόμηση τον IκΒ, αναστολέα του παράγοντα NF-κΒ με αποτέλεσμα την

ενεργοποίηση του, την είσοδο στον πυρήνα και την μεταγραφή γονιδίων-στόχων. (García-García et al, 2021).

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία σχετίζονται με τη γήρανση και φαίνεται πως αρκετά από αυτά σχετίζονται με την ενεργοποίηση του NF-κΒ, του οποίου βασική υπομονάδα αποτελεί το p65. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ύπαρξη σημάτων που αφορούν την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση, όπως είναι το μονοπάτι IGF-1 το οποίο ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K/AKT με αποτέλεσμα να επάγεται η μεταγραφή γονιδίων στόχων του NF-κΒ, ενώ ταυτόχρονα ενεργοποιείται και ο mTOR ο οποίος με την σειρά του ενεργοποιεί τον παράγοντα NF-κΒ. Ακόμη, βλάβες στο DNA καθώς και το οξειδωτικό στρες ενεργοποιούν τον NF-κΒ οδηγώντας σε γήρανση. Η μείωση του μήκους των τελομερών, που αποτελεί χαρακτηριστικό φαινόμενο κατά την γήρανση, φαίνεται να ρυθμίζεται μέσω ενός βρόγχου θετικής ανατροφοδότησης. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση του μήκους των τελομερών σχετίζεται με ενεργοποίηση του NF-κΒ και αύξηση της παραγωγής ελεύθερων αντιδραστικών/ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και του ενζύμου COX-II. Αντίστοιχα όμως, ο παράγοντας NF-κΒ επάγει την έκφραση της TERT, που αποτελεί υπομονάδα της τελομεράσης, ενισχύοντας έτσι την φλεγμονή κατά την γήρανση (inflammaging).

Συνολικά, ο NF-κΒ (p50/p65) επάγει γήρανση προκαλώντας αλλαγές, οι οποίες οδηγούν σε κυτταρική γήρανση (SASP senescence-associated secretory phenotype), απόπτωση και φλεγμονή. (García-García et al, 2021).

1.4 Πυροσταφυλική αφυδρογονάση (Pyruvate Dehydrogenase, PDH)

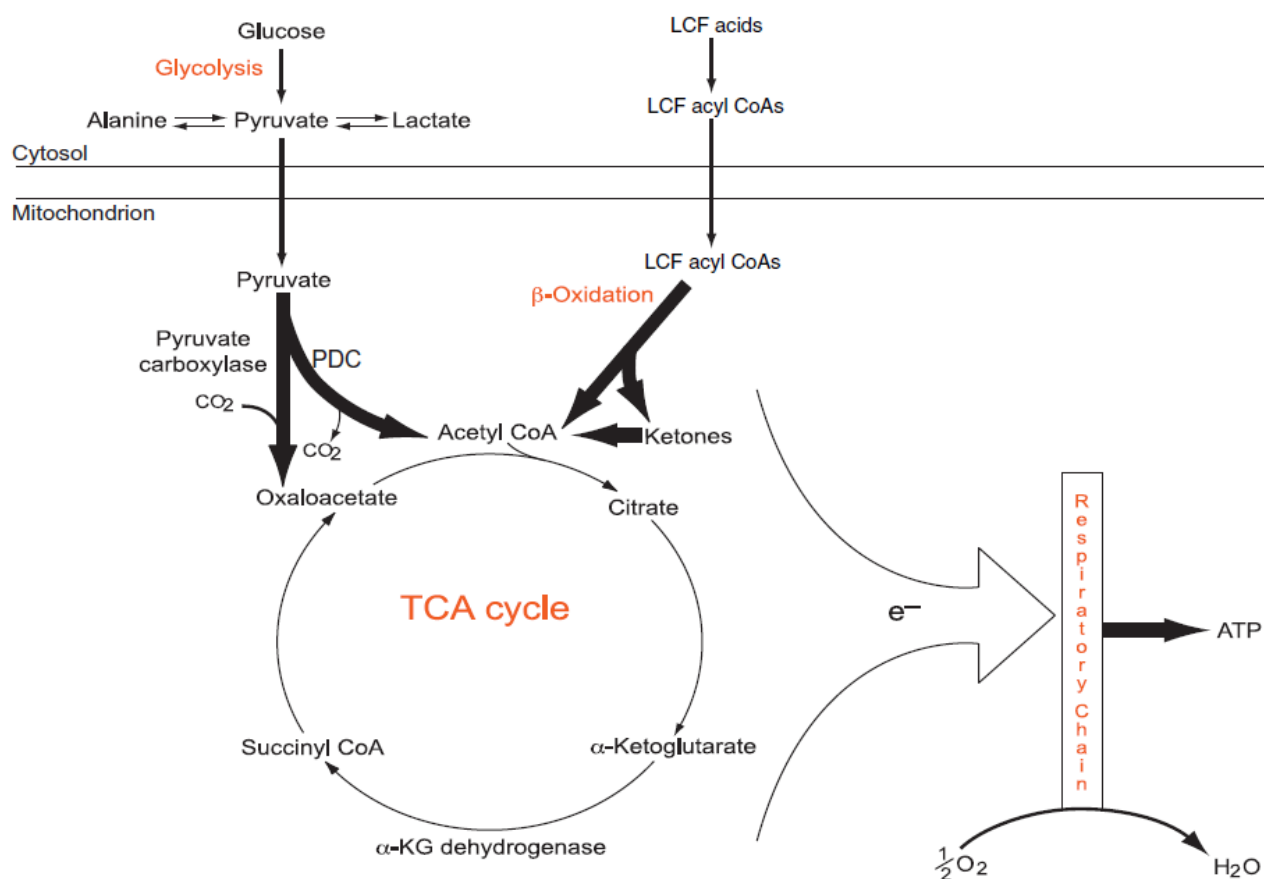
1.4.1 Γενικά

Η υπομονάδα E1 της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (Pyruvate Dehydrogenase-E1, PDH) αποτελεί ένα από τα ένζυμα του συμπλόκου της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (Pyruvate Dehydrogenase Complex, PDC) το οποίο είναι απαραίτητο για την σύνδεση της γλυκόλυσης με τον κύκλο του Krebs. Το ενζυμικό σύμπλοκο βρίσκεται στην μήτρα των μιτοχονδρίων και αποτελείται από 3 βασικά ένζυμα: την πυροσταφυλική αφυδρογονάση (E1), την διυδρολιπούλο τρανσακετυλάση (E2) και την διυδρολιπούλο αφυδρογονάση (E3). Πιο συγκεκριμένα, καταλύει την μη αντιστρεπτή αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος, που προκύπτει από την γλυκόλυση, σε ακέτυλο-coA, παράγοντας ταυτόχρονα CO₂ και NADH (Spriet et al, 2002). Για την δράση του ενζύμου απαιτούνται κάποιοι συμπαράγοντες και συγκεκριμένα απαιτείται η διφωσφορική θειαμίνη (TPP), το λιποϊκό οξύ, το νικοτινάμιδοαδενινονουκλεοτίδιο (NAD⁺), το φλαβινοαδενινοδινουκλεοτίδιο (FAD) και το συνένζυμο A (coA). Η δραστηριότητα του ενζύμου διαδραματίζει βασικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας υπό αερόβιες συνθήκες καθώς αποτελεί κρίσιμο σημείο της οξειδωτικής

μεταβολικής ροής και επιδρά άμεσα στην μεταβολική κατάσταση των κυττάρων. (Patel et al, 2014), (Stacpoole, 2012).

Η δραστηριότητα της PDH ελέγχεται αυστηρά από ένα σύνολο μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων και πιο συγκεκριμένα από φωσφορυλιώσεις και αποφωσφορυλιώσεις. Η φωσφορυλίωση της PDH πραγματοποιείται από ένα δίκτυο κινασών (Pyruvate Dehydrogenase Kinase, PDK), τις PDK1, PDK2, PDK3 και PDK4 και οδηγεί σε αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας. Τόσο το NADH όσο και το ακέτυλο-coA που παράγονται κατά την αντίδραση, επάγουν την δράση των κινασών PDKs ως μέσο αρνητικής ρύθμισης. (Kim et al, 2022). Αντίστοιχα, η αποφωσφορυλίωση της PDH πραγματοποιείται από φωσφατάσες (Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase, PDP), τις PDP1 και PDP2, οι οποίες επαναφέρουν την δραστηριότητα του ενζύμου (Spriet et al, 2002).

Η απορρύθμιση και η δυσλειτουργία της PDH φαίνεται να συνδέεται με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων με πιο χαρακτηριστικές την αντίσταση στην ινσουλίνη, την παχυσαρκία, τα καρδιαγγειακά και τα μεταβολικά νοσήματα, τις νευροεκφυλιστικές νόσους όπως τη νόσο Alzheimer καθώς και τον καρκίνο. (Patel et al, 2014).



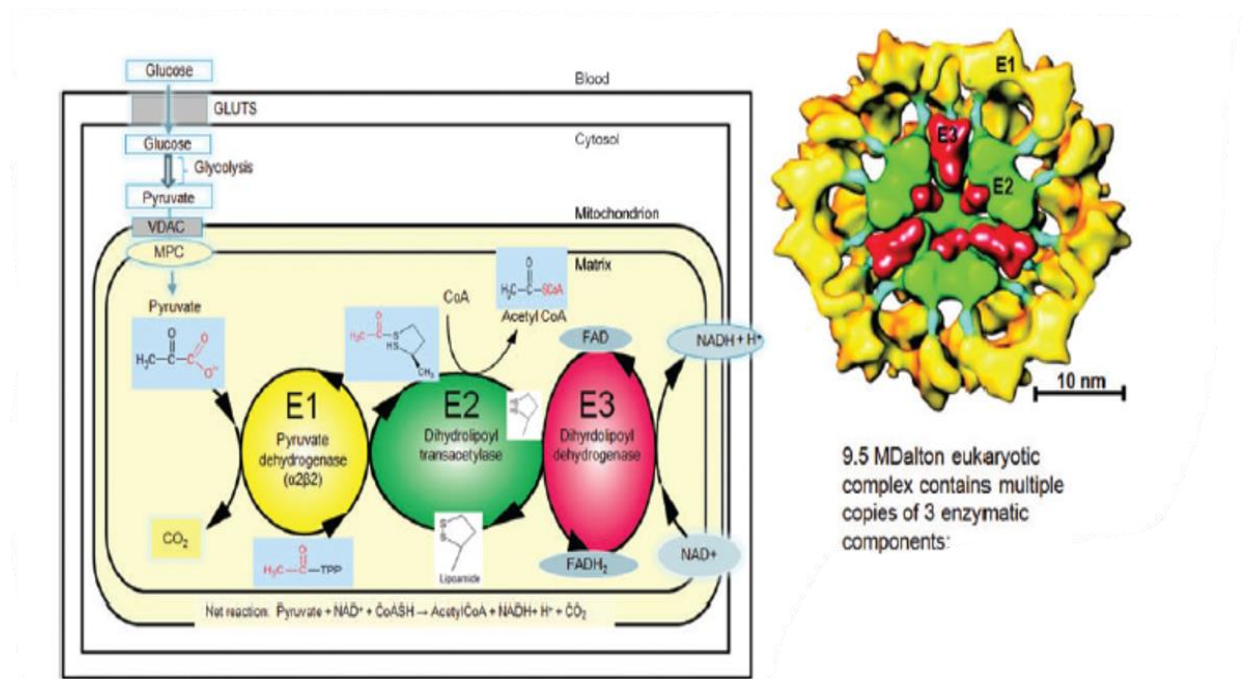
Εικόνα 9: Το πυροσταφυλικό, τελικό προϊόν της γλυκόλυσης, μεταφέρεται από το κυτταρόπλασμα στην μήτρα των μιτοχονδρίων, όπου μετατρέπεται σε ακέτυλο-coA από την PDH. Το ακέτυλο-coA με την σειρά του εισέρχεται στον κύκλο του Krebs συμβάλλοντας στην παραγωγή ενέργειας/ATP. (Stacpoole, 2017)

1.4.2 Δομή της PDH

Η πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH) αποτελεί ένα πολυενζυμικό σύμπλοκο, το οποίο έχει μοριακό βάρος 9.5 MDa και είναι ζωτικής σημασίας όσον αφορά τον ενεργειακό μεταβολισμό των κυττάρων. Η PDH είναι αυτή που συνδέει την γλυκόλυση με τον κύκλο του κιτρικού οξέος, μέσω της μη αντιστρεπτής μετατροπής του πυροσταφυλικού οξέος σε ακέτυλο-coA. (Stacropole, 2017)

Η δομή της PDH είναι αρκετά πολύπλοκη καθώς υπάρχει τεταρτοταγής οργάνωση λόγω της ύπαρξης των τριών βασικών υπομονάδων E1, E2, και E3. Συνολικά, το σύμπλοκο συνιστάται από πολλές πολυπεπτιδικές αλυσίδες καθώς αποτελείται από 24 μόρια E1, 24 μόρια E2 και 12 μόρια E3. (Zdanowicz et al, 2024)

Η υπομονάδα E1 ή η πυροσταφυλική αφυδρογονάση είναι ετεροτετραμερές, το οποίο αποτελείται από δύο α και δύο β υπομονάδες και χρησιμοποιεί την διφωσφορική θειαμίνη ως συμπάράγοντα για να γίνει ευκολότερα η αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού. Η υπομονάδα E2 ή η διυδρολιπούλο τρανσακετυλάση σχηματίζει το κέντρο/πυρήνα του συμπλόκου και είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά των ενδιάμεσων προϊόντων μεταξύ των τριών ενζύμων. Η υπομονάδα E3 ή η διυδρολιπούλο αφυδρογονάση είναι υπεύθυνη για την αναγέννηση του NAD^+ από NADH με αποτέλεσμα να λειτουργεί συνεχώς το ένζυμο. (Patel et al, 2014), (Zdanowicz et al, 2024).



