



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πτυχιακή Εργασία

Μιχαήλ Κωνσταντίνος του Γεωργίου

<<Διερεύνηση του ρόλου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στη διαφοροποίηση των μυοβλαστών της κυτταρικής σειράς C2C12 >>

<<Investigation of the role of glucocorticoid receptor in the differentiation of C2C12 myoblast cell line>>

Λάρισα 2022

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο: «Διερεύνηση του ρόλου του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στη διαφοροποίηση των μυοβλαστών της κυτταρικής σειράς C2C12» εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (ΤΒΒ), της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Ψαρρά Άννα-Μαρία: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ψαρρά Άννα-Μαρία: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Λεωνίδας Δημήτριος: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Βασιλική Σκαμνάκη: Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας – Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την υπεύθυνη καθηγήτρια της παρούσας διπλωματικής εργασίας κα. Ψαρρά Άννα-Μαρία, επίκουρη καθηγήτρια του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογιάς για την τιμή που μου έκανε, να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία και κατ' επέκταση να ολοκληρώσω τις σπουδές μου υπό την καθοδήγησή της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, την κα. Σκαμνάκη και τον κ. Λεωνίδα για τη βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Αξίζει πολλές ευχαριστίες και ο υποψήφιος διδάκτορας Αχιλλέας Γεωργαντόπουλος για την υπομονή και τη στήριξή του. Η καθοδήγησή και οι συμβουλές του ήταν πολύτιμες για την ολοκλήρωση της εργασίας, καθώς και για την αντιμετώπιση των δυσκολιών που συνάντησα. Ευχαριστώ ακόμα όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για το θερμό και φιλικό κλίμα που επικράτησε όλο το χρονικό διάστημα που βρισκόμουν στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την αγαπημένη μου αδερφή για την αδιάκοπη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια πού φοιτούσα.

## Contents

Περίληψη .....	5
Abstract .....	6
1.Εισαγωγή .....	8
1.1 Στεροειδείς Ορμόνες .....	8
1.2 Υποδοχείς Στεροειδών Ορμονών .....	9
1.3 Γλυκοκορτικοειδή .....	10
1.4 Μηχανισμός δράσης του Υποδοχέα των Γλυκοκορτικοειδών (GR) .....	11
1.5 Δομή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.....	12
1.6 Γενωμικές δράσεις του GR .....	13
1.7 Μη γενωμικές δράσεις του GR .....	15
1.8 Δράση του GR στα μιτοχόνδρια.....	16
1.9 Δράση των γλυκοκορτικοειδών σε σκελετικά μυϊκά κύτταρα και μυοβλάστες .....	18
1.10 Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας.....	20
2. Πειραματικό Μέρος.....	21
2.1 Αντιδραστήρια-Χημικά.....	21
2.2 Αναλώσιμα.....	21
2.3 Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιιεργειών .....	22
2.4 Όργανα.....	22
2.5 Τεχνικές Κυτταροκαλλιιεργειών .....	23
2.6 Ξεπάγωμα κυττάρων .....	23
2.7 Θρυψινοποίηση.....	24

2.8 Επίστρωση κυττάρων .....	25
2.9 Τεχνικές Ανοσοκυτταροχημείας .....	25
2.10 Χρώση μιτοχονδρίων .....	26
2.11 Μονιμοποίηση των κυττάρων .....	26
2.12 Χρώση πυρήνων και GR .....	27
3. Αποτελέσματα .....	28
3.1 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού του GR κατά τη διαφοροποίηση 10 ημερών στα C2C12.....	28
3.2 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού του GR κατά τη διαφοροποίηση 6 ημερών στα C2C12.....	32
3.3 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού του GR σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της διαφοροποίησης. ....	34
4. Συζήτηση .....	36
5. Βιβλιογραφία.....	40

## Περίληψη

Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν μια κατηγορία των στεροειδών ορμονών με το πιο γνωστό από αυτά, να είναι η κορτιζόλη. Οι ορμόνες αυτές είναι υψίστης σημασίας για πολλές διεργασίες του οργανισμού. Ειδικότερα, ρυθμίζουν πολλές διαδικασίες σχετικές με το μεταβολισμό των κυττάρων και ταυτόχρονα αποτελούν θεμέλιους ρυθμιστές του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα γλυκοκορτικοειδή δρουν κυρίως μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR), ο οποίος δρα γενωμικά ως μεταγραφικός παράγοντας τόσο πυρηνικών, όσο και μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενων γονιδίων, αλλά δρα και μη γενωμικά επηρεάζοντας διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια κινασών. Επιπλέον, έχει αναφερθεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία πως τα γλυκοκορτικοειδή δρουν και μέσω ενός GPCR υποδοχέα, γνωστό και ως GPR97. Εκτός από το μεταβολισμό και το ανοσοποιητικό σύστημα, ο GR

φαίνεται να είναι σημαντικός και για αναπτυξιακά στάδια όπως, η διαδικασία διαφοροποίησης διαφόρων τύπων κυττάρων, ειδικά αυτών των πνευμόνων. Επιπρόσθετα, υπάρχουν αναφορές πως τα γλυκοκορτικοειδή επιταχύνουν τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών και ενδέχεται να αποτελούν φαρμακολογικό μέσο αντιμετώπισης της μυϊκής δυστροφίας Duchenne.

Στα πλαίσια λοιπόν της παρούσας διπλωματικής εργασίας, στόχος μας είναι η διερεύνηση του ρόλου που ενδέχεται να διαδραματίζει ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR) στη διαφοροποίηση των μυοβλαστών σε μυοσωλήνες. Για το σκοπό αυτό, διεξήχθησαν πειράματα διαφοροποίησης στην κυτταρική σειρά μυοβλαστών ποντικού C2C12. Μετά τη διαδικασία διαφοροποίησης εφαρμόστηκαν τεχνικές ανοσοκυτταροχημείας και μικροσκοπικής παρατήρησης σε συνεστιακό μικροσκόπιο, με στόχο τον έλεγχο της υποκυτταρικής εντόπισης του υποδοχέα στα διάφορα στάδια της διαφοροποίησης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν υποκυτταρική μετακίνηση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών από το κυτταρόπλασμα των μη διαφοροποιημένων κυττάρων, στον πυρήνα κατά τη διαφοροποίηση αυτών, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών συμμετέχει μεταξύ άλλων παραγόντων στη διαδικασία της διαφοροποίησης, αφού εντοπίζεται στον πυρήνα από πολύ πρώιμο στάδιο και παραμένει εκεί στα διαφορετικά στάδια της διαδικασίας που ελέγχθηκαν.

## Abstract

Glucocorticoids are steroid hormones with the most well-known representative the cortisol. These hormones are of utmost importance for many processes in the body. Specifically, they regulate many processes regarding cell metabolism and are vital regulators of the immune system.

Glucocorticoids act mostly through the glucocorticoid receptor (GR), which not only functions in a genomic way as a transcription factor of both nuclear and mitochondrial genes, but also functions in a non-genomic way affecting various signal transduction pathways, including their respective kinases. In addition, it is well-known that glucocorticoids can also act through a GPCR, known as GPR97. Apart from metabolism and the immune system, GR seems important for developmental stages, such as the differentiation of multiple cell types, most notably those of the lungs. Additionally, there are references, that glucocorticoids accelerate the differentiation of myoblasts, and they might possibly be a means to fight off Duchenne muscular atrophy.

The aim of the study is the investigation of the role of GR in the differentiation process of myoblasts to myotubes. For this purpose, experiments were carried out, using the mouse myoblast cell line C2C12. We applied immunocytochemistry (ICC) and confocal microscopy in C2C12 differentiated and not differentiated cells, with the aim to investigate the subcellular localization of GR in the various stages of differentiation.

The results of the study have shown subcellular translocation of GR from the cytoplasm of non-differentiated cells, to the nucleus during differentiation. This is in accordance with the role of glucocorticoids, among other factors, in the differentiation process. This action is achieved via activation and translocation of GR from the cytoplasm to the nucleus from the very early stage to the latest stage of differentiation examined.

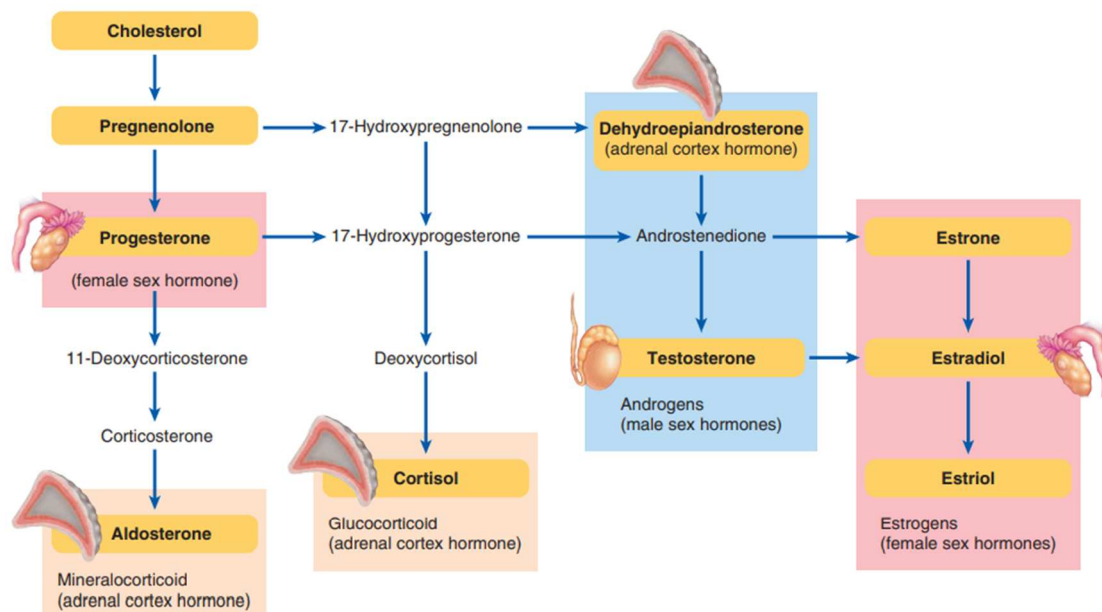
# 1.Εισαγωγή

## 1.1 Στεροειδείς Ορμόνες

Στεροειδείς ονομάζονται οι ορμόνες που έχουν ως πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη. Αποτελούν λιπόφιλα μόρια που συντίθενται από τα επινεφρίδια και τις γονάδες. Το αρχικό βήμα της βιοσύνθεσης των στεροειδών είναι η μετατροπή της χοληστερόλης σε προγνεολόνη. Ύστερα η προγνεολόνη μετατρέπεται στο εκάστοτε στεροειδές, ανάλογα με τα ενζυμικά μονοπάτια που είναι διαθέσιμα στον αντίστοιχο ιστό (Brook C.,Marshall N.,2004).