Εικόνα 10: Αριστερά φαίνεται η σχηματική αναπαράσταση του μεταβολισμού της γλυκόζης σε πυροσταφυλικό και στην συνέχεια αναλυτικά η μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακέτυλο-coA από τα ένζυμα του PDC. Δεξιά παρουσιάζεται η δομή του πολυενζυμικού συμπλόκου (Stacropole, 2017)

1.4.3 Δράση της PDH, όσον αφορά την γήρανση

Παράγοντες όπως η γήρανση φαίνεται να επηρεάζουν την δραστικότητα της PDH. Σε πρόσφατες μελέτες έχει βρεθεί ότι κατά την γήρανση όπου το οξειδωτικό στρες είναι αυξημένο, η έκφραση του ενζύμου PDK4 αυξάνεται, με αποτέλεσμα την αυξημένη φωσφορυλίωση της PDH, η οποία οδηγεί σε μείωση της δραστικότητας του ενζύμου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να μειώνεται η μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακέτυλο-coA και άρα να μην υπάρχει επαρκής ποσότητα υποστρωμάτων στο κύκλο του Krebs οδηγώντας έτσι σε μειωμένη παραγωγή ATP και μιτοχονδριακή λειτουργία.(Kim, 2021).

Ακόμη, κατά την γήρανση παρατηρείται μειωμένη πρόσληψη ασβεστίου από τα μιτοχόνδρια κάτι το οποίο οδηγεί σε μείωση της δραστικότητας των φωσφατασών PDPs. Η μείωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα αντίστοιχα την μείωση της ενεργοποίησης της PDH οδηγώντας σε προβλήματα παρόμοια με πριν καθώς επίσης και σε σαρκοπενία, αυξημένο οξειδωτικό στρες και φλεγμονή.(Gherardi et al., 2024).

1.5 Μυϊκά Κύτταρα C2C12

Η κυτταρική σειρά C2C12 αποτελεί μια από τις πιο γνωστές και χρησιμοποιούμενες αθανатоποιημένες σειρές μυοβλαστών η οποία προέρχεται από μυοβλάστες ποντικού και πιο συγκεκριμένα από μυϊκό ιστό του μηριαίου μυ του ποντικού. Χρησιμοποιήθηκαν αρχικά από τους Yaffe και Saxel το 1977 με σκοπό την μελέτη της διαφοροποίησης στα μυϊκά κύτταρα. (Diokmetzidou et al, 2015)

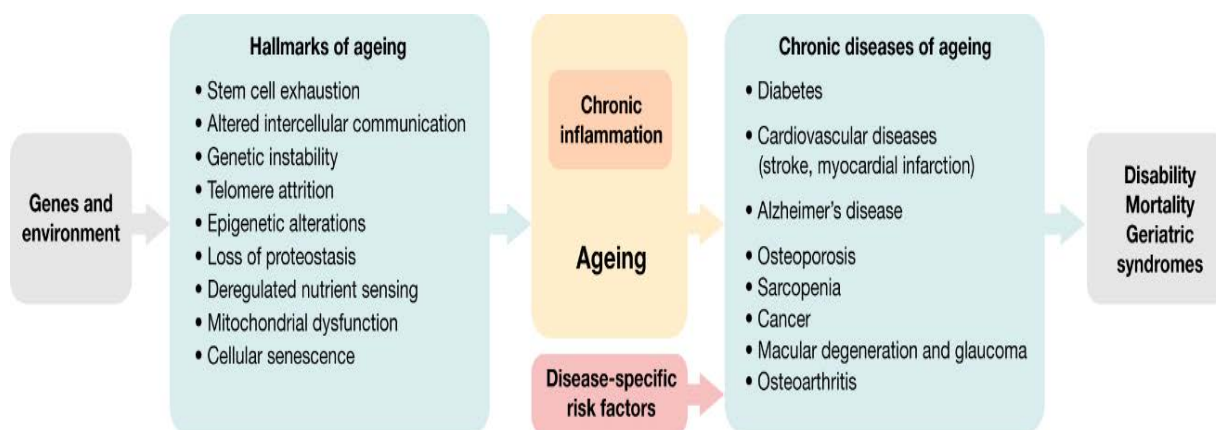
Τα συγκεκριμένα κύτταρα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται γρήγορα όταν το μέσο της καλλιέργειας έχει 2-10% ορό ενώ διαφοροποιούνται σε πολυπύρηνους μυοσωλήνες όταν βρίσκονται σε μέσα καλλιέργειας με χαμηλή συγκέντρωση ορού (2%). Όταν διαφοροποιούνται τα συγκεκριμένα κύτταρα εκφράζουν βασικούς ρυθμιστές της μυογένεσης όπως είναι η μυογενίνη (Myogenin), ο μυογόνος παράγοντας MyoD, και η βαριά αλυσίδα της μυοσίνης (Myosin Heavy Chain). Επιπλέον λόγω της φαινοτυπικής σταθερότητας που παρουσιάζουν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλο για μελέτη φλεγμονής, επαγόμενο στρες, γήρανση και μεταβολικές ή μιτοχονδριακές διαταραχές (ECACC, 2025).

1.6 Γήρανση και D-galactose (D-gal)

1.6.1 Γενικά για γήρανση και D γαλακτόζη (D-galactose)

Η γήρανση είναι μια μη αναστρέψιμη διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζεται από πληθώρα βιολογικών και μοριακών αλλαγών που με την πάροδο του χρόνου οδηγούν στην απώλεια της ομοιόστασης και της λειτουργικότητας του οργανισμού. (Azman et al, 2019). Τα κύρια χαρακτηριστικά της γήρανσης

σχετίζονται με την αστάθεια του γονιδιώματος, την επιγενετική απορρύθμιση, τη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, τις βλάβες των πρωτεϊνών και την απορρύθμιση βασικών μεταβολικών και σηματοδοτικών μονοπατιών (López-Otín et al, 2013). Η γήρανση αποτελεί έναν από τους βασικότερους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση χρόνιων παθήσεων, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, οι νευροεκφυλιστικές νόσοι και τα μεταβολικά σύνδρομα. (López-Otín et al, 2013), (Campisi et al, 2019).



Εικόνα 11: Γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν χαρακτηριστικές διεργασίες που σχετίζονται με γήρανση και προκαλούν χρόνια φλεγμονή. Η χρόνια φλεγμονή οδηγεί στην εμφάνιση χρόνιων παθήσεων όπως είναι ο διαβήτης, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η σακτοπενία και άλλα (Campisi et al, 2019)

Τα μοντέλα γήρανσης χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, την φυσική γήρανση και την επαγόμενη γήρανση. Η φυσική γήρανση είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο καθώς απαιτεί πολύ χρόνο και έχει υψηλό κόστος. Η επαγόμενη γήρανση από την άλλη έχει ευκολότερη εφαρμογή καθώς μπορεί να πραγματοποιηθεί η μελέτη της σε μικρό χρονικό διάστημα. Η γήρανση μπορεί να επαχθεί με διάφορους τρόπους όπως είναι η προσθήκη υδροξυουρίας και η προσθήκη D-galactose για in vitro μελέτες. Η επαγωγή γήρανσης με D-galactose προτιμάται καθώς εμφανίζει τις λιγότερες παρενέργειες και υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης. (Azman et al, 2019).

Η D-galactose είναι ένα αναγωγικό σάκχαρο και συγκεκριμένα μια αλδοεξόζη, η οποία υπάρχει φυσιολογικά στον οργανισμό καθώς και σε διάφορα τρόφιμα όπως είναι τα γαλακτοκομικά, το βούτυρο, το μέλι και άλλα. Η ημερήσια συνιστώμενη δόση για έναν ενήλικα είναι 50g τα οποία απομακρύνονται από το σώμα μέσα σε 8 ώρες από την έναρξη της πέψης. Αυξημένη κατανάλωση D-galactose, φαίνεται ότι οδηγεί σε μετατροπή της σε αλδόζη και υπεροξειδίου του υδρογόνου με την βοήθεια του ενζύμου οξειδάση της γαλακτόζης με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS. (Azman et al, 2019)

1.6.2 Φυσική γήρανση

Η φυσική γήρανση αποτελεί μια σταδιακή και πολυπαραγοντική διαδικασία, η οποία διακρίνεται από συσσώρευση βλαβών σε μοριακό επίπεδο καθώς και από απουσία της ομοιόστασης του κυττάρου. (López-Otín et al, 2013).

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της γήρανσης είναι η συσσώρευση βλαβών στο γονιδίωμα και η απορρύθμιση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, γεγονός που οδηγεί σε γενετική αστάθεια και συμβάλλει στην εμφάνιση καρκινικών και εκφυλιστικών νόσων (Campisi, 2013).

Η γήρανση συνοδεύεται από επιγενετικές μεταβολές, όπως η υπομεθυλίωση του DNA και τροποποιήσεις ιστονών, που επηρεάζουν την έκφραση απαραίτητων γονιδίων για τη διατήρηση της κυτταρικής ταυτότητας (López-Otín et al., 2013). Παράλληλα, διαταράσσεται η λειτουργία των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής του ATP και την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), που προκαλούν περαιτέρω οξειδωτικές βλάβες σε DNA, λιπίδια και πρωτεΐνες (Bo-Htay C. et al, 2018)

Η γήρανση συνδέεται επίσης με απορρύθμιση της πρωτεόστασης, δηλαδή της ισορροπίας σύνθεσης, αναδίπλωσης και αποικοδόμησης των πρωτεϊνών. Η συσσώρευση λανθασμένων ή κατεστραμμένων πρωτεϊνών οδηγεί στη δυσλειτουργία κυττάρων και ιστών, αυξάνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης νευροεκφυλιστικών ασθενειών (López-Otín et al., 2013). Ένα ακόμα κρίσιμο χαρακτηριστικό είναι η εμφάνιση της κυτταρικής γήρανσης (senescence), μια μη αναστρέψιμη παύση του κυτταρικού κύκλου που συνοδεύεται από έκκριση φλεγμονωδών παραγόντων και πρωτεασών (SASP), δημιουργώντας ένα προ-φλεγμονώδες περιβάλλον (Campisi, 2013).

Η ενεργοποίηση μονοπατιών όπως p53/p21 και p16/Rb ευθύνεται για την επαγωγή της γήρανσης, ενώ η χρόνια καταστολή των SIRT1, AMPK και η υπερενεργοποίηση του mTOR επιδεινώνουν τη μεταβολική ανισορροπία και μειώνουν την αυτοφαγία, περιορίζοντας την απομάκρυνση των κατεστραμμένων κυττάρων και οργανιδίων (López-Otín et al., 2013).

Όσον αφορά τον οργανισμό στο σύνολο του, η φυσική γήρανση συνδέεται με μείωση της αναγεννητικής ικανότητας των ιστών, εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος (immunosenescence), εμφάνιση χρόνιας φλεγμονής (inflammaging), και αυξημένη επίπτωση καρδιαγγειακών, μεταβολικών και νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Azman, 2021). Ο συνδυασμός αυτών των βιολογικών παραμέτρων καθιστά τη γήρανση έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για νοσηρότητα και θνησιμότητα στον άνθρωπο.

1.6.3 Επαγόμενη γήρανση

Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια δείχνουν ότι η χορήγηση D-galactose σε κύτταρα προκαλεί κυτταρική γήρανση με μοριακά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά παρόμοια με την φυσική γήρανση. Πιο συγκεκριμένα, η επαγωγή γήρανσης με D-galactose σχετίζεται με αύξηση χαρακτηριστικών δεικτών γήρανσης όπως είναι τα προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGES), οι υποδοχείς των AGES (RAGES), η μείωση του μήκους των τελομερών, η δραστηριότητα της τελομεράσης, η αφυδρογονάση της σορβιτόλης (SDH), η αναγωγή της αλδόζης (AR) καθώς και η ενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με γήρανση, όπως είναι το p21, το p65 και άλλα. (Azman et al, 2019)

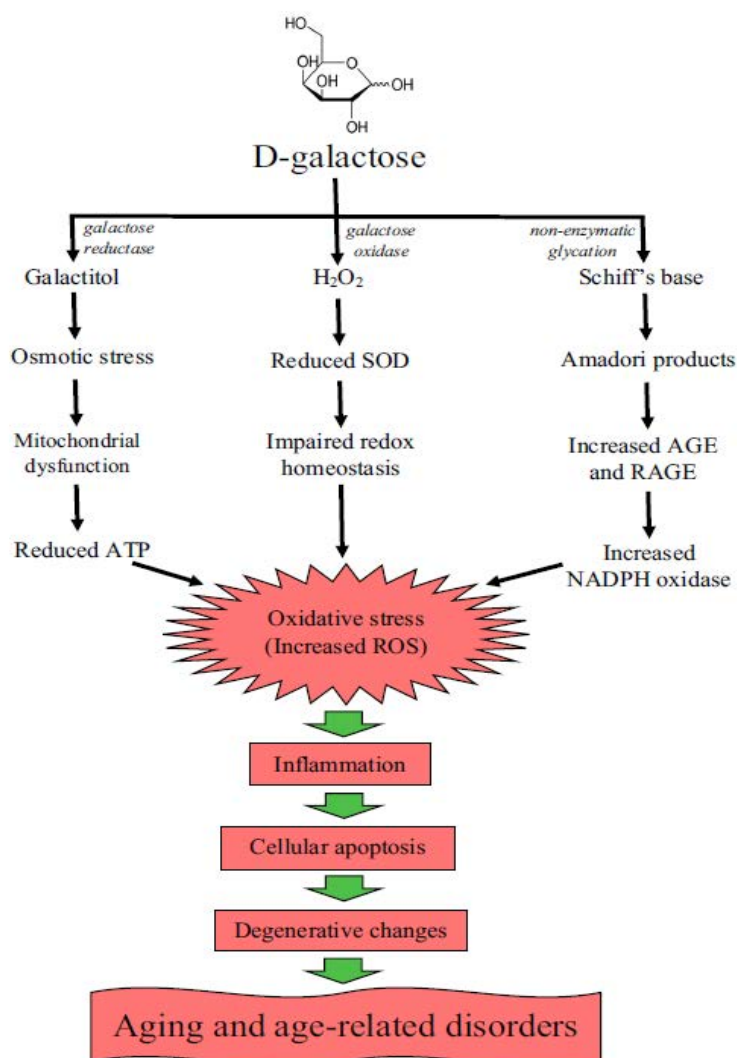
Πιο συγκεκριμένα, η περίσσεια της D-galactose μπορεί να ακολουθήσει 3 οδούς.

Στην πρώτη οδό, μπορεί να αναχθεί από το ένζυμο αναγωγάσης της γαλακτόζης και να προκύψει γαλακτιτόλη, η οποία προκαλεί ωσμωτικό στρες και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων με αποτέλεσμα την μείωση του διαθέσιμου ATP στο κύτταρο.

Στην δεύτερη οδό, μπορεί να οξειδωθεί από την οξειδάση της γαλακτόζης και να προκύψει υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο προκαλεί μείωση των επιπέδων ενός αντιοξειδωτικού ενζύμου, της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) με αποτέλεσμα τη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.

Στην τρίτη οδό, η D-galactose μπορεί να υποστεί μη ενζυμική γλυκοζυλίωση, που θα οδηγήσει σε παραγωγή AGEs, RAGEs καθώς και αυξημένη οξείδωση του NADPH.

Και στις 3 παραπάνω οδούς το τελικό αποτέλεσμα είναι η αύξηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) και του οξειδωτικού στρες που θα προκαλέσουν φλεγμονή. Η παρατεταμένη φλεγμονή με την σειρά της θα οδηγήσει σε απόπτωση και εκφυλισμό των κυττάρων με τελικό αποτέλεσμα την γήρανση. (Azman et al, 2019), (Wang et al, 2020).



Εικόνα 12: Πιθανός μηχανισμός δράσης της D-galactose στην επαγωγή γήρανσης. Η D-galactose μπορεί να μεταβολιστεί από διαφορετικά ένζυμα τα οποία θα προκαλέσουν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, διαταραχή οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης και αύξηση των AGEs και RAGEs. Τα παραπάνω οδηγούν σε αύξηση του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής με τελικό

αποτέλεσμα την γήρανση και την εμφάνιση νοσημάτων που σχετίζονται με την ηλικία (Azman et al, 2019)

1.7 Dexamethazone (Dex)

1.7.1 Γενικά

Η δεξαμεθαζόνη (dexamethasone) αποτελεί συνθετικό γλυκοκορτικοειδές, σημαντική ορμόνη με αντιφλεγμονώδη δράση η οποία ανήκει στην κατηγορία των γλυκοκορτικοειδών και ο χημικός της τύπος είναι 9-φθόρο-16-μεθυλοπρενδιζονόλη. Φαίνεται πως η δράση της είναι 25 έως 30 φορές πιο αυξημένη σε σχέση με την κορτιζόλη, ενώ δεν διαθέτει μεταλλοκορτικοειδή δράση. (B. Sinner, 2019)

Χρησιμοποιείται ευρέως κατά την θεραπεία διαφόρων νοσημάτων, όπως είναι τα αυτοάνοσα νοσήματα, οι φλεγμονώδεις νόσοι, οι αλλεργίες, διάφοροι τύποι καρκίνου καθώς και ο covid-19 (Madamsetty et al, 2022) ενώ τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται συχνά και για την καταπολέμηση της ναυτίας που προκαλείται μετά από κάποιο χειρουργείο ή κατά την διάρκεια των χημειοθεραπειών (B. Sinner, 2019).

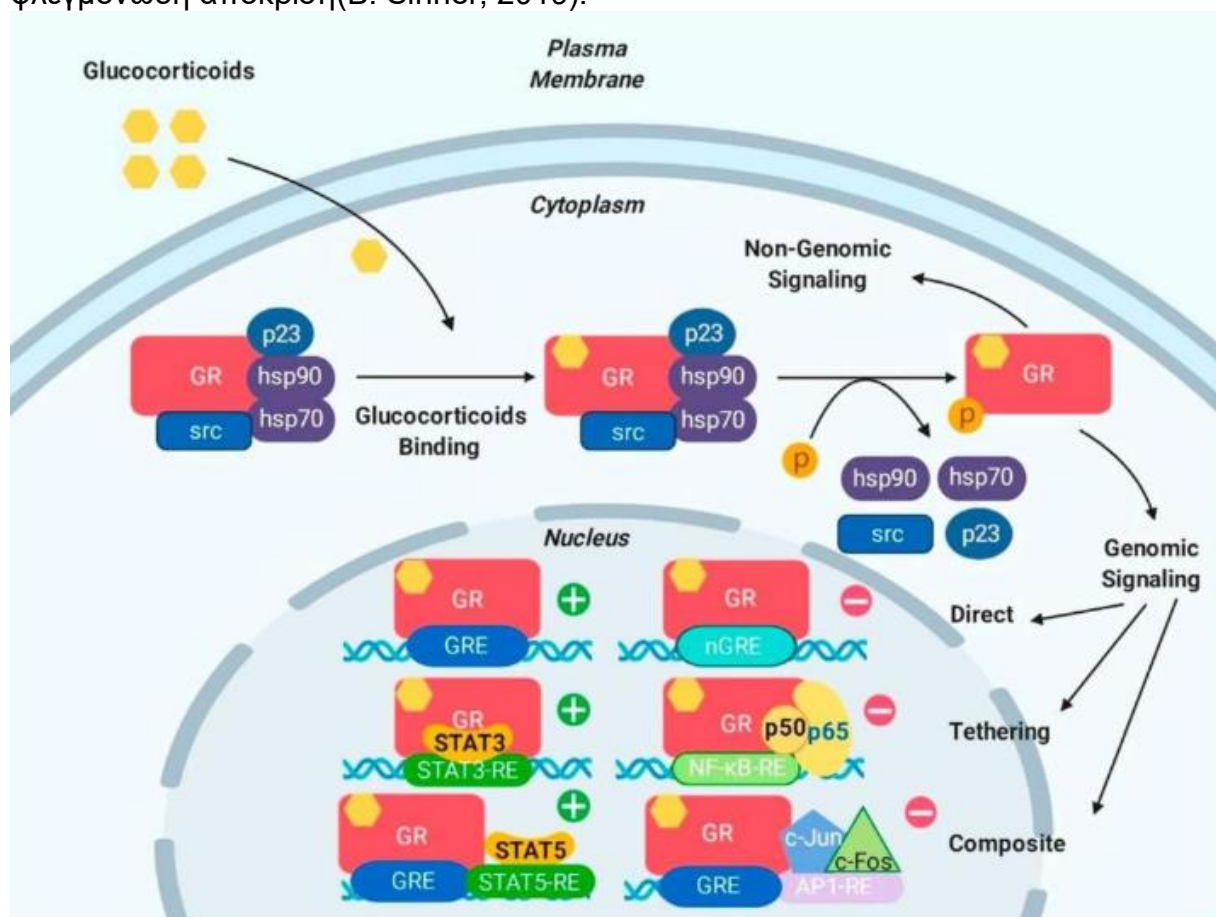
1.7.2 Δράση

Η dexamethasone αποτελεί ισχυρό γλυκοκορτικοειδές το οποίο έχει την ικανότητα να συνδέεται στους υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR). Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς αποτελούν μέλη της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων (Madamsetty et al, 2022) και βρίσκονται ελεύθεροι στο κυτταρόπλασμα σε ανενεργή κατάσταση στην πλειοψηφία των κυττάρων, όπως είναι τα μυϊκά, τα νευρικά, τα ηπατικά καθώς και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (B. Sinner, 2019).

Η σύνδεση των γλυκοκορτικοειδών με τους υποδοχείς τους, ενεργοποιεί την είσοδο τους εντός του κυττάρου, κάτι το οποίο πραγματοποιείται μέσω παθητικής μεταφοράς από την κυτταρική μεμβράνη. Για να γίνει η σύνδεση των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoids, GCs) με τον GR με υψηλή συγγένεια, πρέπει ο GR να αλληλοεπιδρά με πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat-shock proteins, HSPs). Η σύνδεση των GCs με τους GR οδηγεί σε απομάκρυνση των HSPs και αλλαγή στην δομή του υποδοχέα. Ανάλογα με την δράση του υποδοχέα (γενωμική ή μη γενωμική), μπορεί να ακολουθήσει η μεταφορά του στον πυρήνα όπου θα προσδεθεί σε κατάλληλες αλληλουχίες DNA που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements, GREs) και θα επηρεάσει την μεταγραφή γονιδίων στόχων (γενωμική δράση) ή μπορεί να μεταφερθεί σε άλλα υποκυτταρικά οργανίδια, όπως είναι τα μιτοχόνδρια και η κυτταρική μεμβράνη και να επηρεάσει σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με φλεγμονή, απόπτωση και μεταβολισμό. (Madamsetty et al, 2022)

Η dexamethasone ασκεί σημαντική δράση στο ανοσοποιητικό σύστημα επηρεάζοντας τα B και T λεμφοκύτταρα μέσω διακριτών μοριακών οδών. Στα B-λεμφοκύτταρα αυξάνει την έκφραση της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-10 ενώ καταστέλλει τη σηματοδότηση μέσω του Toll-like υποδοχέα 7 (TLR7). Στα T-

λεμφοκύτταρα, η dexamethasone ρυθμίζει την έκφραση κυτοκινών και τη σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα TCR (T cell receptor). Επιπλέον, έχει την ικανότητα να καταστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών όπως IL-1, IL-6, προσταγλανδίνη E2 και ισταμίνη. Ένας σημαντικός αντιφλεγμονώδης μηχανισμός περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση των GRs με μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι NF-κB και AP-1, οι οποίοι ρυθμίζουν μονοπάτια ενεργοποίησης σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Madamsetty et al, 2022). Αυτοί οι μηχανισμοί οδηγούν σε μεταγραφή αντιφλεγμονωδών πρωτεϊνών και ταυτόχρονα σε καταστολή προφλεγμονωδών γονιδίων, μειώνοντας τη φλεγμονώδη απόκριση (B. Sinner, 2019).



Εικόνα 13: Πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών στον υποδοχέα GR, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα και προσδένεται σε κατάλληλες αλληλουχίες DNA (GREs). Η πρόσδεση αυτή οδηγεί σε αλλαγές στην δομή του υποδοχέα που επιτρέπουν την γενωμική και μη γενωμική δράση του και οδηγούν στην μεταγραφή γονιδίων-στόχων. (Madamsetty et al, 2022).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Τα τελευταία χρόνια, γίνεται συνεχώς λόγος για γήρανση και την επίδραση της στον οργανισμό καθώς φαίνεται να αποτελεί έναν από τους βασικότερους παράγοντες για την εμφάνιση χρόνιων νοσημάτων. Πιο συγκεκριμένα, η μυϊκή γήρανση φαίνεται να μελετάται όλο και περισσότερο λόγω της συσχέτισης με περιορισμό της κινητικότητας καθώς και καρδιαγγειακά νοσήματα.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση των μεταβολών των επιπέδων μορίων που σχετίζονται με κυτταρικό πολλαπλασιασμό και φλεγμονή σε μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς C2C12, στα οποία έχει επαχθεί γήρανση με προσθήκη D-galactose σε κατάλληλες συγκεντρώσεις. Ειδικότερα, διερευνώνται μεταβολές στα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα p53, ο οποίος σχετίζεται με διαφοροποίηση, στον παράγοντα φλεγμονής NF-κB (υπομονάδα p65), καθώς και στην πυροσταφυλική αφυδρογονάση PDH, η οποία συνδέεται άμεσα με την παραγωγή ενέργειας από τα μιτοχόνδρια. Ακόμη, μελετήθηκε και η πιθανή δράση της dexamethasone, αντιφλεγμονώδης παράγοντας και ρυθμιστικό μόριο ενεργειακού μεταβολισμού, σε συνθήκες επαγόμενης γήρανσης. Μέσω της διερεύνησης των μεταβολών των προαναφερθέντων πρωτεϊνών μπορούμε να μελετήσουμε και να κατανοήσουμε περαιτέρω τους μηχανισμούς που διέπουν τη γήρανση, καθώς και τον τρόπο με τον οποίο εμπλέκονται και τροποποιούνται τα προς μελέτη μόρια κατά την γήρανση των μυϊκών κυττάρων σε καλλιέργεια δίνοντας έμφαση σε μονοπάτια, τα οποία σχετίζονται με κυτταρικό πολλαπλασιασμό, φλεγμονώδεις και μεταβολικές διαταραχές.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Οργανολογία

Για την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας και την διεξαγωγή των απαραίτητων πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές και τα εργαστηριακά όργανα που παρουσιάζονται παρακάτω στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Συσκευές και εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

Συσκευές – Εργαστηριακά όργανα	Εταιρία
Αναδευτήρας (Vortex)	Bio Vortex V1
Ανάστροφο Μικροσκόπιο	A. Kruss Optronic Germany