Οι στεροειδείς ορμόνες είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση πολλών βιολογικών διαδικασιών του οργανισμού, όπως: η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, ο μεταβολισμός και η αναπαραγωγή. Οι διαδικασίες αυτές ρυθμίζονται μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων. Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών, ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και διακρίνονται στους: υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptors, GRs), των αλατοκορτικοειδών (Mineralocorticoid Receptors, MRs) και τους υποδοχείς των ορμονών του φύλου, όπως αυτοί των ανδρογόνων (Androgen Receptors, ARs), των οιστρογόνων (Estrogen Receptors, ERs) και της προγεστερόνης (Progesterone Receptors,PRs) (Katzenellenbogen J. ,Katzenellenbogen B., 1996).



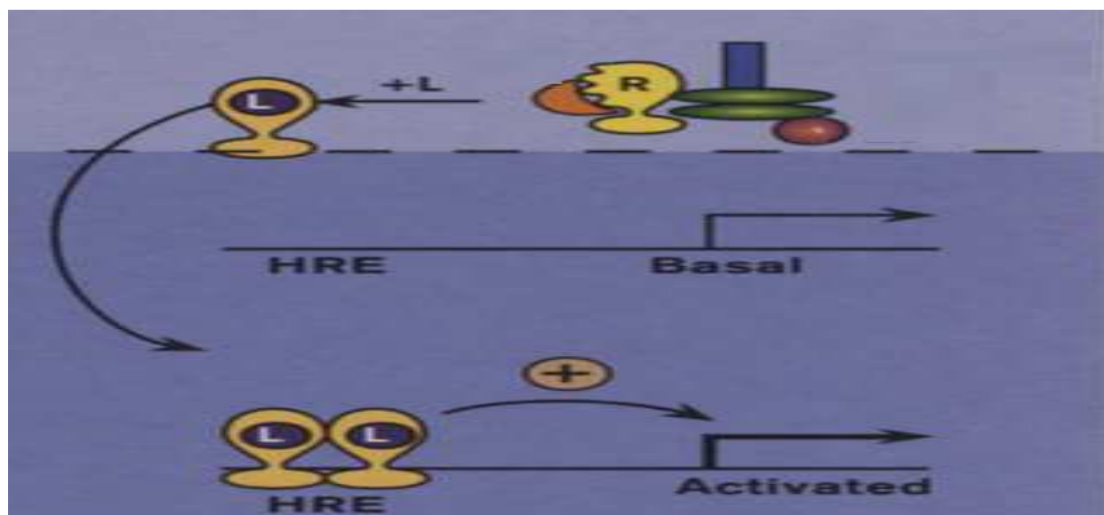


Εικόνα 1: Η πορεία βιοσύνθεσης στεροειδών ορμονών (Sherwood L., 2016, *Human Physiology*, 9<sup>th</sup> edition).

## 1.2 Υποδοχείς Στεροειδών Ορμονών

Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών αποτελούν υποοικογένεια πρωτεϊνών μιας ευρύτερης οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων. Εντοπίζονται στις μεμβράνες του κυττάρου, στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και ορισμένοι εντοπίζονται και στα μιτοχόνδρια (Psarra A., Sekeris C., 2008). Η υποκυτταρική εντόπισή τους είναι βασική για τη λειτουργία τους ως μεταγραφικοί παράγοντες, καθώς με αυτόν τον τρόπο καθίσταται δυνατή η άμεση προσβασή τους στο DNA του κυττάρου. Στην ανενεργή τους μορφή, οι υποδοχείς των στεροειδών ορμονών σχηματίζουν σύμπλοκα με διάφορες πρωτεΐνες όπως οι πρωτεΐνες-συνοδοί (chaperones). Η αλληλεπίδραση αυτή αποτρέπει τους υποδοχείς να εισέλθουν στον πυρήνα και να ρυθμίσουν την μεταγραφή γονιδίων στόχων. Με την παρουσία της αντίστοιχης στεροειδούς ορμόνης, γίνεται λύση του συμπλόκου κι ο υποδοχέας ενεργοποιημένος πλέον, εισέρχεται στον πυρήνα με τη μορφή ομοδιμερούς ή ετεροδιμερούς, προκαλώντας ρύθμιση στην έκφραση γονιδίων στόχων. Οι υποδοχείς αναγνωρίζουν τα γονίδια στόχους μέσω ειδικών αλληλουχιών, που αποτελούν ειδικά στοιχεία απόκρισης των ορμονών, ονόματι hormone response elements (HREs). Τα HREs

εντοπίζονται ανοδικά των γονιδίων και αποτελούν τις θέσεις πρόσδεσης των υποδοχέων στο DNA (Katzenellenbogen J., Katzenellenbogen B., 1996).



Εικόνα 2: Ενεργοποίηση και λειτουργία των υποδοχέων στεροειδών ορμονών (Katzenellenbogen J., Katzenellenbogen B., 1996).

### 1.3 Γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι μια από τις τρεις κατηγορίες των στεροειδών ορμονών και παράγονται στη στηλιδωτή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων. Το βασικότερο γλυκοκορτικοειδές είναι η κορτιζόλη, η οποία αποτελεί και τον ενδογενή προσδέτη του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR). Τα γλυκοκορτικοειδή όπως η κορτιζόλη, διαδραματίζουν κομβικό ρόλο σε μια πληθώρα μεταβολικών διαδικασιών, μέσω των οποίων συμβάλλουν στην ανταπόκριση του οργανισμού στο στρες. Ειδικότερα, η κορτιζόλη επάγει τη γλυκονεογένεση στο ήπαρ, τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό και τον καταβολισμό των πρωτεϊνών στους μύες. Επιπλέον, αναστέλλει την πρόσληψη γλυκόζης από άλλους ιστούς, εκτός του εγκεφάλου. Όλα τα παραπάνω, έχουν ως απώτερο στόχο την αύξηση της διαθέσιμης γλυκόζης και την αξιοποίησή της από τον εγκέφαλο κατά τη διάρκεια στρεσογόνων γεγονότων (Sherwood L., 2016).

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των γλυκοκορτικοειδών είναι ότι διαθέτουν σημαντικές ανοσοκατασταλτικές δράσεις, καθιστώντας τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, ιδανικό στόχο φαρμάκων ενάντια στα αυτοάνοσα νοσήματα και στις αλλεργίες (Vandewalle J., Luypaert A., De Bosscher K., Libert C., 2017). Μέσω των αντιφλεγμονωδών και ανοσοκατασταλτικών δράσεών τους, αναστέλλουν την ανοσολογική απόκριση σε πολλά επίπεδα, όπως στην παραγωγή αντισωμάτων και προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Με τον τρόπο αυτό, χημικά ανάλογα της κορτιζόλης θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν στην αντιμετώπιση αντίστοιχων προβλημάτων υγείας. Αν και τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν μια εναλλακτική με πολλές προοπτικές ενάντια σε αυτοάνοσες παθήσεις και ασθένειες, πρέπει να σημειωθεί πως η χρόνια λήψη τους, ειδικά σε μεγάλες δόσεις, επιφέρει δυσάρεστες επιπτώσεις, όπως καρδιαγγειακά προβλήματα, οστεοπόρωση ή ευαισθησία σε μολύνσεις (Vandewalle J., Luypaert A., De Bosscher K., Libert C., 2017). Για αυτούς τους λόγους απαιτείται διεξοδική μελέτη των λειτουργιών τους, καθώς και του τρόπου δράσης τους σε κάθε ιστό, δεδομένου ότι αυτός ανταποκρίνεται στα γλυκοκορτικοειδή με διαφορετικό τρόπο.

#### 1.4 Μηχανισμός δράσης του Υποδοχέα των Γλυκοκορτικοειδών (GR)

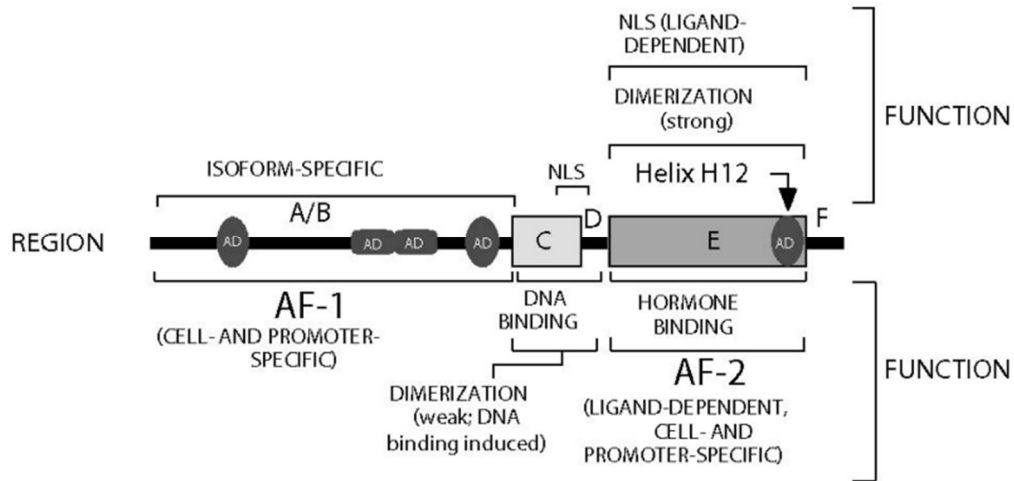
Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών ορμονών, οι οποίοι δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Ο κύριος μηχανισμός δράσης και σηματοδότησης του GR είναι ο γενωμικός, που πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης του με το γενετικό υλικό του κυττάρου. Οι γενωμικές δράσεις του GR χαρακτηρίζονται ως <<αργές>>, δεδομένου ότι απαιτούνται ώρες προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ρύθμιση στην έκφραση των γονιδίων στόχων του GR. Από την άλλη πλευρά, αυξάνεται ολοένα και περισσότερο, η επιστημονική βιβλιογραφία που σχετίζεται με τις <<γρήγορες>>, μη γενωμικές δράσεις του GR (Panettieri R., Schaafsma D., Amrani Y., Koziol-White C., Ostrom R., Tliba O., 2019). Πρόκειται για δράσεις που συμβαίνουν μέσα σε λίγα λεπτά ή δευτερόλεπτα κι αντιθέτως με τις γενωμικές που αφορούν το DNA, οι μη γενωμικές αφορούν σηματοδοτικά μονοπάτια κινασών, όπως είναι οι MAPKs, η PI3K

κι η Akt. Αξίζει να σημειωθεί, ότι πέρα από τον GR, τα γλυκοκορτικοειδή δρουν μη γενωμικά και μέσω του μεμβρανικού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών GPR97, ενός GPCR που παρουσία γλυκοκορτικοειδούς αυξάνει τη συγκέντρωση της ενδοκυτταρικής cAMP, ενεργοποιώντας την PKA (Hsiao C. et al, 2018).

### 1.5 Δομή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών

Η δομή των πυρηνικών υποδοχέων στεροειδών ορμονών είναι παρόμοια, ανεξάρτητα από την ορμόνη που προσδέεται σε αυτούς. Επομένως, οι κύριες περιοχές των υποδοχέων αυτών όπως και του GR είναι τρεις: η πρώτη είναι η αμινοτελική περιοχή (NTD), η δεύτερη είναι η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA (DNA binding domain, DBD) και η τρίτη είναι η καρβοξυτελική περιοχή, στην οποία γίνεται και η πρόσδεση του προσδέτη (ligand binding domain, LBD), όπως η κορτιζόλη (Heitzer M. et al, 2007).