Αυτόματος Πιπεταδόρος	HTC Lab Solution
Απαγωγός/ Θάλαμος Κάθετης νηματικής ροής	Tel Star AV-30/70
Επωαστήρας Κυτταροκαλλιιεργειών	Thermo Electron Corporation
Ζυγός	Kern
Θερμαινόμενη πλάκα (Heat Block)	Kisker
Μαγνητικός αναδευτήρας (Stirrer)	Nuova Thermolyne
Οριζόντιος αναδευτήρας	Heidolph Rotamax
Πεχάμετρο	Metrohm 827 pH lab
Πιπέττες μέγιστου όγκου 2μl, 20μl, 200μl, 1000μl	LabNet, Eppendorf
Πλάκα Neubauer	HBG Germany
Πλαστική ράβδος (Scraper)	Thermo Fisher Scientific
Σκοτεινός θάλαμος (Dark Room) και σετ εμφάνισης μεμβρανών	W.B. Kodak
Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (transfer)	Biorad mini-trans Blot
Συσκευή ηλεκτροφόρησης	Biorad mini-PROTEAN tetra cell
Συσκευή υπερήχων (Sonicator)	Heischer Ultrasound Technology, model UP400S
Τροφοδοτικό	Wealtec Elite 200
Υδατόλουτρο	P. Selecta
Κυτταροκαλλιιεργειών	
Φασματοφωτόμετρο	Spectronic 20 GENESYSTEM
Φυγόκεντρος	Jouan BR4
Κυτταροκαλλιιεργειών	
Ψυχόμενη Φυγόκεντρος	Eppendorf5810R
Multidome Plate Reader	Enspire multimode plate reader

3.2 Υλικά

3.2.1 Αντιδραστήρια/Χημικά

Για την πραγματοποίηση όλων των απαραίτητων πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που παρουσιάζονται παρακάτω στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Αντιδραστήρια	Εταιρία
Αιθανόλη 100% (Ethanol 100%)	Sigma
Ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο 40% (Acrylamide/Bis 40%, Acr)	Bio-Rad
Αναστολείς πρωτεασών (Protease Inhibitors)	Roche
Αντιδραστήριο εμφάνισης σήματος (Developer)	Fuji

Αντιδραστήριο σταθεροποίησης σήματος (Fixer)	Fuji
Αντιδραστήριο Bradford 5X (Bradford 5X)	Bio-Rad
Άπαχο γάλα σε σκόνη (Skimmed milk powder)	Regilait
Βρωμίδιο του 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλοτετραζολίου [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]	Sigma
Γλυκίνη (Glycine)	Serva
Δεξαμεθαζόνη (Dexamethasone)	Sigma
Δείκτης μοριακού βάρους πρωτεϊνών (Protein ladder)	Proteintech
Διθειοθρεϊτόλη (Dithiothreitol, DTT)	Sigma
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl Sulfoxide, DMSO)	Sigma
Δωδεκυλοθειικό νάτριο [Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)]	Sigma
Θρυψίνη-EDTA 5% (10X) [Trypsin-EDTA 5% (10X)]	Gibco
Ισοπροπανόλη (Isopropanol)	Sigma
Μεθανόλη 100% (Methanol 100%)	Sigma
Ορός εμβρυϊκού βοός (Fetal Bovine Serum, FBS)	Gibco
Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη (pen/strep) (5000U/ml) [Penicillin/Streptomycin (pen/strep) (5000U/ml)]	Gibco
Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη [Tetramethylethylenediamine (TEMED)]	AppliChem
Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο [Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)]	Serva
Υδροχλωρικό οξύ (Hydrochloric acid, HCl)	Scharlau
Υπερθειικό αμμώνιο [Ammonium Persulfate (APS)]	Serva
Φαινυλομεθανσουλφονυλοφθορίδιο (PMSF) [Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)]	SERVA
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (PBS) (10X) [Phosphate Buffered Saline (PBS) (10X)]	Gibco
Bradford Protein Assay	Bio-Rad
D-γαλακτόζη (D-galactose)	Sigma

Enhanced ChemiLuminescence (ECL)	Santa Cruz
L-γλουταμίνη 200mM (100X) [L-glutamine 200mM (L-Gln) (100X)]	Gibco
Triton X-100	AppliChem
Tween 20	Sigma

3.2.2 Αναλώσιμα Υλικά

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα αναλώσιμα υλικά που αναφέρονται παρακάτω στον πίνακα 4.

Πίνακας 4: Αναλώσιμα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Αναλώσιμα υλικά	Εταιρία
Διηθητικά χαρτιά Whatman	Sigma
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (0,45 μM)	Amersham Protran
Πιάτα κυτταροαλλιέργειας 60x15 mm	Sarstedt
Πλαστικά σιφώνια μιας χρήσης (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Πλαστικά σωληνάρια erpendorf	Sarstedt
Πιπέτες γυάλινες Pasteur	Kimble
Ρύγχοι πιπετών (tips) (0,2-10 μl, 20-200 μl, 100-1000 μl)	Sarstedt
Σωληνάρια φυγοκέντρωσης τύπου Falcon (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Σωληνάρια βαθιάς κατάψυξης (cryovials) (1,5 ml)	Sarstedt
Τρυβλία κυτταροκαλλιιεργειών πολλαπλών θέσεων (96-well plates)	Sarstedt
Φιλμ ανίχνευσης σήματος	FUJI MEDICAL
Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων (T25, T75)	Sarstedt

3.2.3 Αντισώματα

Κατά την πραγματοποίηση της ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιήθηκαν πρωτογενή και δευτερογενή αντισώματα τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω στους Πίνακες 5 και 6

Πίνακας 5: Πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western

Αντίσωμα	Συγκέντρωση (v/v)	Οργανισμός Προέλευσης	Μοριακό Βάρος (kDa)	Εταιρεία
Anti-p53 (sc-98)	1:500	Mouse	53	Santa Cruise

Anti-p65 (sc-109)	1:500	Rabbit	65	Santa Cruise
Anti-PDH	1:500	Mouse	43	Santa Cruise
Anti-β-actin	1:2000	Mouse	42	Proteintech

Πίνακας 6: Δευτερογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western

Αντίσωμα	Συγκέντρωση (v/v)	Εταιρεία
Anti-Mouse IgG-HRP	1:50.000	Pierce Antibodies
Anti-Rabbit IgG-HRP	1:50.000	Pierce Antibodies

3.2.4 Θρεπτικά μέσα κυτταροκαλλιιεργειών

Για την ανάπτυξη των μυϊκών κυττάρων στην καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά μέσα που αναγράφονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των κυττάρων.

Θρεπτικά μέσα	Σύσταση
Πλήρες θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1X High Glucose with phenol red	Αποτελείται από 4,5 gr/l D-Glucose, L-Glutamate και phenol red στα οποία έχει γίνει προσθήκη 10% v/v FBS, 1% V/V L-Gln και 1% pen/strep. Η αποθήκευση του θρεπτικού γίνεται στους 4°C.
Πλήρες θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1X High Glucose without phenol red	Αποτελείται από 4,5 gr/l D-Glucose, L-Glutamate στα οποία έχει γίνει προσθήκη 10% v/v cis-FBS, 1% V/V L-Gln και 1% pen/strep. Η αποθήκευση του θρεπτικού γίνεται στους 4°C.

3.2.5. Παρασκευή διαλυμάτων

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα των οποίων η σύσταση παρουσιάζεται παρακάτω στον πίνακα 8.

Πίνακας 8: Σύσταση διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων.

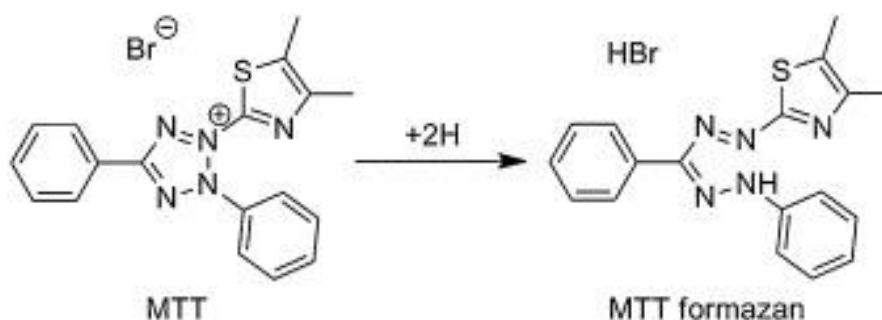
Διαλύματα	Σύσταση
Bradford solution 1X	Παρασκευάζεται με αραιώση του διαλύματος Bradford 5X με προσθήκη dH ₂ O.

Developer solution	Παρασκευάζεται με ανάμειξη 725 ml dH ₂ O, 250 ml διαλύματος Α και 25 ml διαλύματος Β.
Fixer Solution	Παρασκευάζεται με ανάμειξη 750 ml dH ₂ O, 225 ml διαλύματος Α και 25 ml διαλύματος Β.
Lysis buffer	Παρασκευάζεται με ανάμειξη 20mM Tris pH 7,5, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA και 0,5% v/v Triton X-100. Ακριβώς πριν την χρήση, γίνεται προσθήκη 1mM DTT, 0,1 mM PMSF και κατάλληλη συγκέντρωση protease inhibitors.
Running buffer 1X	Παρασκευάζεται με προσθήκη 10% v/v Running Buffer 10X και 0,1% v/v SDS σε dH ₂ O.
Running buffer 10X	Παρασκευάζεται με προσθήκη 14,4% w/v γλυκίνη και 3% w/v Tris σε dH ₂ O.
Sample buffer	Παρασκευάζεται με προσθήκη 10% v/v γλυκερόλη, 10% v/v SDS, 1% v/v μπλε της βρωμοφαινόλης και 1M Tris-HCl σε dH ₂ O. Το τελικό διάλυμα που προκύπτει έπειτα από ανάδευση υπό θέρμανση, χωρίζεται σε δείγματα (aliquots) των 960μl, στα οποία γίνεται προσθήκη 5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη.
Transfer buffer 1X	Παρασκευάζεται με προσθήκη 20% v/v μεθανόλη, 10% v/v Running Buffer 10X και 0,05% v/v SDS σε dH ₂ O.
Tris-Hcl pH=8,8 1,5M	Παρασκευάζεται με διάλυση ποσότητας Tris σε dH ₂ O και ρύθμιση του pH στο 8,8 με προσθήκη πυκνού HCL 12N.
Tris-Hcl pH=6,8 1,5M	Παρασκευάζεται με διάλυση ποσότητας Tris σε dH ₂ O και ρύθμιση του pH στο 6,8 με προσθήκη πυκνού HCL 12N.
TBS 10X pH=7,4-7,6	Παρασκευάζεται με διάλυση ποσότητας Tris σε dH ₂ O και ρύθμιση του pH στο 7,4-7,6 με προσθήκη πυκνού HCl 12N μ
TBST 1X	Παρασκευάζεται με ανάμειξη 900 ml TBS 10X, 100 ml dH ₂ O και 700μl Tween-20

3.3 Τεχνικές

3.3.1 MTT assay

Η μέθοδος MTT είναι μια βιοχημική χρωματομετρική μέθοδος που χρησιμοποιείται για να μελετήσουμε την βιωσιμότητα των κυττάρων. Η μέθοδος βασίζεται στην ένωση MTT [3-(4,5-διμεθυλοθιαζολ-2-υλο)-2,5-διφενυλτετραζόλιο βρωμίδιο], η οποία είναι μια υδατοδιαλυτή ένωση με κίτρινο χρώμα. Όταν τα κύτταρα είναι ζωντανά και έχουν λειτουργικά μιτοχονδριακά ένζυμα, η συγκεκριμένη ένωση μεταβολίζεται από μιτοχονδριακές NADH/NADPH εξαρτώμενες αφυδρογονάσες και δημιουργούνται οι χαρακτηριστικοί μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης.



Εικόνα 14: Η αντίδραση αναγωγής του MTT σε κρυστάλλους φορμαζάνης από NADPH εξαρτώμενες μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες.

Σκοπός του συγκεκριμένου assay στο πείραμα, είναι η μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων C2C12 παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων D-γαλακτόζης. Πιο συγκεκριμένα, θέλουμε να βρούμε τις συγκεντρώσεις της D-γαλακτόζης οι οποίες θα προκαλέσουν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στο 60-70%.

Το assay περιείχε τις εξής 5 συνθήκες: control, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml και 60 mg/ml D-γαλακτόζης από 5 επαναλήψεις η κάθε συνθήκη για να ενισχυθεί η αξιοπιστία του αποτελέσματος. Το control αντί για D-γαλακτόζη, περιέχει θρεπτικό DMEM.

Έτσι χρησιμοποιήθηκαν 96-well plates στα οποία έγινε επίστρωση κυττάρων C2C12 παρουσία θρεπτικού υλικού και πιο συγκεκριμένα έγινε επίστρωση 3.000 cell/well. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων στους 37 °C και σε 5% CO₂, ώστε να προσκολληθούν κατάλληλα τα κύτταρα.

Μετά την πάροδο των 24 ωρών, έγινε η προσθήκη των διαφόρων συγκεντρώσεων D-galactose, ανάλογα με τη συνθήκη και ακολούθησε και πάλι επώαση των κυττάρων στις ίδιες συνθήκες. Μετά από 24 και 48 ώρες έγινε προσθήκη του αντιδραστήριου MTT με συγκέντρωση 0,5 mg/ml και ακολούθησε επώαση για 3 ώρες σε συνθήκες 37 °C και 5% CO₂ ώστε να επιτευχθεί η δημιουργία των μωβ κρυστάλλων φορμαζάνης, όπου είναι δυνατό. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσθήκη οργανικού διαλύτη (ισοπροπανόλης), ώστε να γίνει η διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζάνης και ακολούθησε επώαση σε σκοτάδι για 30 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση των well στα 570 nm καθώς και του background στα 690 nm στο Plate Reader.

3.3.2. Ξεπάγωμα κυττάρων

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα C2C12, της εταιρείας ATCC, ευγενική προσφορά της Καθηγήτριας Χριστίνας Καρατζαφέρη, Τμήμα Φυσικής αγωγής και αθλητισμού του Παν/μιου Θεσσαλίας. Τα κύτταρα συντηρούνται στους -80 βαθμούς για όσο χρονικό διάστημα θέλουμε σε ειδικά σωληνάρια βαθιάς κατάψυξης (cryovial). Για να ξεπαγώσουμε τα κύτταρα, παίρνουμε το cryovial και το μεταφέρουμε στο υδατόλουτρο μέχρι να ξεπαγώσει το περιεχόμενο του. Μέσα στο cryovial περιέχονται 1 ml κύτταρα με ορισμένη ποσότητα κρυοπροστατευτικού DMSO. Το DMSO σε θερμοκρασία δωματίου είναι τοξικό για τα κύτταρα και για αυτό, με το που ξεπαγώσει το περιεχόμενο του cryovial, γίνεται προσθήκη 9ml θρεπτικού DMEM ώστε να γίνει αραίωση του DMSO. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του διαλύματος για 5 min στα 1.000 rpm και το υπερκείμενο αφαιρείται με πιπέτα. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 5 ml θρεπτικού DMEM και μεταφέρεται σε φλάσκα 25 mm² όπου παραμένει στον επωαστήρα μέχρι να αναπτυχθούν επαρκώς τα κύτταρα.

3.3.3. Θρυψινοποίηση κυττάρων

Η διαδικασία της θρυψινοποίησης είναι μια απαραίτητη διαδικασία για την επιβίωση των κυττάρων καθώς επιτρέπει την διαιώνιση και την χρήση τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Βασίζεται στην δράση του ενζύμου θρυψίνη το οποίο είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ των κυττάρων και της επιφάνειας της φλάσκας. Η θρυψινοποίηση πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα της καλλιέργειας καταλαμβάνουν ένα μεγάλο ποσοστό της επιφάνειας της φλάσκας διευκολύνοντας έτσι την απομάκρυνση των κυττάρων από αυτήν.

Αρχικά, με χρήση γυάλινης πιπέτας Pasteur αφαιρούνται προσεκτικά από την φλάσκα το θρεπτικό και τα νεκρά κύτταρα. Γίνεται προσθήκη ορισμένου όγκου θρυψίνης και έπειτα η φλάσκα τοποθετείται στον επωαστήρα για 3 min για να δράσει το ένζυμο. Αφού περάσουν τα 3 min, η φλάσκα ελέγχεται στο μικροσκόπιο για να επιβεβαιωθεί ότι έχουν αποκολληθεί τα κύτταρα και έπειτα γίνεται προσθήκη τετραπλάσιου όγκου θρεπτικού μέσου για να ανασταλεί η δράση του ενζύμου λόγω της αραίωσης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στα 1.000 rpm και έπειτα αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε θρεπτικό DMEM και μεταφέρεται σε νέα φλάσκα, η οποία παραμένει στον επωαστήρα σε συνθήκες 37 °C και 5% CO₂.

3.3.4. Επίστρωση κυττάρων

Μετά την ολοκλήρωση της θρυψινοποίησης ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων με τη βοήθεια του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer και έπειτα γίνεται μεταφορά των κυττάρων σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας (plates).

Για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση των κυττάρων, μεταφέρονται στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer 10 μl κυττάρων, τα οποία είναι διαλυτοποιημένα σε

θρεπτικό μέσο DMEM, τοποθετείται από πάνω η καλυπτρίδα και ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων στο ανάστροφο μικροσκόπιο. Έπειτα, γίνεται η μεταφορά του απαιτούμενου αριθμού κυττάρων στα plates, ακολουθεί ήπια ανάδευσή τους και τελική παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Στο τέλος, τα plates με τα κύτταρα αποθηκεύονται στον επωαστήρα στους 37 °C και 5% CO₂.

3.3.5. Μελέτη επίδρασης D-galactose και Dexamethasone στα C2C12 κύτταρα

Για τη διερεύνηση των μεταβολών των επιπέδων των μεταγραφικών παραγόντων p53 και p65 καθώς και της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDH), παράγοντες ελέγχου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ανοσολογικών αποκρίσεων και ενεργειακού μεταβολισμού, αντίστοιχα κατά την επαγωγή γήρανσης μυϊκών κυττάρων σε καλλιέργεια με προσθήκη D-galactose, πραγματοποιήθηκε αρχικά επίστρωση κυττάρων C2C12 (200.000 κύτταρα/plate) σε 6 plates 60X15 mm σε θρεπτικό υλικό DMEM high glucose with phenol red το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, 1% V/V L-Gln και 1% pen/strep. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση των κυττάρων για 48 ώρες σε επωαστικό κλίβανο (37 °C και 5% CO₂) ακολουθεί η προσθήκη των διαλυμάτων D-galactose σε συγκεντρώσεις 30 mg/ml και 40 mg/ml για 24 και 48 ώρες.

Παράλληλα, για τη διερεύνηση της επίδρασης της Dexamethasone στα επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων και της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης πραγματοποιήθηκε επίστρωση κυττάρων C2C12 σε 4 plates 60X15 mm (150.000/plate) στα οποία έγινε προσθήκη D-galactose σε συγκέντρωση 40mg/ml. Σε 2 από τα plates πραγματοποιήθηκε και προσθήκη Dexamethasone σε τελική συγκέντρωση 10⁻⁷ M. Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε καλλιεργητικό μέσο DMEM high glucose, στο οποίο δεν έχει προστεθεί ο δείκτης pH phenol red και έχει εμπλουτιστεί με FBS, το οποίο έχει υποστεί κατάλληλη κατεργασία με ζωάνθρακα, ώστε να αφαιρεθούν από αυτό ορμόνες και αναπτυξιακοί παράγοντες.

3.3.6 Συλλογή (Harvest) κυττάρων

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης των κυττάρων με την D-galactose, ακολουθεί η συλλογή των κυττάρων (Harvest). Για να γίνει η συλλογή των κυττάρων από τα plates, αφαιρείται αρχικά το θρεπτικό DMEM High glucose και έπειτα γίνεται προσθήκη 700μl διαλύματος PBS 1X ώστε να πραγματοποιηθούν οι απαραίτητες πλύσεις. Με χρήση μια πλαστικής ράβδου (scraper) και κατάλληλης πιπέτας γίνεται η συλλογή των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε plate σε Eppendorf. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 2.000rpm για 5 λεπτά στους 4 °C και μετά την ολοκλήρωσή της απομακρύνεται το υπερκείμενο ενώ το ίζημα είτε αποθηκεύεται στους -80 °C, είτε χρησιμοποιείται άμεσα για την διεξαγωγή των πειραμάτων.

3.3.7. Λύση κυττάρων

Η λύση των κυττάρων μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε αμέσως μετά το Harvest είτε αφού γίνει μεταφορά των ιζημάτων από τους -80 °C σε πάγο για 10 λεπτά. Για την λύση του ιζήματος γίνεται προσθήκη διαλύματος λύσης (lysis buffer), το οποίο πριν την χρήση του έχει εμπλουτιστεί με DTT για να γίνει διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών, PMSF για να γίνει αναστολή των πρωτεασών σερίνης και protease inhibitors σε κατάλληλη συγκέντρωση για να γίνει αναστολή όλων των πρωτεασών και να μην καταστραφούν οι πρωτεΐνες των κυττάρων. Έπειτα, πραγματοποιείται ανάδευση των κυττάρων και επώαση τους με το τελικό διάλυμα λύσης για 30 λεπτά ώστε να προκληθεί ρήξη της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων.

Πέραν της πλασματικής μεμβράνης όμως είναι απαραίτητο να διασπαστούν και τα νουκλεϊκά οξέα και για αυτό μετά το πέρας των 30 λεπτών ακολουθεί μια δεύτερη λύση των κυττάρων με υπερήχους. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα εκτίθενται στους υπερήχους για 1 δευτερόλεπτο και έπειτα τοποθετούνται στον πάγο για 30 δευτερόλεπτα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές.

3.3.8. Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών και προετοιμασία δειγμάτων για την ανοσοαποτύπωση κατά Western

Για να πραγματοποιηθεί η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών στα λύματα των κυττάρων χρησιμοποιείται η χρωματογραφική μέθοδος Bradford η οποία βασίζεται στην μετατροπή της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 από καφέ σε μπλε όταν αλληλοεπιδρά με πρωτεΐνες υπό όξινες συνθήκες. Έτσι όσο περισσότερη πρωτεΐνη υπάρχει στο δείγμα τόσο πιο έντονο μπλε θα είναι το τελικό διάλυμα.

Το αρχικό διάλυμα Bradford έχει συγκέντρωση 5X και για αυτό το λόγο ακολουθεί αραιώση με σκοπό τη δημιουργία ενός τελικού διαλύματος Bradford 1X. Για την διεκπεραίωση της μεθόδου, γίνεται προσθήκη 1 μl του πρωτεϊνικού δείγματος και 1 ml του αντιδραστήριου Bradford 1X σε eppendorf και ακολουθεί επώαση σε σκοτεινό μέρος για 20-40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, πραγματοποιείται φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 595 nm. Από τις τιμές των απορροφήσεων σε συνδυασμό με την πρότυπη καμπύλη BSA και την ανάλυση των δεδομένων στο Microsoft Office Excel, θα προκύψει η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης των δειγμάτων καθώς και οι ποσότητες των sample buffer, Tris-HCl pH=7,5 και πρωτεϊνικού δείγματος που απαιτείται σε κάθε συνθήκη για την προετοιμασία των τελικών δειγμάτων για την ανοσοαποτύπωση κατά Western.

3.3.9. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμίδης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος κατά μήκος ενός ηλεκτρικού πεδίου.

Κατά την ηλεκτροφόρηση υπάρχουν 2 διαφορετικά πηκτώματα πολυακρυλαμίδης. Πρώτα, υπάρχει η πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) που είναι πήκτωμα με χαμηλή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης και τοποθετούνται τα πρωτεϊνικά δείγματα ώστε να πακεταριστούν όλες οι πρωτεΐνες και να ξεκινήσει ο διαχωρισμός τους ταυτόχρονα. Μετά υπάρχει η πηκτή διαχωρισμού (separating gel) η οποία είναι πήκτωμα υψηλής συγκέντρωσης πολυακρυλαμίδης, όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Η σύσταση των πηκτωμάτων παρουσιάζεται παρακάτω στους πίνακες 9 και 10.

Για να ξεκινήσει η προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση, γίνεται τοποθέτηση τους σε κατάλληλη συσκευή θέρμανσης (heatblock) στους 95 °C για 5 λεπτά. Έπειτα τα δείγματα φορτώνονται με κατάλληλη σειρά στην πηκτή πολυακρυλαμίδης και πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος Running buffer 1X στα 90 Volt και μέχρι να φτάσει σε κατάλληλο σημείο το μέτωπο της ηλεκτροφόρησης.

Πίνακας 9: Σύσταση πηκτής επιστοίβαξης 6% Acrylamide/Bis acrylamide .

Συστατικά	Αρχικές συγκεντρώσεις	Ποσότητα
ddH ₂ O	-	2,425 ml
Tris-HCl pH=6,8	0,125 M	1,250 ml
SDS	0,1% (w/v)	50 µl
Acrylamide/Bis acrylamide	4% (w/v)	1,250 ml
APS	1% (w/v)	25 µl
TEMED	0,04% (v/v)	2,5 µl

Πίνακας 10: Σύσταση πηκτής διαχωρισμού 10% Acrylamide/Bis acrylamide.

Συστατικά	Αρχικές συγκεντρώσεις	Ποσότητα
ddH ₂ O	-	2,025 ml
Tris-HCl pH=8,8	0,375 M	210 µl
SDS	0,1% (w/v)	25 µl
Acrylamide	10% (w/v)	250 µl
APS	1% (w/v)	12,5 µl
TEMED	0,04% (v/v)	2,5 µl

3.3.10. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western Blot)

3.3.10.1 Ηλεκτρομεταφορά

Αρχικά, η πηκτική πολυακρυλαμίδης τοποθετείται για εξισορρόπηση σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η δημιουργία του “sandwich” της ηλεκτρομεταφοράς, όπου στην ειδική κασετίνα ηλεκτρομεταφοράς τοποθετούνται από την μαύρη πλευρά και με την εξής σειρά τα παρακάτω : 1 σφουγγαράκι, 2 διηθητικά χαρτιά Wattman, η πηκτική πολυακρυλαμίδης, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, 2 διηθητικά χαρτιά Wattman και 1 σφουγγαράκι. Έτσι προκύπτει το “sandwich” ηλεκτρομεταφοράς το οποίο τοποθετείται στην κατάλληλη συσκευή και ακολουθεί η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών στα 0,35 A για 70 λεπτά στους 4°C. Μετά το πέρας των 70 λεπτών η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μεταφέρεται σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST 1X.

3.3.10.2 Μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων

Μετά την ηλεκτρομεταφορά, πραγματοποιείται μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, ώστε να αποφευχθεί η πρόσδεση των αντισωμάτων σε μη ειδικές θέσεις. Το μπλοκάρισμα γίνεται με προσθήκη κατάλληλου διαλύματος blocking buffer, 10% ξηρό γάλα χωρίς λιπαρά, διαλυτοποιημένο σε 1 X TBST το οποίο παραμένει για επώαση για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία, με ρυθμιστικό διάλυμα TBST 1X ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του γάλακτος.

3.3.10.3 Επώαση με πρωτογενές αντίσωμα

Αφού ολοκληρωθεί το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με το απαιτούμενο πρωτογενές αντίσωμα στην κατάλληλη συγκέντρωση διαλυτοποιημένο σε 2% γάλα/1 X TBST. Η επώαση είναι overnight (16-18 ώρες) υπό ανάδευση στους 4 °C. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, ακολουθούν 5 πλύσεις της μεμβράνης διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία, με ρυθμιστικό διάλυμα TBST 1X, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος που δεν προσδέθηκε στην πρωτεΐνη.