Σε αυτές τις τρεις περιοχές περιέχονται αλληλουχίες αμινοξέων που προσδίδουν στον υποδοχέα όλες του τις ιδιότητες. Ειδικότερα, η περιοχή AF-1 που εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο φέρει διαφορετική αλληλουχία αμινοξέων από κύτταρο σε κύτταρο, με αποτέλεσμα να προσδίδει τις διαφορετικές δράσεις του υποδοχέα. Η ίδια περιοχή επίσης ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων ανεξάρτητα από την παρουσία προσδέτη. Η DBD πέρα από το γεγονός ότι προσδέεται στο DNA, περιέχει κι αμινοξικές αλληλουχίες υπεύθυνες για την αγκυροβόληση στον πυρήνα και το διμερισμό του GR. Τέλος, η περιοχή AF-2 που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο έχει ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με την AF-1 ως προς την αναγνώριση των γονιδίων-στόχων, με την ειδοποιό διαφορά ότι εφόσον εντοπίζεται στην περιοχή LBD, η λειτουργία της απαιτεί την πρόσδεση γλυκοκορτικοειδούς. Τέλος, η AF-2 παίζει καθοριστικό ρόλο στο διμερισμό του GR, καθώς η πρόσδεση ορμόνης σταθεροποιεί τη σύνδεση των διμερών (Germain P. et al, 2003).



Εικόνα 3: Αναλυτική απεικόνιση της δομής των υποδοχέων στεροειδών ορμονών (P. Germain, L. Altucci, W. Bourguet, C. Rochette-Egly and H. Gronemeyer, 2003).

## 1.6 Γενωμικές δράσεις του GR

Οι γενωμικές δράσεις του GR οφείλονται στο γεγονός ότι μετά την πρόσδεση της ορμόνης, αυτός διμερίζεται και το σύμπλοκο ορμόνης και υποδοχέα μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Εκεί, προσδέεται σε ειδικές αλληλουχίες που βρίσκονται στα γονίδια στόχους του GR, γνωστές και ως glucocorticoid response elements ή GREs. Η πρόσδεση αυτή προσελκύει άλλες πρωτεΐνες, που μαζί με το διμερές του GR δημιουργούν ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο στο DNA, το οποίο τελικά θα ρυθμίσει την έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου.

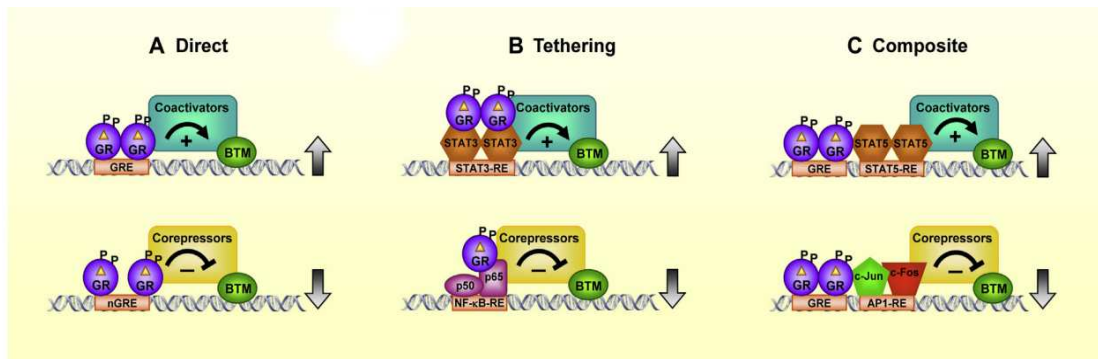
Ο GR ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων μέσω τριών διαφορετικών μηχανισμών. Ο πρώτος μηχανισμός είναι άμεσος, με πρόσδεση του διμερούς του GR στα GREs και τη στρατολόγηση άλλων πρωτεϊνών, γνωστές ως συμπαραγόντες (cofactors). Ανάλογα την αλληλουχία των GREs έχουμε στρατολόγηση των αντίστοιχων συμπαραγόντων, κάτι που ουσιαστικά καθορίζει αν η μεταγραφή του γονιδίου θα ενεργοποιηθεί ή θα ανασταλλεί. Η επικρατούσα αλληλουχία των GREs που οδηγεί σε ενεργοποίηση ή επαγωγή της μεταγραφής του αντίστοιχου γονιδίου είναι η GGAACAnnnTGTTCT, ενώ η αντίστοιχη επικρατούσα αλληλουχία που υποδεικνύει αναστολή της μεταγραφής είναι η CTCC(n)<sub>0-2</sub>GGAGA (Oakley R., Cidlowski J., 2013). Τα GREs με την τελευταία αλληλουχία χαρακτηρίζονται ως negative GREs (nGREs). Κατά τον άμεσο τρόπο

δράσης του GR η πρόσδεσή του σε GREs οδηγεί στη στρατολόγηση συμπαραγόντων ενεργοποίησης μεταγραφής (coactivators), ενώ η πρόσδεση του σε nGRE οδηγεί στη στρατολόγηση συμπαραγόντων αναστολής της μεταγραφής (corepressors). Ως coactivators και corepressors χαρακτηρίζονται ένζυμα που τροποποιούν τη δομή της χρωματίνης αντίστοιχα, ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση των γονιδίων-στόχων του GR (Oakley R., Cidlowski J., 2013).

Στο δεύτερο μηχανισμό πραγματοποιείται η δέσμευση του GR, είτε ως μονομερές, είτε ως διμερές σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, κάτι που ομοίως με τον προηγούμενο μηχανισμό οδηγεί στη στρατολόγηση cofactors. Η βασική διαφορά με τον πρώτο μηχανισμό είναι ότι ο GR δε συνδέεται σε κάποια GREs, αλλά αντιθέτως η αλληλουχία DNA που αναγνωρίζεται είναι το αντίστοιχο response element (RE) κάποιου άλλου μεταγραφικού παράγοντα που συμμετέχει στη δημιουργία του συμπλόκου. Συνήθως, το αντίστοιχο σύμπλοκο προκύπτει από αλληλεπιδράσεις του GR με μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας STAT, μια βασική αλληλεπίδραση για τη ρύθμιση γονιδίων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Rogatsky I., Ivashkin L., 2006). Από αυτό τον μηχανισμό συμπεραίνουμε ότι ο GR μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων ακόμα και χωρίς την παρουσία κάποιας αλληλουχίας GRE.

Τέλος, ο τρίτος μηχανισμός μοιάζει με έναν συνδυασμό των άλλων δύο. Συγκεκριμένα, διμερή του GR προσδένονται σε κάποιο GRE γειτονικά ενός RE που αναγνωρίζεται από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Κατόπιν αλληλεπιδρά με τους γειτονικούς μεταγραφικούς παράγοντες και η αλληλεπίδραση αυτή, ενδεχομένως, προσελκύει διαφορετικούς cofactors από ότι εάν είχαμε την παρουσία ενός μόνο μεταγραφικού παράγοντα (Oakley R., Cidlowski J., 2013).

Ο τελευταίος μηχανισμός δείχνει ξεκάθαρα την πολυπλοκότητα που χαρακτηρίζει τις γενωμικές δράσεις του GR, καθιστώντας ξεκάθαρη την ανάγκη εντατικής μελέτης αυτού του μεταγραφικού παράγοντα.



Εικόνα 4: Οι τρεις μηχανισμοί γενωμικής δράσης του GR. (A) Άμεσος μηχανισμός: Πρόσδεση σε GREs και στρατολόγηση των cofactors. (B) Μηχανισμός συμπλοκοποίησης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες- ανεξάρτητος από GREs. (C) Αλληλεπίδραση με γειτονικούς μεταγραφικούς παράγοντες (R. H. Oakley, and J. A. Cidlowski, 2013).

## 1.7 Μη γενωμικές δράσεις του GR

Οι μη γενωμικές ή <<έμμεσες>> δράσεις του GR οφείλονται στο γεγονός ότι ο GR, απουσία γλυκοκορτικοειδούς, δημιουργεί σύμπλοκα με διάφορες πρωτεΐνες, όπως η HSP90 και η κινάση Src. Η Src δημιουργεί σύμπλοκο, τόσο με τον GR που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, όσο και με μορφές του που εντοπίζονται αγκυροβολημένες στην κυτταρική και μιτοχονδριακή μεμβράνη (Boncompagni S. et al, 2015). Παρουσία γλυκοκορτικοειδούς η Src απελευθερώνεται από τα σύμπλοκα με τον GR κι ενεργοποιεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως των MAPKs, της PI3K και της Akt προκαλώντας μη γενωμική σηματοδότηση. Παραδείγματα τέτοιας σηματοδότησης ρυθμιζόμενης από τα γλυκοκορτικοειδή είναι η κινητοποίηση ασβεστίου, η αύξηση των ROS κι η ρύθμιση μονοπατιών απόπτωσης (Panettieri R. et al, 2019).

Επιπρόσθετα, μη γενωμικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών διεκπεραιώνονται, εκτός από τη λύση συμπλόκου GR-Src, κι από τον υποδοχέα GPR97. Ο GPR97 είναι ένας GPCR που, παρουσία γλυκοκορτικοειδούς, αυξάνει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση της cAMP ενεργοποιώντας την PKA. Η PKA με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί ή απενεργοποιεί πληθώρα κινασών, επηρεάζοντας πολλά

σηματοδοτικά μονοπάτια, καθώς επίσης ρυθμίζει και τη λειτουργία πολυάριθμων μεταγραφικών παραγόντων (Hsiao C. et al, 2018).

Συμπερασματικά, τα γλυκοκορτικοειδή και κατά επέκταση ο GR αποτελούν σημαντικούς, πολυδιάστατους ρυθμιστές της συνολικής φυσιολογίας του κυττάρου.

### 1.8 Δράση του GR στα μιτοχόνδρια

Οι γενωμικές δράσεις του GR που προαναφέρθηκαν δεν περιορίζονται μόνο στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων του πυρήνα αλλά και των μιτοχονδρίων.

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν γενετικά ημιαυτόνομα κυτταρικά οργανίδια, καθώς διαθέτουν το δικό τους γενετικό υλικό. Η βασικότερη λειτουργία τους είναι η παραγωγή ενέργειας για το κύτταρο μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση απαιτεί τη λειτουργία και συνεργασία πρωτεϊνών, καθεμία από τις οποίες δομείται από ένα σύνολο πρωτεϊνικών υπομονάδων. Οι υπομονάδες αυτές παράγονται τόσο από γονίδια του πυρήνα, όσο και από γονίδια των μιτοχονδρίων. Η ρύθμιση αυτή, είναι μια διαδικασία που επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τα γλυκοκορτικοειδή και κατά επέκταση από τον GR και πραγματοποιείται τόσο άμεσα όσο και έμμεσα.

Η άμεση ρύθμιση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος από τον GR οφείλεται στην παρουσία ομόλογων αλληλουχιών με GREs στη ρυθμιστική περιοχή D-loop, μια περιοχή που ρυθμίζει την έκφραση όλων των μιτοχονδριακών γονιδίων (Psarra A., Sekeris C., 2009). Παρόμοιες αλληλουχίες έχουν βρεθεί και σε άλλα σημεία του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, όπως στο γονίδιο του 12S rRNA (Psarra A., Sekeris C., 2011).