3.3.10.4 Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα

Όταν τελειώσουν οι πλύσεις του πρωτογενούς αντισώματος, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα (mouse ή rabbit) για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία, με ρυθμιστικό διάλυμα TBST 1X ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος που δεν προσδέθηκε στο πρωτογενές αντίσωμα.

3.3.10.5 Εμφάνιση σήματος

Για να γίνει η εμφάνιση του σήματος, καθοριστικό ρόλο παίζει το δευτερογενές αντίσωμα καθώς είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με την υπεροξειδάση HRP. Το συγκεκριμένο ένζυμο όταν προστίθεται το υποστρώμα του έχει την ικανότητα να εκπέμπει φως. Για αυτό το λόγο, για την εμφάνιση του σήματος γίνεται προσθήκη των υποστρωμάτων ECL_A ECL_B στην μεμβράνη σε ίσες ποσότητες και ακολουθεί επώαση για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα γίνεται μεταφορά της

μεμβράνης στην κατάλληλη κασετίνα εμφάνισης, η οποία με την σειρά της μεταφέρεται στον σκοτεινό θάλαμο (dark room), ώστε να γίνει η τοποθέτηση του φιλμ. Αφού περάσουν κάποια λεπτά και πραγματοποιηθεί η μεταφορά του σήματος, το φιλμ τοποθετείται στο διάλυμα εμφάνισης σήματος, ξεπλένεται με νερό και τοποθετείται και στο διάλυμα μονιμοποίησης σήματος.

3.3.11. Στατιστική Ανάλυση

Σε όλα τα αποτελέσματα των πειραματικών διαδικασιών που πραγματοποιήθηκαν έγινε στατιστική ανάλυση και υπολογιστική επεξεργασία.

Για τον υπολογισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης που περιέχεται σε ένα δείγμα μέσω της χρωματογραφικής μεθόδου Bradford, για την προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες, για τις κανονικοποιήσεις των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών κατά Western καθώς και για τις κανονικοποιήσεις των αποτελεσμάτων των πειραμάτων υπολογισμού της κυτταρικής βιωσιμότητας MTT χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microsoft Office Excel.

Για τις ποσοτικοποιήσεις των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών κατά Western χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της δοκιμασίας MTT χρησιμοποιήθηκε η One-Way-Analysis of Variance Tukey B (ANOVA) μέσω του προγράμματος StarPlus.

Τέλος, για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνών κατά Western χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Adobe Photoshop.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

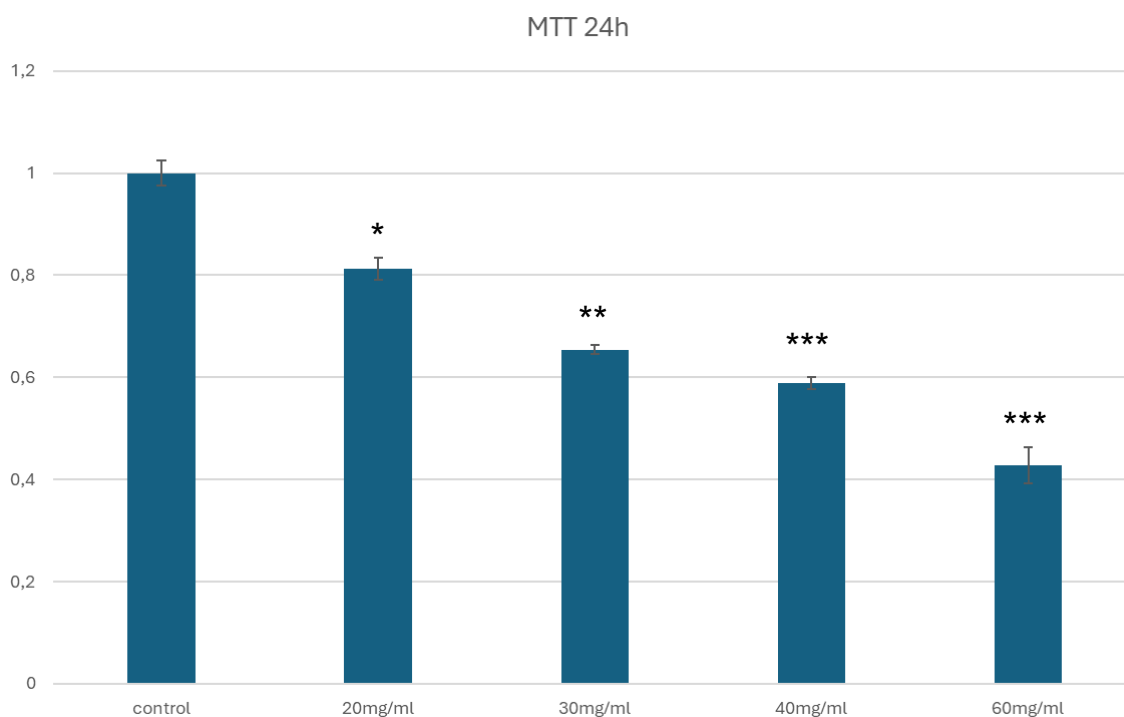
4.1 MTT assay

Με στόχο την εκτίμηση της βιωσιμότητας-κυτταρικό πολλαπλασιασμό των μυϊκών κυττάρων C2C12, μετά από επώαση με D-galactose, πραγματοποιήθηκε δοκιμασία MTT. Πιο συγκεκριμένα, στρώθηκαν 3.000 κύτταρα/well σε 96-well plate με πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM και έπειτα από 24 ώρες όπου μεγάλωσαν τα κύτταρα, έγινε προσθήκη D-galactose σε συγκεντρώσεις 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml και 60 mg/ml, με σκοπό να επιλεγούν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις D-galactose, που θα προκαλέσουν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας κατά 30-40 %. Μετά το πέρας 24 ωρών γίνεται προσθήκη 0,5mg/ml MTT για 3 ώρες και έπειτα πραγματοποιείται επώαση με ισοπροπανόλη για 30 λεπτά υπό ανάδευση σε σκοτάδι. Στο τέλος, ακολούθησε φωτομέτρηση από την οποία προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στο διάγραμμα παρακάτω.

Στο διάγραμμα παρατηρείται εμφανής δόσοεξαρτώμενη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας με την αύξηση της συγκέντρωσης της D-galactose.

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούμε ότι η προσθήκη 20mg/ml D-galactose οδηγεί σε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στο 0,81 (δηλαδή μείωση κατά 20%) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου control, όπου δεν έχει γίνει χορήγηση D-galactose. Η προσθήκη των συγκεντρώσεων 30mg/ml και 40mg/ml D-galactose προκαλούν παρόμοια αποτελέσματα και στις δύο περιπτώσεις, καθώς επιτεύχθηκε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στο 0,65 και 0,58 (δηλαδή μείωση κατά 35 και 42%, αντίστοιχα). Η υψηλότερη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων επιτεύχθηκε με την προσθήκη 60 mg/ml D-galactose όπου η βιωσιμότητα έφτασε στο 0,42 (δηλαδή μείωση κατά 58%).

Η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας αποδεικνύει την μείωση κυτταρικού πολλαπλασιασμού/τοξικότητα που προκαλεί η προσθήκη της D-galactose στα κύτταρα και ενώ ταυτόχρονα συνάδει με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας που αναφέρθηκαν παραπάνω, όπου συσχετίζουν την συγκεκριμένη ουσία με επαγωγή της γήρανσης λόγω αυξημένου οξειδωτικού στρες και ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS).



Διάγραμμα 1: Μεταβολές των επιπέδων της κυτταρικής βιωσιμότητας με την προσθήκη D-galactose σε συγκέντρωση 20mg/ml, 30mg/ml, 40mg/ml και 60mg/ml σε κύτταρα C2C12. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας είναι ανάλογη της αύξησης της συγκέντρωσης της D-galactose. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4.2 Επίδραση της γήρανσης στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων p53 και p65 και της PDH σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα μυϊκών κυττάρων C2C12

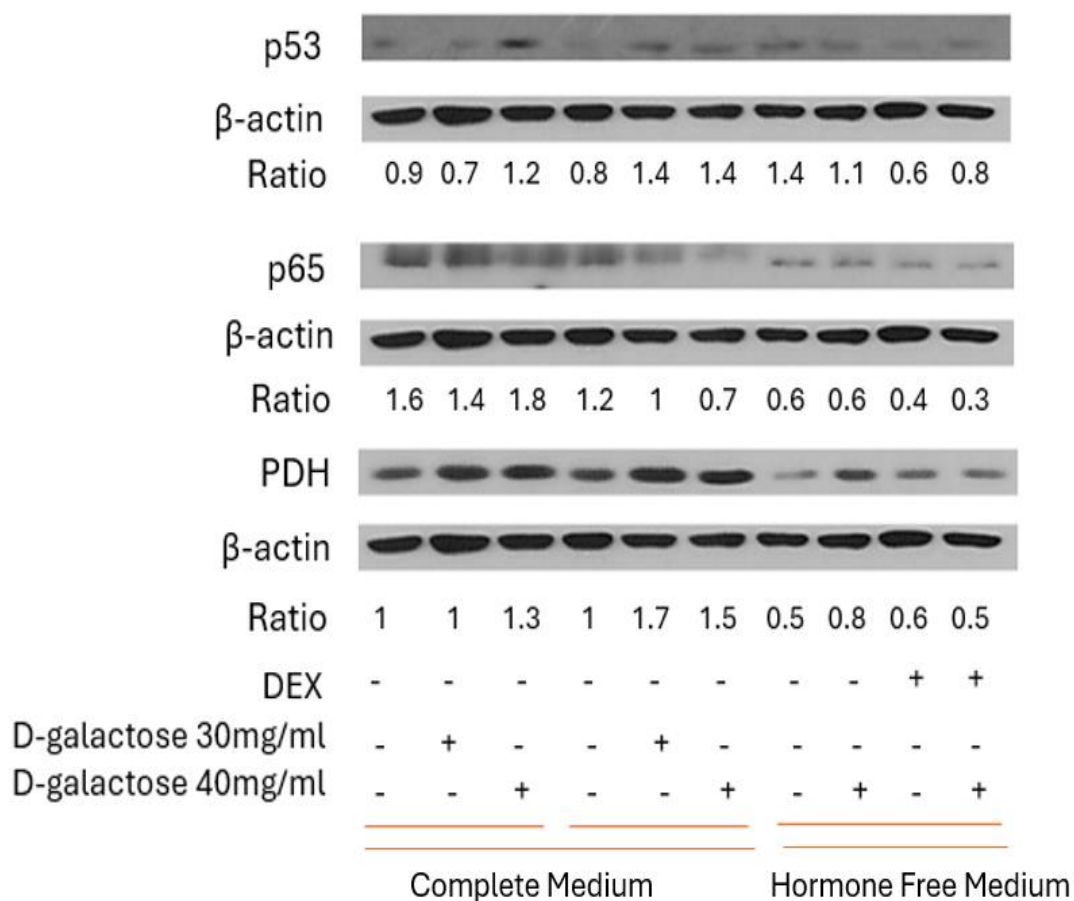
Με στόχο την εκτίμηση της επίδρασης της γήρανσης που προκαλείται από την D-galactose καθώς και η επίδραση της Dexamethasone στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων p53 και p65 καθώς και της PDH σε πρωτεϊνικό εκχύλισμα μυϊκών κυττάρων C2C12, πραγματοποιήθηκε ανάλυση Western blotting. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δείγματα από εκχυλίσματα κυττάρων C2C12, στα οποία είχε γίνει προσθήκη 30mg/ml και 40mg/ml D-galactose για 24 και 48 ώρες σε πλήρες θρεπτικό DMEM with phenol red (Complete Medium) καθώς και δείγματα απουσία και παρουσία Dexamethasone για 48 ώρες σε θρεπτικό DMEM without phenol red (Hormone Free Medium). Η πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών των υπό εξέταση μορίων εκτιμήθηκε μετά από κανονικοποίηση αυτών ως προς την αντίστοιχη πυκνότητα της β-ακτίνης και οι αναλογίες της έκφρασης των μορίων ενδιαφέροντος ως προς το μόριο κανονικοποίησης (ratio) αποτυπώνονται κάτω από κάθε ζώνη.

Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της γενετικής σταθερότητας, στην επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA (DNA Damage Response, DDR) ενώ ταυτόχρονα δρα ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο αποτρέποντας την εμφάνιση καρκίνου στα κύτταρα. Όσον αφορά τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο DMEM παρουσία D-galactose για 24 και 48 ώρες, φαίνεται πως υπάρχει αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων κατά 30% με προσθήκη 40mg/ml ουσίας για 24 ώρες και κατά 35% και στις δύο συνθήκες στις 48 ώρες, σε σχέση με την συνθήκη control. Η παρατήρηση αυτή είναι σύμφωνη με δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας που αναδεικνύουν την από D-galactose αύξηση του παράγοντα p53, ως συνθήκη αναφοράς/δείκτη κατά την επαγωγή γήρανσης. Απουσία ορμονών από το θρεπτικό μέσο καθώς και απουσία D-galactose και dexamethasone οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του p53 κατά 35% σε σχέση με την συνθήκη control/αναφοράς (από 0,9 σε 1,4) καθώς η απουσία αυξητικών παραγόντων και ορμονών φαίνεται να έχει παρόμοια δράση με αυτήν που προκαλεί η D-galactose, σε συγκέντρωση 40mg/ml D-galactose κατά την ανάπτυξη των κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό μέσο. Η προσθήκη D-galactose σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε καλλιεργητικό μέσο απουσία ορμονών και αναπτυξιακών παραγόντων δεν φαίνεται να επηρεάζει ιδιαίτερα τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη control ενώ η προσθήκη dexamethasone μειώνει τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα κατά 60% σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη αναφοράς. Η ταυτόχρονη χορήγηση 40mg/ml D-galactose και dexamethasone οδηγεί σε μείωση των επιπέδων του p53 κατά 40%, σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη control.