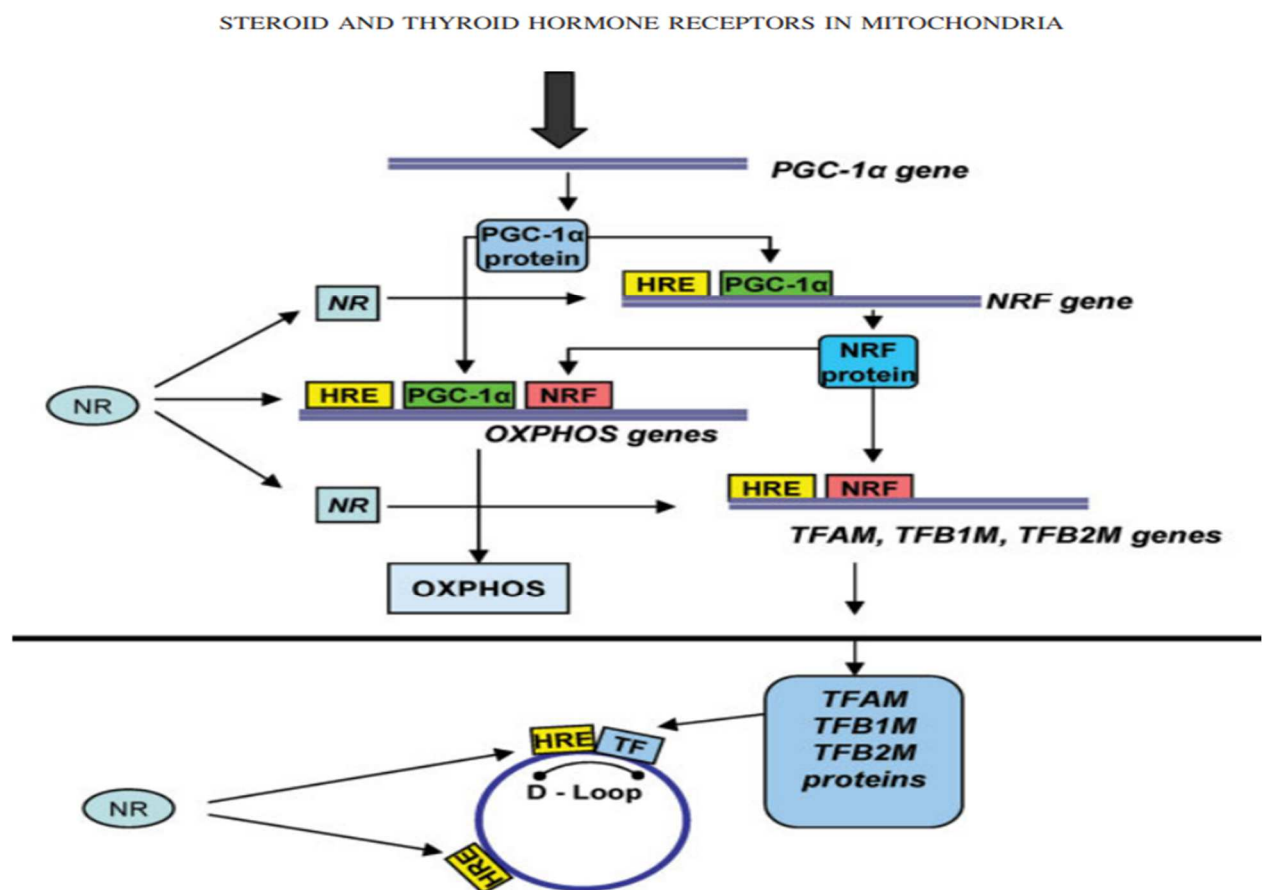
Έμμεση ρύθμιση της έκφρασης μιτοχονδριακών γονιδίων από τον GR παρατηρούμε στην περίπτωση επαγωγής των πυρηνικών γονιδίων που παράγουν ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες των μιτοχονδρίων. Ειδικότερα, οι μιτοχονδριακοί μεταγραφικοί παράγοντες TFAM, TFB1M, TFB2M αυξάνονται παρουσία γλυκοκορτικοειδούς (Psarra A., Sekeris C.,



2011). Ομοίως, ο GR ενεργοποιεί το πυρηνικό γονίδιο που παράγει το μεταγραφικό παράγοντα NRF. Ο NRF είναι επίσης υπεύθυνος για την αύξηση των επιπέδων των TFAM, TFB1M και TFB2M (Psarra A., Sekeris C., 2008).

Η αύξηση των παραπάνω μεταγραφικών παραγόντων οδηγεί στην ενεργοποίηση μιτοχονδριακών γονιδίων, όπως αυτών που σχετίζονται με την OXPHOS. Σημειώνεται ότι ο NRF ενεργοποιεί και πυρηνικά γονίδια που σχετίζονται με την OXPHOS.

Συμπερασματικά, ο GR είναι βασικός μεταγραφικός παράγοντας όχι μόνο για το πυρηνικό γονιδίωμα, αλλά για το συνολικό γονιδίωμα του κυττάρου.



Εικόνα 5: Ρύθμιση πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων από πυρηνικούς υποδοχείς (Anna-Maria G. Psarra and Constantine E. Sekeris, 2008).

## 1.9 Δράση των γλυκοκορτικοειδών σε σκελετικά μυϊκά κύτταρα και μυοβλάστες

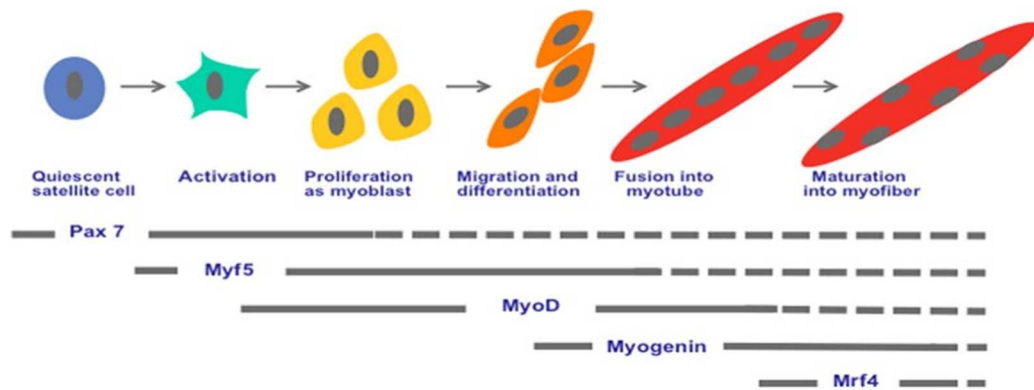
Τα γλυκοκορτικοειδή χαρακτηρίζονται από πολυπλοκότητα ως προς τη μελέτη τους, επειδή ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου στον οποίο δρουν, ενδέχεται να έχουν διαφορετικές έως τελείως αντίθετες δράσεις. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι οι δράσεις των γλυκοκορτικοειδών σε διαφοροποιημένα σκελετικά μυϊκά κύτταρα και στους αντίστοιχους μυοβλάστες.

Σε διαφοροποιημένα σκελετικά μυϊκά κύτταρα (μυϊκές ίνες) δρουν αντι-αναβολικά, αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση και καταβολικά, αυξάνοντας την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (Schakman O., Kalista S., Barbé C., Loumaye A., Thissen J., 2013). Στην αποικοδόμηση αυτή οφείλεται η απώλεια μυϊκής μάζας (μυϊκή ατροφία) που παρατηρείται σε ασθενείς που κάνουν μακροχρόνια λήψη γλυκοκορτικοειδών (Vandewalle J., Luypaert A., De Bosscher K., Libert C., 2017). Τα γλυκοκορτικοειδή δρουν γενωμικά μέσω του GR ρυθμίζοντας την έκφραση πληθώρας γονιδίων που, είτε συμμετέχουν άμεσα στα μονοπάτια σύνθεσης ή καταβολισμού των πρωτεϊνών, είτε αποτελούν ρυθμιστικά στοιχεία των πρωτεϊνών αυτών. Ειδικότερα, ο GR ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων του μονοπατιού των κινασών PI3K/Akt, του οποίου η αναστολή οδηγεί σε μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης. Για παράδειγμα, ο GR αυξάνει την p85-ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K-μειώνοντας τη δραστηριότητά της, ενώ συγχρόνως μειώνει την παραγωγή IGF-I που αποτελεί τον βασικό ενεργοποιητή του μονοπατιού αυτού. Αυτές οι δύο δράσεις του GR συμβάλλουν στον περιορισμό της ενεργότητας του μονοπατιού PI3K/Akt προκαλώντας αντι-αναβολικές δράσεις. Από την άλλη, ο GR δρα και καταβολικά, αυξάνοντας την έκφραση πολλών παραγόντων ατροφίας, όπως οι FOXO1, FOXO3a και πολλοί παράγοντες που συμμετέχουν στο μονοπάτι αποικοδόμησης της ουβικουιτίνης.

Παρά τις καταβολικές αυτές δράσεις, τα γλυκοκορτικοειδή φαίνεται να έχουν φαρμακολογική σημασία στην καταπολέμηση της μυϊκής δυστροφίας Duchenne, (Pas M., Jong P., Verburg F., 2000), ενώ σε φυσιολογικές-ενδογενείς δόσεις επιταχύνουν τη διαφοροποίηση (Belanto J. et al, 2010). Πώς όμως αυτό είναι δυνατό δεδομένων όλων

των παραπάνω; Οι παρατηρήσεις αυτές έχουν γίνει στους αντίστοιχους μυοβλάστες που ουσιαστικά αποτελούν τα μη διαφοροποιημένα σκελετικά μυϊκά κύτταρα (Fang X., Song Z., Xie M., Liu Y., Zhang W., 2020). Σε αυτά τα κύτταρα, τα γλυκοκορτικοειδή φαίνεται να περιορίζουν την ταχύτητα κυτταρικής διαίρεσης, η οποία αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό των βλαστικών κυττάρων. Ο περιορισμός της ταχύτητας διαίρεσης σε βλαστικά κύτταρα, πάντα συνοδεύεται από τάση των βλαστικών κυττάρων για διαφοροποίηση, που σημαίνει έκφραση των αντίστοιχων γονιδίων.

Η διαφοροποίηση των μυοβλαστών αρχίζει με την έκφραση γονιδίων ειδικών μεταγραφικών παραγόντων, γνωστοί ως MRFs (myogenic regulatory factors). Καθένας MRF εκφράζεται σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα της διαδικασίας διαφοροποίησης, με αποτέλεσμα η παρουσία του εκάστοτε MRF να υπαγορεύει το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η διαδικασία (Charge S., Rudnicki M., 2004, Zanou N., Gailly P., 2013). Χαρακτηριστικά, ο μεταγραφικός παράγοντας Myf5 διατηρεί την ακεραιότητα των μυοβλαστών, έτσι ώστε να έχουμε αυξημένη κυτταρική διαίρεση κι επομένως καθόλου διαφοροποίηση. Η έκφραση του Myf5 ακολουθείται από την έκφραση του γονιδίου της MyoD. Η MyoD αποτελεί τον σημαντικότερο MRF, επειδή σηματοδοτεί την έναρξη της διαφοροποίησης (Zanou N., Gailly P., 2013), ενώ υπάρχουν και αναφορές ότι ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων σε συνεργασία με τον GR (Rovito D. et al, 2021). Σε *in vitro* πειράματα διαφοροποίησης μυοβλαστών που ως αρχικό χρονικό σημείο αναφοράς έχουν τη μέρα επίστρωσης των κυττάρων (day 0), η MyoD παράγεται περίπου την πέμπτη μέρα. Ουσιαστικά εκείνη την ημέρα έχουμε τον περιορισμό της κυτταρικής διαίρεσης (late proliferation) και την αρχή της διαφοροποίησης (early differentiation), όπως προαναφέρθηκε. Κατά την έβδομη μέρα, έχουμε την παραγωγή μυογενίνης, ενός MRF που σηματοδοτεί τη σύντηξη των κυττάρων προς σχηματισμό μυϊκών ινών. Τέλος, μερικές μέρες μετά τη σύντηξη παρατηρούμε την παραγωγή μυοσίνης και του μεταγραφικού παράγοντα Mrf4 που υποδεικνύει το τέλος της διαφοροποίησης, καθώς οι μυοβλάστες έχουν πλέον σχηματίσει πλήρως διαφοροποιημένες μυϊκές ίνες (Zanou N., Gailly P., 2013, Larson A., Syverud B., Florida S., Rodriguez B., Pantelic M., Larkin L., 2018, Han D., Yang W., Kao T., 2017).



Εικόνα 6: Η διαδικασία διαφοροποίησης μυοβλαστών *in vitro* και οι κομβικοί μεταγραφικοί παράγοντες MRF που τη συνοδεύουν (Nadège Zanou · Philippe Gailly, 2013).

### 1.10 Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας

Από την παγκόσμια βιβλιογραφία φαίνεται πως τα γλυκοκορτικοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των μυοβλαστών. Θεωρήσαμε αυτές τις δράσεις εξαιρετικά ενδιαφέρουσες δεδομένου ότι συνοδεύουν την ίδια διαδικασία τόσο σε φυσιολογικές, όσο και παθολογικές συνθήκες. Σκοπός λοιπόν της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να διερευνήσουμε πώς διαφοροποιείται ο υποκυτταρικός εντοπισμός του GR κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης των μυοβλαστών της κυτταρικής σειράς C2C12.

## 2. Πειραματικό Μέρος

### 2.1 Αντιδραστήρια-Χημικά

- ❖ Χρωστική MitoTracker Red CMX-Ros (Thermo Fisher Scientific)
- ❖ Χρωστική Hoechst-33342 (Sigma)
- ❖ Αντίσωμα έναντι του GR, G-5 (Santa Cruz)
- ❖ Αντίσωμα συζευγμένο με χρωστική Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific)
- ❖ PBS 10X (Phosphate-Buffered Saline) (Gibco)
- ❖ Απορρυπαντικό Tween 20 (Sigma)
- ❖ PBST 1X (παρασκευάζεται με την ανάμειξη PBS 1X και 0,1% v/v Tween 20)
- ❖ Μεθανόλη (Sigma)
- ❖ Ακετόνη (Sigma)
- ❖ Ορός αλόγου (horse serum-HS, μέσο διαφοροποίησης) (Sigma)
- ❖ Βόειος ορός (fetal bovine serum-FBS) (Gibco)
- ❖ Θρυψίνη-EDTA 5% 10X (Gibco)
- ❖ Πολυβυνιλική αλκοόλη (PVA)

### 2.2 Αναλώσιμα

- ❖ Σιφώνια των 2,5,10 και 25ml (Sarstedt)
- ❖ Πιπέττες (μέγιστου όγκου 2μl,20μl, 200 μl, 1000 μl)
- ❖ Ρύγχοι-tips για τις αντίστοιχες πιπέττες (Sarstedt)
- ❖ Σωλήνες falcon (15ml και 50ml) (Sarstedt)
- ❖ Σωληνάκια Eppendorf (1,5ml) (Sarstedt)
- ❖ Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας με 6 θέσεις (6-well plates) (Sarstedt)
- ❖ Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας με 24 θέσεις (24-well plates) (Sarstedt)
- ❖ Τετράγωνες καλυπτρίδες (Sigma)
- ❖ Αντικειμενοφόρες πλάκες (Sigma)
- ❖ Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας T-75 (Sarstedt)
- ❖ Ειδικά σωληνάκια για το πάγωμα των κυττάρων (cryovials) (Sarstedt)

## 2.3 Θρεπτικά υλικά κυτταροκαλλιεργειών

- DMEM high glucose 4.5g/mol with phenol red [+] L-glutamate, [-] pyruvate
- DMEM high glucose 4.5g/mol without phenol red [+] L-glutamate, [-] pyruvate

Τα παραπάνω θρεπτικά υλικά εμπλουτίστηκαν με 10% FBS (Fetal Bovine Serum) και 1% L-γλουταμίνης (απαραίτητο για τα κύτταρα αμινοξύ). Επίσης προστέθηκε 1% πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη για προστασία του θρεπτικού μέσου από επιμολύνσεις.

## 2.4 Όργανα

- ❖ Επωαστήρας (Incubator) (New Brunswick Galaxy 170S)
- ❖ Laminar Flow Hood (Tel Star AV-30/70)
- ❖ Υδατόλουτρο (P-Selecta)
- ❖ Ανάστροφο Μικροσκόπιο (A. Kruss Optronic Germany)
- ❖ Αιμοκυτταρόμετρο (πλάκα Neubauer)
- ❖ Φυγόκεντρος (Eppendorf)
- ❖ Νυστέρι
- ❖ Λαβίδα
- ❖ Συνεστιακό Μικροσκόπιο (Zeiss)

## 2.5 Τεχνικές Κυτταροκαλλιιεργειών

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σειρά C2C12. Τα κύτταρα της σειράς αυτής αποτελούν σκελετικούς μυοβλάστες ποντικού. Ως μυοβλάστες, τα κύτταρα της σειράς C2C12 διαιρούνται με ταχύ ρυθμό και συγχρόνως καταναλώνουν γρήγορα το θρεπτικό υλικό στο οποίο βρίσκονται. Για το λόγο αυτό, απαιτούν αλλαγή θρεπτικού μέσου και κατά επέκταση επανακαλλιέργεια κάθε 2 ημέρες, ανάλογα και τον αρχικό αριθμό των κυττάρων της φλάσκας.

Επιπλέον, αξίζει να ειπωθεί ότι τα C2C12 διαιρούνται και παραμένουν μυοβλάστες παρουσία εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου (DMEM high glucose 4.5g/mol with phenol red [+] L-glutamate, [-] pyruvate) με 10% FBS, ενώ αντιθέτως διαφοροποιούνται προς μυικές ίνες στο ίδιο θρεπτικό μέσο παρουσία 2% horse serum (HS), χωρίς FBS. Αυτές είναι και οι συνθήκες κυτταρικής διαίρεσης και διαφοροποίησης που χρησιμοποιήθηκαν και στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

## 2.6 Ξεπάγωμα κυττάρων

Για να δημιουργήσουμε μια καλλιέργεια κυττάρων C2C12, απαιτείται το ξεπάγωμα των κυττάρων, που φυλάσσονται σε ειδικά cryovials είτε στους -80°C είτε στους -120°C.

Αρχικά τοποθετούμε το cryovial σε υδατόλουτρο (37° C) μέχρι να ξεπαγώσει το περιεχόμενο. Στη συνέχεια μεταφέρουμε τα κύτταρα από το cryovial σε ένα falcon των 15ml και προσθέτουμε 9ml πλήρους (εμπλουτισμένου) θρεπτικού υλικού DMEM high glucose 4.5g/mol with phenol red [+] L-glutamate, [-] pyruvate. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και μετά το πέρας αυτής απομακρύνουμε το υπερκείμενο και κρατάμε το

ίζημα (κύτταρα). Τέλος, επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας.

## 2.7 Θρυψινοποίηση

Η θρυψινοποίηση είναι μια απαραίτητη τεχνική για το χειρισμό των κυττάρων, διότι επιτρέπει τη διαιώνιση της κυτταρικής σειράς, έτσι ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, χωρίς να απαιτείται ξεπάγωμα νέων κυττάρων από το stock. Χρησιμοποιείται όταν τα κύτταρα μιάς καλλιέργειας σε φλάσκα έχουν καταλάβει το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς της (70%-80% confluency). Σε αυτό το σημείο η καλλιέργεια πρέπει να διακοπεί, επειδή ο χώρος εντός της φλάσκας δεν επιτρέπει επιπλέον επέκταση της καλλιέργειας.

Η θρυψινοποίηση βασίζεται στο πρωτεολυτικό ένζυμο θρυψίνη, το οποίο διασπά τους πεπτιδικούς δεσμούς που κρατούν σταθερά τα κύτταρα στην επιφάνεια της φλάσκας, διευκολύνοντας την αφαίρεση κυττάρων από αυτή.

Η διαδικασία λαμβάνει χώρα στο hood κι αρχίζει με την αφαίρεση του θρεπτικού μέσου που υπάρχει ήδη στη φλάσκα. Ύστερα, προσθέτουμε μία ποσότητα θρυψίνης, ώστε να καλύπτει οριακά όλη την επιφάνεια της φλάσκας και στη συνέχεια τοποθετούμε τη φλάσκα στον επωαστήρα για ελάχιστα λεπτά. Η έκθεση των κυττάρων στη θρυψίνη πρέπει να είναι ολιγόλεπτη, επειδή μεγάλα χρονικά διαστήματα έκθεσης σε πρωτεολυτικά ένζυμα έχουν κυτταροτοξικές επιπτώσεις. Μετά τη δράση του ενζύμου, προσθέτουμε στη φλάσκα την απαραίτητη ποσότητα θρεπτικού υλικού (τέσσερις φορές τον όγκο της θρυψίνης), ώστε να ανασταλλεί η δράση του ενζύμου. Στη συνέχεια, μεταφέρουμε όλο το περιεχόμενο της φλάσκας σε ένα falcon, το οποίο φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα 1000rpm σε θερμοκρασία δωματίου (20°C-25°C). Απομακρύνουμε το υπερκείμενο (θρεπτικό και θρυψίνη) και



επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε νέο θρεπτικό υλικό. Από αυτό το σημείο τα κύτταρα είναι έτοιμα για επανακαλλιέργεια σε νέα φλάσκα ή για επίστρωση πειράματος σε κάποιο plate κυτταροκαλλιέργειας.

## 2.8 Επίστρωση κυττάρων

Από τα κύτταρα που διαθέτουμε και είναι διαλυτοποιημένα στο falcon μετά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, αφαιρούμε 10μl και τα αποθηκεύουμε σε errendorf για χρήση εκτός του hood.