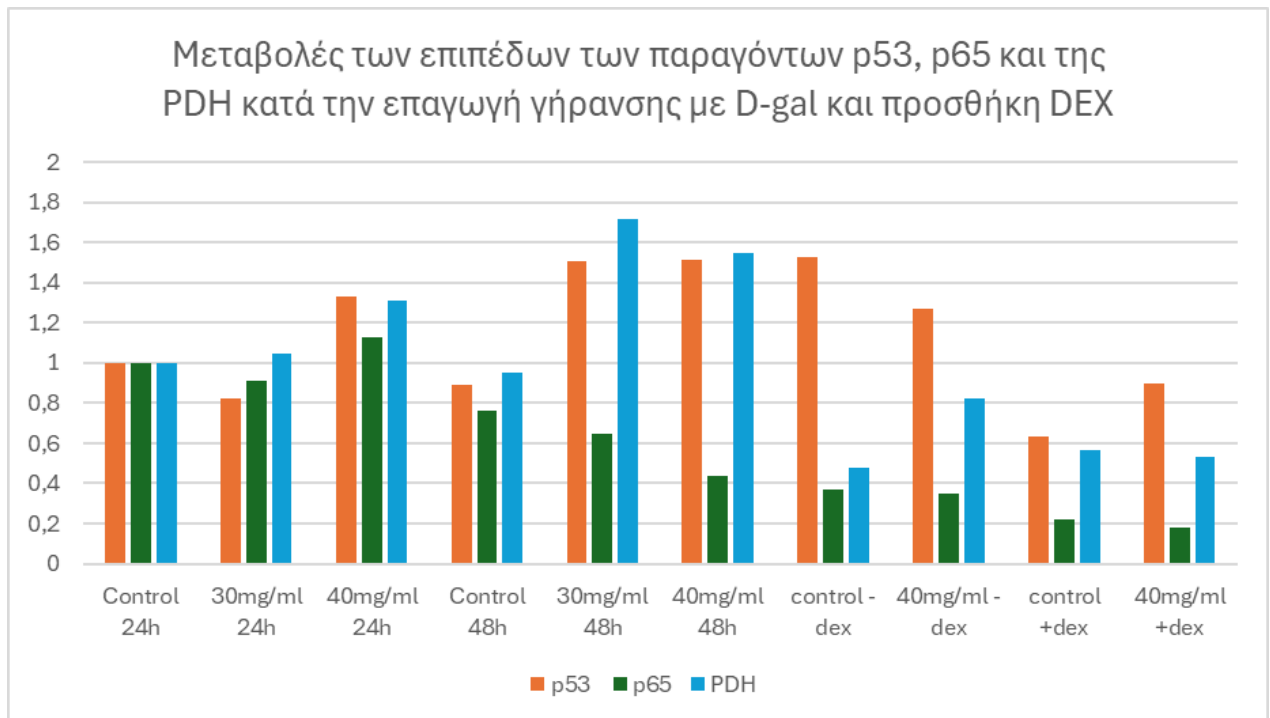
Ο μεταγραφικός παράγοντας p65 αποτελεί υπομονάδα του NF-κΒ ο οποίος οδηγεί στη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με άμυνα και φλεγμονή. Στο πλήρες θρεπτικό μέσο, παρουσία D-galactose για 24 ώρες φαίνεται να υπάρχει μια μικρή αύξηση στα επίπεδα της πρωτεΐνης ενώ στις 48 ώρες παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις 30mg/ml και 40mg/ml αντίστοιχα, γεγονός που υποδηλώνει ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες επαγωγής γήρανσης,

παρατηρείται μείωση του παράγοντα φλεγμονής NF-κΒ. Στο θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών, η έκφραση του p65 μειώνεται κατά 60% σε σχέση με την συνθήκη control στις 24 ώρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι όπως και στην περίπτωση του παράγοντα p53, η επίδραση της ανάπτυξης των κυττάρων απουσία ορμονών και αυξητικών παραγόντων, είναι όμοια με αυτήν της επαγωγής γήρανσης παρουσία 40 mg/ml. D – galactose για 48 ώρες. Επίσης, παρατηρείται ότι το αντιφλεγμονώδες dexamethasone προκαλεί περαιτέρω μείωση των επιπέδων της p65 κατά 30%, σε σύγκριση με την αντίστοιχη συνθήκη αναφοράς, (απουσία ορμονών/αναπτυξιακών παραγόντων) ενώ με ταυτόχρονη χορήγηση D-galactose η μείωση αγγίζει το 50%. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με την αντιφλεγμονώδη δράση της δεξαμεθαζόνης (DEX).

Η PDH αποτελεί βασικό ένζυμο το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην σύνδεση της γλυκόλυσης και του κύκλου του Krebs πραγματοποιώντας την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-coA. Σε συνθήκες γήρανσης, δηλαδή παρουσία D-galactose στο πλήρες θρεπτικό μέσο φαίνεται πως στις συνθήκες στις 24 ώρες τα πρωτεϊνικά επίπεδα του ενζύμου παραμένουν σταθερά ή αυξάνονται κατά 30%, ενώ στις 48 ώρες υπάρχει μεγαλύτερη αύξηση κατά 70% και 50% αντίστοιχα στις δύο συγκεντρώσεις D-galactose. Αντιθέτως, στο θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PDH μειώνονται σημαντικά κατά 50% σε σχέση με το control (από λόγο 1 σε 0,5). Υπό συνθήκες απουσίας ορμονών και αυξητικών παραγόντων η παρουσία D-galactose οδηγεί και πάλι σε αύξηση των επιπέδων της PDH κατά 60% σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη αναφοράς (από 0,5 σε 0,8, $(0,8-0,5)/0,5 \cdot 100$), υποδηλώντας αύξηση των επιπέδων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών.



Εικόνα 15: Αξιολόγηση της επίδρασης της D-galactose και Dexamethasone στα πρωτεϊνικά επίπεδα των p53, p65 και PDH σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα μυϊκών κυττάρων C2C12. Οι λόγοι προκύπτουν έπειτα από κανονικοποίηση της έντασης των ζωνών των υπό μελέτη μορίων με την β-actin.



Διάγραμμα 2: Σχετικές μεταβολές των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών p53, p65 και PDH κατά την επαγωγή γήρανσης με D-galactose σε κύτταρα που αναπτύσσονται παρουσία ή απουσία ορμονών και αναπτυξιακών παραγόντων και στη συνέχεια εκ νέου προσθήκη Dexamethasone. Οι τιμές εμφανίζονται κανονικοποιημένες ως προς την ομάδα ελέγχου control 24h η οποία θεωρείται τιμή αναφοράς (ratio=1).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η γήρανση αποτελεί μια μη αντιστρεπτή διαδικασία, η οποία επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες και πραγματοποιούνται πολυάριθμες αλλαγές (López-Otín et al, 2013). Οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της διαφοροποίησης, επαγωγή οξειδωτικού στρες και παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS), ενεργοποίηση φλεγμονής και δυσλειτουργία του μεταβολισμού και των μιτοχονδρίων (Campisi, 2013).

Στην συγκεκριμένη εργασία, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης της επαγόμενης γήρανσης, η οποία προκαλείται από την χορήγηση D-galactose σε μυϊκά κύτταρα της σειράς C2C12, καθώς και της επίδρασης της δεξαμεθαζόνης σε μεταβολές των επιπέδων έκφρασης μορίων που εμπλέκονται σε βιοχημικές διαδικασίες που σχετίζονται με τη γήρανση. Συγκεκριμένα, έμφαση δόθηκε στους μεταγραφικούς παράγοντες p53 και p65 που σχετίζονται με διαφοροποίηση και φλεγμονή, αντίστοιχα, καθώς και στην PDH, που αποτελεί βασικό ρυθμιστή του μιτοχονδριακού μεταβολισμού.

Η επαγωγή γήρανσης με προσθήκη D-galactose σε κύτταρα σε καλλιέργεια αποτελεί ένα μοντέλο γήρανσης, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως για την πραγματοποίηση *in vitro* πειραμάτων καθώς προσομοιάζει σε μεγάλο βαθμό τον φαινότυπο της φυσικής γήρανσης (Azman et al, 2019).

Κατά την παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία MTT στην οποία μελετήθηκε η επίδραση συγκεντρώσεων D-galactose για 24 και 48 ώρες στην βιωσιμότητα των μυϊκών κυττάρων C2C12. Από την δοκιμασία αυτή προέκυψε δοσοεξαρτώμενη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας με την αύξηση της συγκέντρωσης της D-galactose. Πιο συγκεκριμένα, επιτεύχθηκε μείωση κατά 30% της κυτταρικής βιωσιμότητας/ανάπτυξης μετά από έκθεση των κυττάρων σε 30 mg/ml και 40 mg/ml D-galactose, για 24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από τη βιβλιογραφία, από την οποία προκύπτει ότι αυξημένη συγκέντρωση D-galactose προκαλεί μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων λόγω αύξησης του οξειδωτικού στρες και εξασθένησης της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων, οδηγώντας τελικά σε κυτταρική γήρανση (Azman et al, 2019), (Wang et al, 2020).

Για την μελέτη της επίδρασης της D-galactose στα πρωτεϊνικά επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων p53, NF-κB (p65), καθώς και της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDH), πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Western και χρήση ειδικών αντισωμάτων.

Η έκθεση των κυττάρων σε D-galactose σε πλήρες θρεπτικό μέσο (Complete Medium, CM) προκαλεί αύξηση των επιπέδων του παράγοντα p53 τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες. Η αύξηση αυτή συνάδει με την υπάρχουσα βιβλιογραφία σύμφωνα με την οποία ο p53, γνωστός και ως “φύλακας του γονιδιώματος” ενεργοποιείται σε συνθήκες απόκρισης στο στρες, όπως είναι το οξειδωτικό στρες και οι βλάβες στο DNA που προκαλούνται από την D-galactose, επάγοντας την μεταγραφή γονιδίων όπως το p21 και καταστέλλοντας τον κυτταρικό κύκλο, περιορίζοντας έτσι την διαφοροποίηση των κυττάρων (Vaddavalli et al, 2022).

Από την άλλη, η αύξηση των επιπέδων του p53 όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών και αυξητικών παραγόντων (Hormone Free Medium) υποδηλώνει συνθήκες πιθανής επαγωγής γήρανσης όμοιες με αυτές που επάγονται από την D-galactose. Η συγκεκριμένη αύξηση συμφωνεί με δεδομένα διεθνούς βιβλιογραφίας που δείχνουν ότι σε συνθήκες starvation

(έλλειψης θρεπτικών συστατικών) επάγεται φαινότυπος όμοιος με αυτόν της γήρανσης (Bernard et al, 2020). Η επιπλέον προσθήκη dexamethasone σε κύτταρα που αναπτύσσονται σε καλλιεργητικό μέσο απουσία ορμονών και αναπτυξιακών παραγόντων φαίνεται να μειώνει σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη αναφοράς. Η μείωση αυτή πιθανώς οφείλεται στην αρνητική επίδραση της Dexamethasone λόγω ενεργοποίησης των αποπτωτικών της δράσεων. Η ταυτόχρονη χορήγηση D-galactose και Dexamethasone προκαλεί μείωση των επιπέδων του p53 κατά 60% σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη αναφοράς, πιθανώς λόγω "εκτεταμένης" επαγωγής γήρανσης τόσο λόγω έλλειψης της θρεπτικών συστατικών, όσο και λόγω της παρουσίας D – galactose.

Τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ και πιο συγκεκριμένα της υπομονάδας p65 φαίνεται να αυξάνονται κατά την επαγόμενη γήρανση από D-galactose σε 24 ώρες. Η αύξηση αυτή συνηγορεί με την συσχέτιση της κυτταρικής γήρανσης με αυξημένη φλεγμονή καθώς και με ένα inflammaging περιβάλλον στο οποίο υπάρχει συνεχής φλεγμονή. Ακόμη, η ενεργοποίηση του παράγοντα NF-κΒ από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) καθώς και από την μείωση του μήκους των τελομερών προκαλεί έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με φλεγμονή. (García-García et al, 2021).

Στο θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών, η έκφραση του p65 μειώνεται κατά 60% σε σχέση με την συνθήκη control στις 24 ώρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι όπως και στην περίπτωση του παράγοντα p53, η επίδραση της ανάπτυξης των κυττάρων απουσία ορμονών και αυξητικών παραγόντων, είναι όμοια με αυτήν της επαγωγής γήρανσης παρουσία 40 mg/ml D – galactose για 48 ώρες, όπου παρατηρείται μείωση των επιπέδων p65. Επίσης, παρατηρείται ότι το αντιφλεγμονώδες dexamethasone προκαλεί περαιτέρω μείωση των επιπέδων της p65 κατά 50%, σε σύγκριση με την αντίστοιχη συνθήκη αναφοράς, (απουσία ορμονών/αναπτυξιακών παραγόντων), είτε γίνει ταυτόχρονη χορήγηση D-galactose είτε όχι. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με την αντιφλεγμονώδη δράση της δεξαμεθαζόνης (DEX) (B. Sinner, 2019).

Όσον αφορά την πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH), τα αποτελέσματα της ανάλυσης Western blot έδειξαν αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης με προσθήκη D-galactose, ειδικά στις 48 ώρες. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να ερμηνευτεί ως μια προσπάθεια των κυττάρων να επιβιώσουν και να αποφύγουν την απόπτωση ενισχύοντας την λειτουργία των μιτοχονδρίων και την παραγωγή ενέργειας, ή πιθανόν λόγω αναστολής αυτοφαγίας, διαδικασίες οι οποίες συμφωνούν με την βιβλιογραφία σε αντίστοιχα μοντέλα γήρανσης στο *C. Elegans* (Tavernarakis).