Αυτά τα 10μl τοποθετούνται σε πλάκα Neubauer και με τη βοήθεια αυτής μετράμε τα κύτταρα με παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια κάνουμε αναγωγή στη μονάδα για να βρούμε τον αριθμό των κυττάρων που περιέχονται σε 1ml. Με τον τρόπο αυτό, μπορούμε να υπολογίσουμε τον συνολικό αριθμό των κυττάρων που έχουμε στο falcon και κατόπιν πόσα ml από αυτό θα χρειαστούμε για τη δημιουργία καλλιέργειας σε φλάσκα ή την επίστρωση για το πείραμα που μας ενδιαφέρει. Πρέπει να σημειωθεί ότι για να στρωθεί σωστά η καλλιέργεια λαμβάνουμε υπόψιν τον μέγιστο όγκο της φλάσκας που διαθέτουμε και τον όγκο των πιάτων που αφορούν την επίστρωση.

## 2.9 Τεχνικές Ανοσοκυτταροχημείας

Τα πειράματα ανοσοκυτταροχημείας που διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, αφορούσαν τον υποκυτταρικό εντοπισμό του GR στην κυτταρική σειρά C2C12 κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης των μυοβλαστών σε μυϊκά κύτταρα.

Η παραπάνω τεχνική αποτελείται από τρία εργαστηριακά βήματα: την χρώση των μιτοχονδρίων με την χρωστική MitoTracker CMX-Ros, τη μονιμοποίηση των κυττάρων και την χρώση των πυρήνων και του GR με

τη χρήση της χρωστικής Hoechst και φθορίζοντος αντισώματος αντίστοιχα.

## 2.10 Χρώση μιτοχονδρίων

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αποστειρώθηκαν οι κατάλληλες καλυπτρίδες (cover slips, τετράγωνες καλυπτρίδες), οι οποίες τοποθετούνται σε τρυβλία ανάλογης επιφάνειας, όπου αναπτύσσονται τα κύτταρα, παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου (πλήρες DMEM με phenol red).

Για τη χρώση των μιτοχονδρίων, η CMX προστίθεται στο θρεπτικό, σε τελική συγκέντρωση 200nM. Η χρωστική αυτή εφαρμόζεται αποκλειστικά σε ζωντανά και όχι σε μονιμοποιημένα κύτταρα .

Τα κύτταρα παραμένουν στο θρεπτικό υλικό με τη CMX για περίπου 45 λεπτά. Μετά το πέρας των 45 λεπτών το θρεπτικό υλικό αφαιρείται από τα wells κι ακολουθεί η μονιμοποίηση των κυττάρων πάνω στα cover slips.

## 2.11 Μονιμοποίηση των κυττάρων

Το στάδιο της μονιμοποίησης περιλαμβάνει τη χρήση οργανικών διαλυτών, συγκεκριμένα μεθανόλης κι ακετόνης 100% αμφότερες. Η μεθανόλη είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της δομής των κυττάρων, βασικό για την παρατήρηση σε μικροσκόπιο, ενώ η ακετόνη καθιστά τη μεμβράνη διαπερατή στα αντισώματα που θα χρησιμοποιηθούν για τον υποκυτταρικό εντοπισμό του GR.

Η διαδικασία αρχίζει με την προσθήκη κρύας (-20°C) μεθανόλης στα τρυβλία ανάπτυξης των κυττάρων και τοποθέτησης του τρυβλίου στους -20°C για 5 λεπτά. Μετά το πέρας των 5 λεπτών, αφαιρούμε τη μεθανόλη και προσθέτουμε κρύα (-20°C) ακετόνη και τοποθετούμε πάλι το plate στους -20°C για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, αφαιρούμε την ακετόνη και

κάνουμε μια πλύση με PBSx1. Αφαιρούμε το PBSx1 και στο σημείο αυτό το plate, μπορεί να αποθηκευτεί με τα cover slips στους -20°C.

## 2.12 Χρώση πυρήνων και GR

Σε αυτό το στάδιο έχουμε την ταυτόχρονη χρώση των πυρήνων και του GR. Η ανοσοεντόπιση του GR βασίζεται στη χρήση πρωτογενούς αντισώματος έναντι του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και δευτερογενούς αντισώματος συζευγμένου με τη χρωστική Alexa Fluor-488, έναντι του πρωτογενούς. Για την εντόπιση των πυρήνων χρησιμοποιούμε τη χρωστική Hoechst.

Αρχικά διαλύουμε ποσότητα πρωτογενούς αντισώματος έναντι του GR σε PBSTx1 σε τελική συγκέντρωση 1:50. Επωάζουμε κάθε cover slip με τα μονιμοποιημένα κύτταρα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτάδι και σε κασετίνα που περιέχει υγρασία. Μετά το πέρας της μιας ώρας κάνουμε 2-3 πλύσεις με PBSx1 σε κάθε cover slip. Κατόπιν, ετοιμάζουμε διάλυμα με δευτερογενές αντίσωμα έναντι του πρωτογενούς και τη χρωστική Hoechst διαλυμένα σε PBSTx1, με συγκεντρώσεις 1:500 και 1:1000 αντίστοιχα. Επωάζουμε για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στην ίδια κασετίνα σε σκοτάδι και υγρασία, καθώς οι φθορίζουσες χρωστικές είναι φωτοευαίσθητες. Ακολουθούν πάλι 2-3 πλύσεις με PBSx1 στο κάθε cover slip. Τέλος, με τη βοήθεια PVA (διάλυμα επίστρωσης) τοποθετούμε τα cover slips πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

### 3. Αποτελέσματα

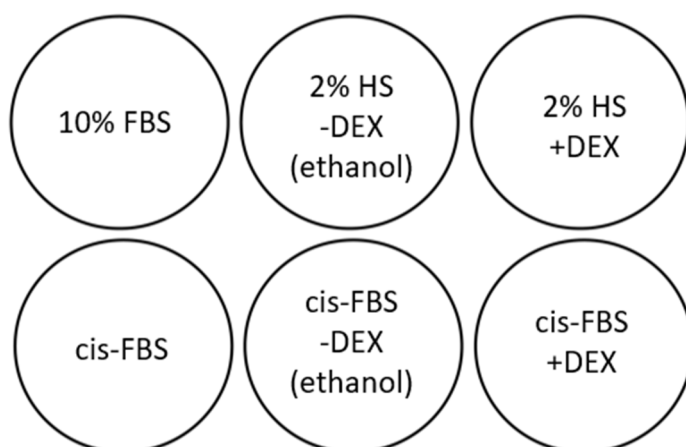
Όπως έχει προαναφερθεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία, τα γλυκοκορτικοειδή παρουσιάζουν μεγάλη φαρμακολογική σημασία για τη μυϊκή δυστροφία Duchenne (Pas M., Jong P., Verburg F., 2000) και ταυτόχρονα έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση διαφόρων τύπων κυττάρων, με πιο χαρακτηριστικό αυτό των πνευμόνων (Busada J., Cidlowski J., 2017). Στόχος λοιπόν της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της πιθανής συμμετοχής του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) στη διαδικασία διαφοροποίησης της κυτταρικής σειράς C2C12 από μυοβλάστες σε μυοσωλήνες, χρησιμοποιώντας ως μέσο διαφοροποίησης θρεπτικό υλικό που περιέχει σε τελική συγκέντρωση 2% v/v ορό αλόγου (Horse Serum).

#### 3.1 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού του GR κατά τη διαφοροποίηση 10 ημερών στα C2C12.

Με σκοπό να ελέγξουμε την πιθανή συμμετοχή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στη διαδικασία της διαφοροποίησης από μυοβλάστες σε μυοσωλήνες, θέλαμε να εξετάσουμε την υποκυτταρική εντόπιση του GR σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε επίστρωση των C2C12 σε 6-well plate κυτταροκαλλιέργειας, με 80.000 κύτταρα/well πάνω στις αντίστοιχες καλυπτρίδες, σε θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Μόλις τα κύτταρα έφτασαν σε πληρότητα το 80-90%, ξεκίνησε η διαδικασία της διαφοροποίησης με το θρεπτικό μέσο που περιείχε 2% v/v Horse Serum. Εφαρμόστηκαν διάφορες συνθήκες των κυττάρων όπως α) παρουσία συνθετικού γλυκοκορτικοειδούς δεξαμεθαζόνης (Dex) με τελική συγκέντρωση  $10^{-7}M$  ως θετικό control για τη μετατόπιση του GR στον πυρήνα, καθώς και β) ορός βοοειδούς (FBS) κατεργασμένος με ενεργό άνθρακα (Charcoal inactivated serum, cis-FBS) για την απομάκρυνση ορμονών και αναπτυξιακών παραγόντων από τον ορό και κατά συνέπεια

από το μέσο ανάπτυξης των κυττάρων. Το τελευταίο χρησιμοποιείται για να συγχρονίσει τα κύτταρα και να διακόψει τη διαδικασία διαφοροποίησης. Στο σημείο αυτό να τονίσουμε πως η αλλαγή του θρεπτικού μέσου διαφοροποίησης (2% v/v Horse Serum) πραγματοποιείται με μεγάλη ακρίβεια κάθε δύο ημέρες. Η διαφοροποίηση έγινε για 10 ημέρες και οι συνθήκες του πειράματος ήταν οι ακόλουθες:

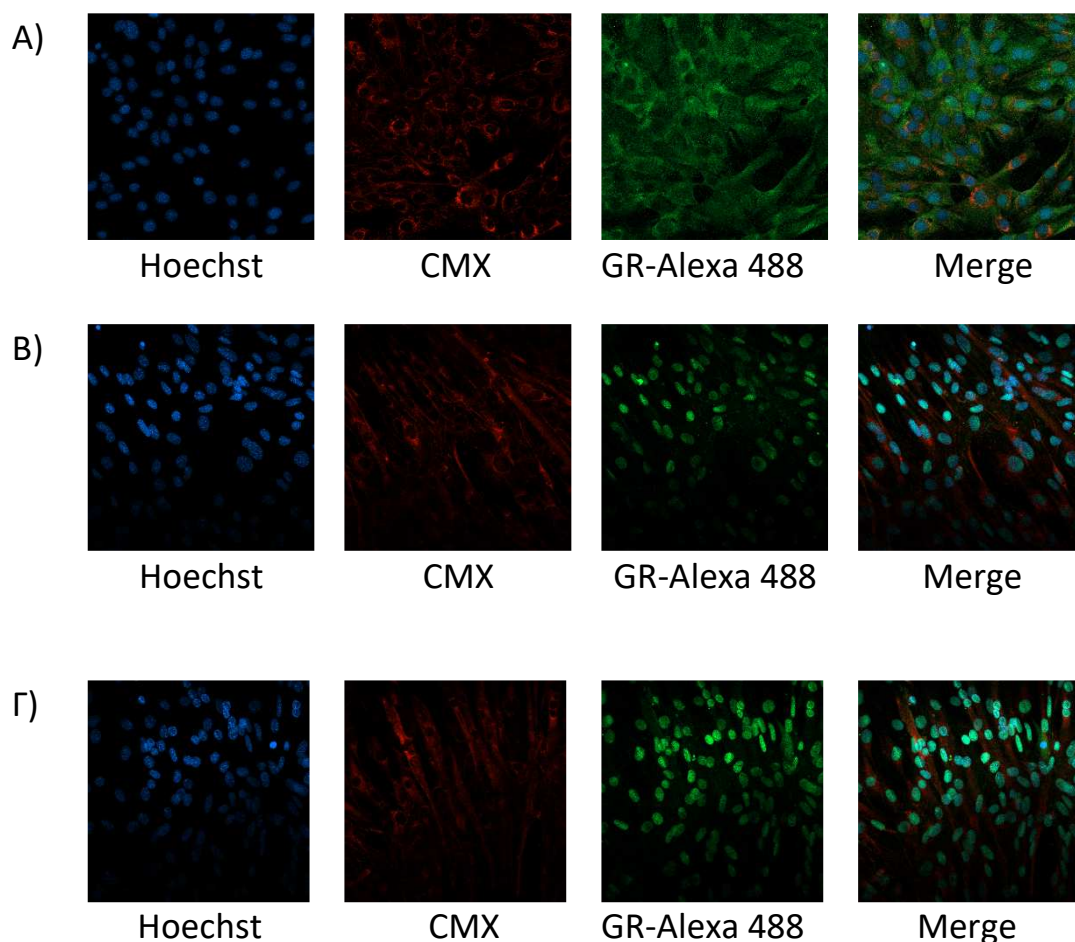
- Μη διαφοροποιημένα κύτταρα σε DMEM με phenol red με 10% FBS (μέσο ανάπτυξης)
- Διαφοροποιημένα κύτταρα σε DMEM με phenol red με 2% horse serum (μέσο διαφοροποίησης), απουσία Dex.
- Διαφοροποιημένα κύτταρα σε DMEM με phenol red με 2% horse serum, παρουσία Dex.
- Μη διαφοροποιημένα κύτταρα σε DMEM χωρίς phenol red με cis-FBS.
- Διαφοροποιημένα κύτταρα αρχικά σε DMEM με 2% horse serum σε phenol red και επώαση στη συνέχεια σε DMEM χωρίς phenol red με cis-FBS, απουσία Dex.
- Διαφοροποιημένα κύτταρα αρχικά σε DMEM με 2% horse serum σε phenol red και επώαση στη συνέχεια σε DMEM χωρίς phenol red με cis-FBS, παρουσία Dex.

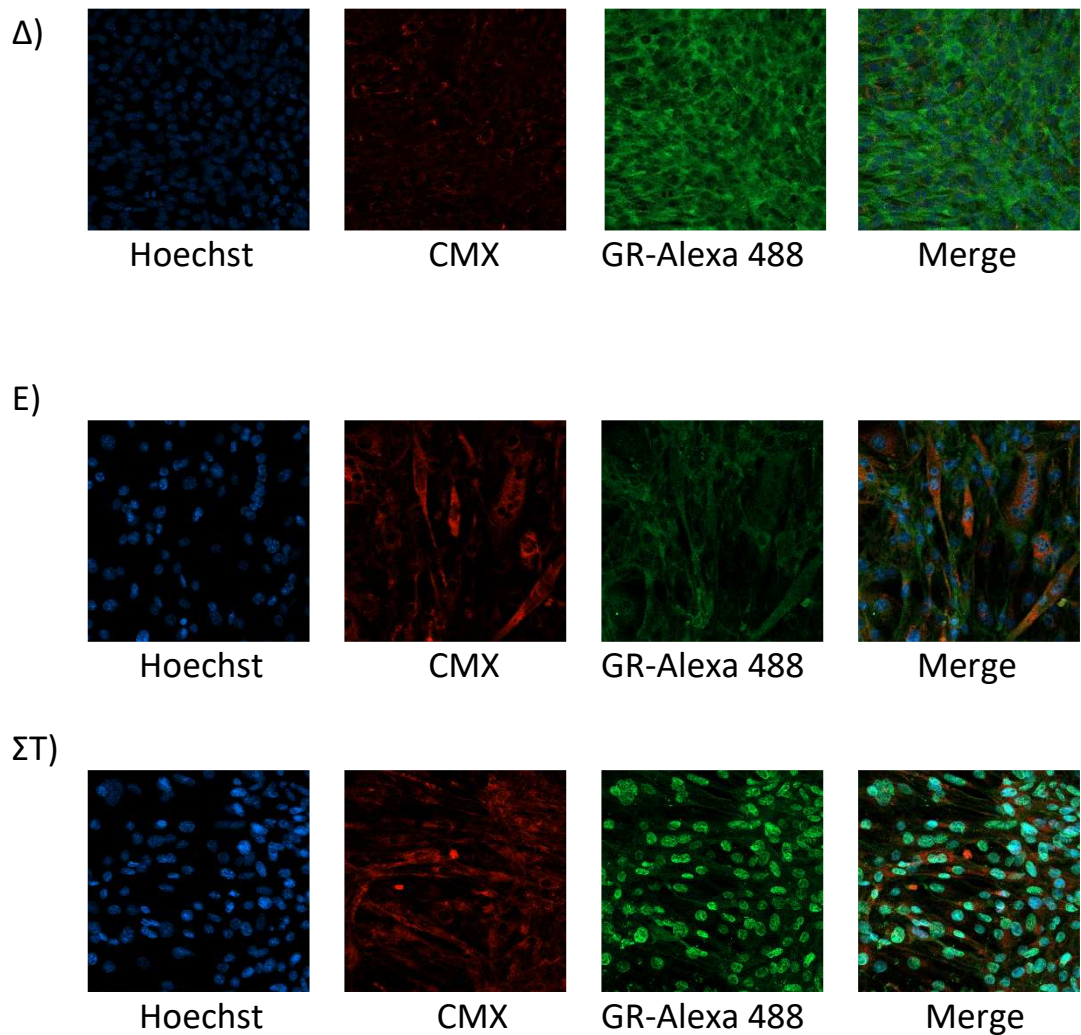


Εικόνα 7: Απεικόνιση των συνθηκών του πειράματος εντός των τρυβλίων κυτταροκαλλιέργειας.

Οι δύο τελευταίες συνθήκες επωάστηκαν σε θρεπτικό με cis-FBS, για δύο επιπλέον μέρες, ώστε να έχουμε σε όλες τις συνθήκες διαφοροποίηση 10 ημερών. Η επώαση με Dex έγινε ταυτόχρονα με τη χρώση των μιτοχονδρίων με χρήση της χρωστικής Mito Tracker CMX-Ros. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν πάνω στις καλυπτρίδες με τη χρήση οργανικών διαλυτών 100% μεθανόλη και 100% ακετόνη. Ακολούθησε η χρώση των πυρήνων με τη χρωστική Hoechst και του GR με τη χρήση ειδικών πρωτογενών αντισωμάτων έναντι του GR και δευτερογενών φθορίζοντων αντισωμάτων. Στη συνέχεια, ακολούθησε παρατήρηση στο μικροσκόπιο και λήψη φωτογραφιών στο συνεστιακό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 20X.

Τα αποτελέσματα της μελέτης απεικονίζονται στην εικόνα 8. Σημειώνεται ότι οι πυρήνες φαίνονται με μπλε χρώμα, τα μιτοχόνδρια με κόκκινο κι ο GR με πράσινο. Επιπρόσθετα, φαίνεται κι η σύμπτυξη/συγχώνευση των τριών αυτών εικόνων.





Εικόνα 8: Υποκυτταρικός εντοπισμός του GR κατά τη διαφοροποίηση 10 ημερών της κυτταρικής σειράς C2C12. Α) Μη διαφοροποιημένα κύτταρα σε μέσο ανάπτυξης, Β) Διαφοροποιημένα κύτταρα σε μέσο διαφοροποίησης απουσία Dex, Γ) Διαφοροποιημένα κύτταρα σε μέσο διαφοροποίησης παρουσία Dex, Δ) Μη διαφοροποιημένα κύτταρα σε μέσο με cis-FBS, Ε) Διαφοροποιημένα κύτταρα σε μέσο με cis-FBS, απουσία Dex και ΣΤ) Διαφοροποιημένα κύτταρα σε μέσο με cis-FBS, παρουσία Dex.

Αρχικά, στη συνθήκη control (συνθήκη Α), όπου έχουμε μη διαφοροποιημένα κύτταρα σε μέσο ανάπτυξης, παρατηρούμε ότι ο GR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Στις επόμενες δύο συνθήκες, Β και Γ που έχουμε διαφοροποιημένα κύτταρα απουσία και παρουσία Dex αντίστοιχα, φαίνεται ότι ο GR μετατοπίζεται στον πυρήνα. Η μετατόπιση αυτή είναι αναμενόμενη για τη συνθήκη Γ, επειδή όπως προαναφέρθηκε η Dex προσδένεται στον GR και κατόπιν αυτός μετατοπίζεται στον

πυρήνα. Η συνθήκη Δ αποτελεί τη συνθήκη control, όπου έχουμε μη διαφοροποιημένα κύτταρα μετά από επώαση σε θρεπτικό με cis-FBS. Όπως και στη συνθήκη Α, έτσι και στη Δ ο GR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Όσον αφορά τις δύο τελευταίες συνθήκες, στη ΣΤ αλλά και στην Ε έχουμε εντοπισμό του GR στον πυρήνα. Στη συνθήκη ΣΤ παρατηρούμε αναμενόμενη μεταξύ του GR στον πυρήνα, λόγω της Dex. Στην συνθήκη Ε, ο GR μετά από επώαση των κυττάρων με cis-FBS κι άρα στέρση της παρουσίας ενδογενών γλυκοκορτικοειδών ο GR εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα κι όχι στον πυρήνα. Βάσει των παρατηρήσεων αυτών φαίνεται πως ο GR στη διάρκεια διαφοροποίησης των C2C12 για 10 ημέρες μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.

### 3.2 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού του GR κατά τη διαφοροποίηση 6 ημερών στα C2C12.

Για τη διερεύνηση της διαφοροποίησης της υποκυτταρικής εντόπισης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης των C2C12 πραγματοποιήθηκε αυτή τη φορά η ίδια διαδικασία αλλά σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα με σκοπό να εξακριβωθεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός του GR κατά τη διαφοροποίηση 6 ημερών.

Στο συγκεκριμένο πείραμα επιστρώθηκαν σε 6-well plate κυτταροκαλλιέργειας δύο διαφορετικές συνθήκες:

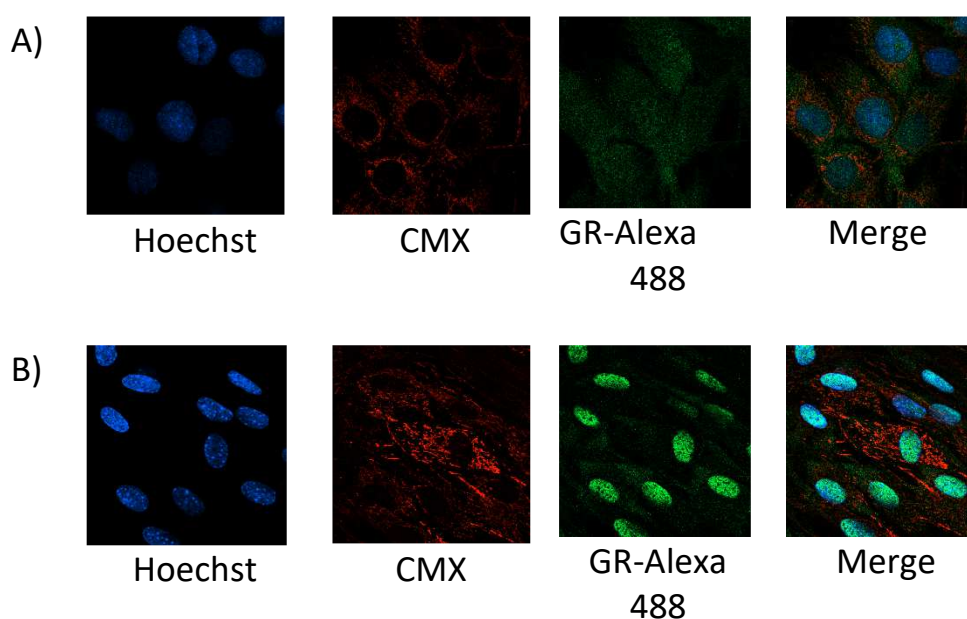
- Μη διαφοροποιημένα κύτταρα σε DMEM με phenol red με 10% FBS.
- Διαφοροποιημένα κύτταρα σε DMEM με phenol red με 2% horse serum.