Αντιθέτως, στο θρεπτικό μέσο απουσία ορμονών, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PDH μειώνονται σημαντικά κατά 50% σε σχέση με το control στις 24h (από λόγο 1 σε 0,5). Υπό συνθήκες απουσίας ορμονών και αυξητικών παραγόντων, η παρουσία D-galactose οδηγεί και πάλι σε αύξηση των επιπέδων της PDH κατά 60% σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη αναφοράς (από 0,5 σε 0,8, $(0,8-0,5)/0,5 \cdot 100$), υποδηλώντας αύξηση των επιπέδων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, πιθανόν λόγω αναστολής αυτοφαγίας, σε συμφωνία με αντίστοιχα μοντέλα γήρανσης στο *C. elegans* (Palikaras et al, 2015). Η προσθήκη DEX, σε σχέση με την αντίστοιχη συνθήκη που υπάρχει μόνο D-galactose, προκαλεί μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PDH καθώς φαίνεται να αίρει την δράση της D-galactose, πιθανόν μέσω ενεργοποίησης μηχανισμών αυτοφαγίας (Troconso, 2014) και ενεργοποίησης μιτοχονδριακού μεταβολισμού (Psarra and Sekeris, 2008).

Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει τη χρησιμότητα του μοντέλου επαγόμενης γήρανσης με D-galactose για τη μελέτη μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με το στρες, τη φλεγμονή και τις μεταβολικές διαταραχές. Τα αποτελέσματα παρέχουν νέες ενδείξεις ότι η μυϊκή γήρανση συνοδεύεται από συγκεκριμένες βιοχημικές μεταβολές και ενεργοποίηση μονοπατιών όπως το p53/p21 και NF-κB/p65, τα οποία ενδέχεται να αποτελέσουν μελλοντικούς θεραπευτικούς στόχους. Η προσθήκη της DEX ανέδειξε τον ρόλο των γλυκοκορτικοειδών ως πιθανούς ρυθμιστές της γήρανσης.

Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω μελέτη των μονοπατιών γήρανσης σε μυϊκά κύτταρα. Μελλοντικές εργασίες θα μπορούσαν να επικεντρωθούν στην υποκυτταρική μετατόπιση των παραπάνω μορίων και στην έκφραση συμπληρωματικών σηματοδοτικών παραγόντων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Azman KF, Safdar A, Zakaria R. D-galactose-induced liver aging model: Its underlying mechanisms and potential therapeutic interventions. *Exp Gerontol*. 2021 Jul 15;150:111372. doi: 10.1016/j.exger.2021.111372. Epub 2021 Apr 24. PMID: 33905879.

2. Azman KF, Zakaria R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. *Biogerontology*. 2019 Dec;20(6):763-782. doi: 10.1007/s10522-019-09837-y. Epub 2019 Sep 20. PMID: 31538262.
3. Bernard M, Yang B, Migneault F, Turgeon J, Dieudé M, Olivier MA, Cardin GB, El-Diwany M, Underwood K, Rodier F, Hébert MJ. Autophagy drives fibroblast senescence through MTORC2 regulation. *Autophagy*. 2020 Nov;16(11):2004-2016. doi: 10.1080/15548627.2020.1713640. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31931659; PMCID: PMC7595590.
4. Bo-Htay C, Palee S, Apaijai N, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Effects of d-galactose-induced ageing on the heart and its potential interventions. *J Cell Mol Med*. 2018 Mar;22(3):1392-1410. doi: 10.1111/jcmm.13472. Epub 2018 Jan 24. PMID: 29363871; PMCID: PMC5824366.
5. Campisi J, Kapahi P, Lithgow GJ, Melov S, Newman JC, Verdin E. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature*. 2019 Jul;571(7764):183-192. doi: 10.1038/s41586-019-1365-2. Epub 2019 Jul 10. PMID: 31292558; PMCID: PMC7205183.
6. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:685-705. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183653. Epub 2012 Nov 8. PMID: 23140366; PMCID: PMC4166529
7. Diokmetzidou A, Tsikitis M, Nikouli S, Kloukina I, Tsoupri E, Papathanasiou S, Psarras S, Mavroidis M, Capetanaki Y. Strategies to Study Desmin in Cardiac Muscle and Culture Systems. *Methods Enzymol*. 2016;568:427-59. doi: 10.1016/bs.mie.2015.09.026. Epub 2015 Nov 3. PMID: 26795479.
8. ECACC. (n.d.). *C2C12 cell line profile (ECACC 91031101)*. Culture Collections. Retrieved June 30, 2025, from Culture Collections website.
9. García-García VA, Alameda JP, Page A, Casanova ML. Role of NF-κB in Ageing and Age-Related Diseases: Lessons from Genetically Modified Mouse Models. *Cells*. 2021 Jul 27;10(8):1906. doi: 10.3390/cells10081906. PMID: 34440675; PMCID: PMC8394846.
10. Gherardi G, Weiser A, Bermont F, Migliavacca E, Brinon B, Jacot GE, Hermant A, Sturlese M, Nogara L, Vascon F, De Mario A, Mattarei A, Garratt E, Burton M, Lillycrop K, Godfrey KM, Cendron L, Barron D, Moro S, Blaauw B, Rizzuto R, Feige JN, Mammucari C, De Marchi U. Mitochondrial calcium uptake declines during aging and is directly activated by oleuropein to boost energy metabolism and skeletal muscle performance. *Cell Metab*. 2025 Feb 4;37(2):477-495.e11. doi: 10.1016/j.cmet.2024.10.021. Epub 2024 Nov 26. PMID: 39603237.
11. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6680-4. doi: 10.1038/sj.onc.1209954. PMID: 17072321.
12. Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF-κB p65 and strategies for therapeutic manipulation. *J Inflamm Res*. 2018 Oct 30;11:407-419. doi: 10.2147/JIR.S140188. PMID: 30464573; PMCID: PMC6217131.
13. He H, Yang M, Li S, Zhang G, Ding Z, Zhang L, Shi G, Li Y. Mechanisms and biotechnological applications of transcription factors. *Synth Syst Biotechnol*. 2023 Aug 31;8(4):565-577. doi: 10.1016/j.synbio.2023.08.006. PMID: 37691767; PMCID: PMC10482752.
14. Jin L, Li Y. Structural and functional insights into nuclear receptor signaling. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010 Oct 30;62(13):1218-26. doi:

- 10.1016/j.addr.2010.08.007. Epub 2010 Aug 17. PMID: 20723571; PMCID: PMC2991384.
15. Kannan G, Paul BM, Thangaraj P. Stimulation, regulation, and inflammaging interventions of natural compounds on nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway: a comprehensive review. *Inflammopharmacology*. 2025 Jan;33(1):145-162. doi: 10.1007/s10787-024-01635-4. Epub 2025 Jan 7. PMID: 39776026.
 16. Kasthuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell*. 2017 Sep 7;170(6):1062-1078. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.028. PMID: 28886379; PMCID: PMC5743327.
 17. Khoury MP, Bourdon JC. The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Mar;2(3):a000927. doi: 10.1101/cshperspect.a000927. PMID: 20300206; PMCID: PMC2829963.
 18. Kim MJ, Sinam IS, Siddique Z, Jeon JH, Lee IK. The Link between Mitochondrial Dysfunction and Sarcopenia: An Update Focusing on the Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4. *Diabetes Metab J*. 2023 Mar;47(2):153-163. doi: 10.4093/dmj.2022.0305. Epub 2023 Jan 12. PMID: 36635027; PMCID: PMC10040620.
 19. Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, Das PK, Yin Y, Albu M, Chen X, Taipale J, Hughes TR, Weirauch MT. The Human Transcription Factors. *Cell*. 2018 Feb 8;172(4):650-665. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.029. Erratum in: *Cell*. 2018 Oct 4;175(2):598-599. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.045. PMID: 29425488.
 20. Lee TI, Young RA. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*. 2013 Mar 14;152(6):1237-51. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.014. PMID: 23498934; PMCID: PMC3640494.
 21. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1194-217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039. PMID: 23746838; PMCID: PMC3836174.
 22. Madamsetty VS, Mohammadinejad R, Uzielienė I, Nabavi N, Dehshahri A, García-Couce J, Tavakol S, Moghassemi S, Dadashzadeh A, Makvandi P, Pardakhty A, Aghaei Afshar A, Seyfoddin A. Dexamethasone: Insights into Pharmacological Aspects, Therapeutic Mechanisms, and Delivery Systems. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022 May 9;8(5):1763-1790. doi: 10.1021/acsbiomaterials.2c00026. Epub 2022 Apr 19. PMID: 35439408.
 23. Mitsis, Thanasis & Efthimiadou, Aspasia & Bacopoulou, Flora & Vlachakis, Dimitrios & Chrousos, George & Eliopoulos, Elias. (2020). Transcription factors and evolution: An integral part of gene expression (Review). *World Academy of Sciences Journal*. 10.3892/wasj.2020.32.
 24. National Center for Biotechnology Information. (n.d.). *RELA proto-oncogene, NF- κ B subunit [Homo sapiens] (Gene ID: 5970)*. Retrieved June 30, 2025, from NCBI Gene database
 25. National Center for Biotechnology Information. (n.d.). *TP53 tumor protein p53 [Homo sapiens] (Gene ID: 7157)*. Retrieved June 30, 2025, from NCBI Gene database
 26. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature*. 2015 May 28;521(7553):525-8. doi: 10.1038/nature14300. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25896323.

27. Patel MS, Nemeria NS, Furey W, Jordan F. The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *J Biol Chem*. 2014 Jun 13;289(24):16615-23. doi: 10.1074/jbc.R114.563148. Epub 2014 May 5. PMID: 24798336; PMCID: PMC4059105.
28. Psarra AM, Sekeris CE. Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jan;1783(1):1-11. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.10.021. Epub 2007 Nov 13. PMID: 18062929.
29. Riedlinger T, Liefke R, Meier-Soelch J, Jurida L, Nist A, Stiewe T, Kracht M, Schmitz ML. NF- κ B p65 dimerization and DNA-binding is important for inflammatory gene expression. *FASEB J*. 2019 Mar;33(3):4188-4202. doi: 10.1096/fj.201801638R. Epub 2018 Dec 7. PMID: 30526044; PMCID: PMC6404571.
30. Sinner B. Perioperatives Dexamethason [Perioperative dexamethasone]. *Anaesthesist*. 2019 Oct;68(10):676-682. German. doi: 10.1007/s00101-019-00672-x. PMID: 31595319.
31. Soto LF, Li Z, Santoso CS, Berenson A, Ho I, Shen VX, Yuan S, Fuxman Bass JI. Compendium of human transcription factor effector domains. *Mol Cell*. 2022 Feb 3;82(3):514-526. doi: 10.1016/j.molcel.2021.11.007. Epub 2021 Dec 3. PMID: 34863368; PMCID: PMC8818021.
32. Spriet LL, Heigenhauser GJ. Regulation of pyruvate dehydrogenase (PDH) activity in human skeletal muscle during exercise. *Exerc Sport Sci Rev*. 2002 Apr;30(2):91-5. doi: 10.1097/00003677-200204000-00009. PMID: 11991544.
33. Stacpoole PW. The pyruvate dehydrogenase complex as a therapeutic target for age-related diseases. *Aging Cell*. 2012 Jun;11(3):371-7. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00805.x. Epub 2012 Apr 4. PMID: 22321732.
34. Stacpoole PW. Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2017 Nov 1;109(11). doi: 10.1093/jnci/djx071. PMID: 29059435.
35. Tilstra JS, Robinson AR, Wang J, Gregg SQ, Clauson CL, Reay DP, Nasto LA, St Croix CM, Usas A, Vo N, Huard J, Clemens PR, Stolz DB, Guttridge DC, Watkins SC, Garinis GA, Wang Y, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF- κ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Invest*. 2012 Jul;122(7):2601-12. doi: 10.1172/JCI45785. Epub 2012 Jun 18. PMID: 22706308; PMCID: PMC3386805.
36. Troncoso R, Paredes F, Parra V, Gatica D, Vásquez-Trincado C, Quiroga C, Bravo-Sagua R, López-Crisosto C, Rodríguez AE, Oyarzún AP, Kroemer G, Lavandro S. Dexamethasone-induced autophagy mediates muscle atrophy through mitochondrial clearance. *Cell Cycle*. 2014;13(14):2281-95. doi: 10.4161/cc.29272. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24897381; PMCID: PMC4111682.
37. Vaddavalli PL, Schumacher B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in cancer and aging. *Trends Genet*. 2022 Jun;38(6):598-612. doi: 10.1016/j.tig.2022.02.010. Epub 2022 Mar 25. PMID: 35346511.
38. Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA, Luscombe NM. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet*. 2009 Apr;10(4):252-63. doi: 10.1038/nrg2538. PMID: 19274049.

39. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009 May 1;137(3):413-31. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.037. PMID: 19410540.
40. Wang Y, Cui X, Lin Q, Cai J, Tang L, Liang Y. Active Peptide KF-8 from Rice Bran Attenuates Oxidative Stress in a Mouse Model of Aging Induced by d-Galactose. *J Agric Food Chem*. 2020 Nov 4;68(44):12271-12283. doi: 10.1021/acs.jafc.0c04358. Epub 2020 Sep 30. PMID: 32942847.
41. Zdanowicz R, Afanasyev P, Pruška A, Harrison JA, Giese C, Boehringer D, Leitner A, Zenobi R, Glockshuber R. Stoichiometry and architecture of the human pyruvate dehydrogenase complex. *Sci Adv*. 2024 Jul 19;10(29):eadn4582. doi: 10.1126/sciadv.adn4582. Epub 2024 Jul 17. PMID: 39018392; PMCID: PMC466950.