Ομοίως με το προηγούμενο πείραμα επιστρώθηκαν 80.000 κύτταρα στο κάθε well, κι όταν αυτά έφτασαν σε 80-90% πληρότητα ξεκίνησε η διαδικασία διαφοροποίησης, η οποία επιτεύχθηκε όπως προαναφέρθηκε κατά την επώασή τους σε θρεπτικό μέσο



διαφοροποίησης με 2% v/v Horse Serum. Η αλλαγή θρεπτικού μέσου γινόταν κάθε δύο ημέρες, αλλά αυτή τη φορά δεν χρησιμοποιήθηκε καθόλου Dex. Μετά το πέρας των 6 ημερών, έγινε η χρώση με τη CMX, ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων πάνω στις καλυπτρίδες με τη χρήση μεθανόλης και ακετόνης 100%, ύστερα έγινε η χρώση πυρήνων και GR και τέλος έγινε η παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Με σκοπό την ευκρινέστερη απεικόνιση υποκυτταρικών οργανιδίων, οι εικόνες της συνεστιακής μικροσκοπίας ελήφθησαν με φακό μεγέθυνσης 63X.

Τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:



*Εικόνα 9: Υποκυτταρικός εντοπισμός του GR κατά τη διαφοροποίηση 6 ημερών της κυτταρικής σειράς C2C12. A) Μη διαφοροποιημένα κύτταρα σε μέσο ανάπτυξης, B) διαφοροποιημένα κύτταρα σε μέσο διαφοροποίησης.*

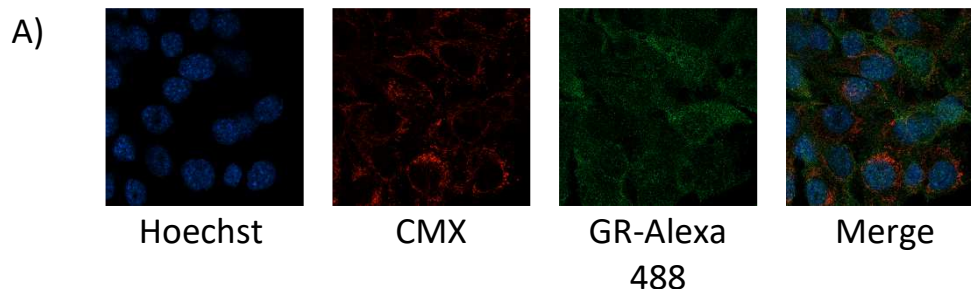
Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως ο GR εντοπίζεται ξανά στον πυρήνα κατά τη διαφοροποίηση, αυτή τη φορά σε χρονικό διάστημα 6 ημερών, ενισχύοντας την αξιοπιστία των προηγούμενων αποτελεσμάτων και την διαπίστωση πως στη διάρκεια της διαφοροποίησης ο GR φαίνεται να μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.

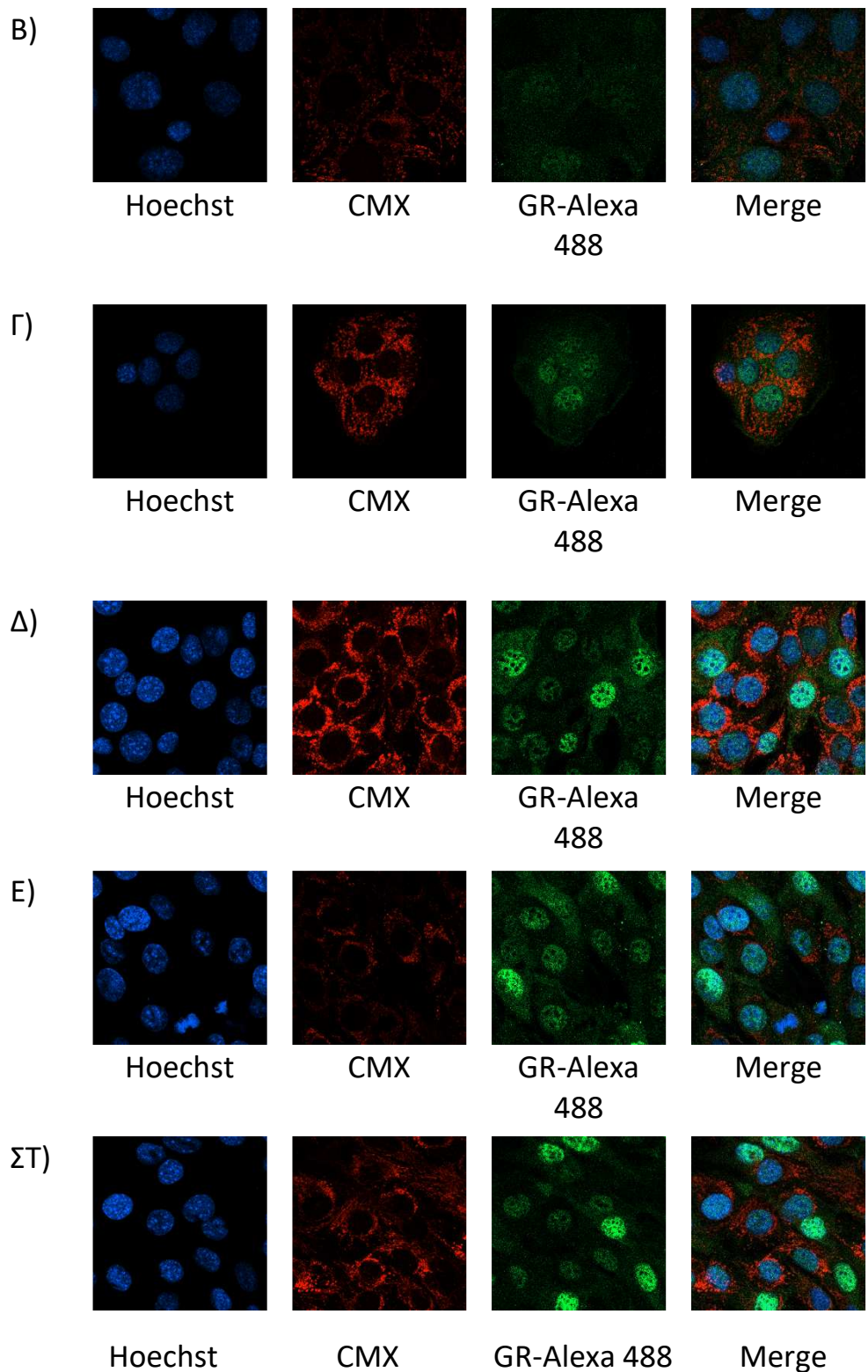
### 3.3 Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού του GR σε διαφορετικές χρονικές στιγμές της διαφοροποίησης.

Τα αποτελέσματα μέχρι τώρα μας υποδεικνύουν την μετατόπιση του GR από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα τόσο στις 6 όσο και στις 10 ημέρες διαφοροποίησης, ουσιαστικά μετά το πέρασμα μεγάλου χρονικού διαστήματος. Εύλογα, προκύπτει το ερώτημα αν ο GR εισέρχεται στον πυρήνα από την αρχή της διαδικασίας διαφοροποίησης ή σε κάποια άλλη χρονική στιγμή σε μεταγενέστερο στάδιο.

Θέλοντας να απαντήσουμε στο συγκεκριμένο ερώτημα αλλά και να αποσαφηνίσουμε τον ρόλο που ενδέχεται να διαδραματίζει ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών στη διαδικασία διαφοροποίησης των C2C12, πραγματοποιήθηκε πείραμα, όπου τα κύτταρα επώαστηκαν στο μέσο διαφοροποίησης για 1,6,12,24 και 48 ώρες. Η επώαση έγινε σε 24-well plate κυτταροκαλλιέργειας, όπου στο κάθε well επιστρώθηκαν 15.000 κύτταρα αναλογικά με τον αντίστοιχο αριθμό κυττάρων σε 6-well plate. Η συνθήκη control και για αυτό το πείραμα όπως και για τα προηγούμενα ήταν μη διαφοροποιημένα κύτταρα σε μέσο ανάπτυξης. Η πειραματική διαδικασία χρώσεων και μονιμοποίησης είναι ακριβώς ίδια με τα προηγούμενα πειράματα, ενώ η λήψη φωτογραφιών έγινε στο συνεστιακό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 63X.

Στην εικόνα 10 απεικονίζονται ενδεικτικές εικόνες υποκυτταρικής κατανομής του υποδοχέα σε διάφορες χρονικές στιγμές: 1 ώρα, στις 6,12,24 και 48 ώρες, καθώς και η συνθήκη control.





Εικόνα 10: Μετατόπιση του GR ύστερα από λίγες ώρες επώασης των κυττάρων με μέσο διαφοροποίησης. Α) Μη διαφοροποιημένα κύτταρα σε μέσο ανάπτυξης, Β) κύτταρα σε μέσο διαφοροποίησης στη 1 ώρα, Γ) κύτταρα σε μέσο διαφοροποίησης στις 6 ώρες, Δ) κύτταρα σε μέσο διαφοροποίησης στις 12 ώρες, Ε) κύτταρα σε μέσο διαφοροποίησης στις 24 ώρες, , ΣΤ) κύτταρα σε μέσο διαφοροποίησης στις 48 ώρες.

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα ο GR, σε ένα μικρό ποσοστό βρίσκεται εξαρχής στον πυρήνα, ωστόσο εισέρχεται σε μεγαλύτερο βαθμό όσο προχωράει η διαδικασία της διαφοροποίησης, αρχής γενομένης από τη συνθήκη των 6 ωρών (συνθήκη Γ). Επιπλέον, με την πάροδο του χρόνου η μετατόπιση γίνεται ολοένα και εντονότερη, όπως μαρτυρά η πυρηνική εντόπιση του υποδοχέα στις συνθήκες Δ, Ε και ΣΤ.

Συμπερασματικά, με βάση τα παραπάνω πειράματα, θα μπορούσαμε να πούμε πως ο GR συμμετέχει στη διαδικασία της διαφοροποίησης των μυοβλαστών C2C12 σε μυοσωλήνες, μέσω της μετακίνησής του, από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και κατά συνέπεια ενεργοποίησης του. Η μετακίνηση-ενεργοποίηση αυτή πραγματοποιείται τόσο στα πρώτα στάδια όσο και καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

#### 4. Συζήτηση

Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν μια κατηγορία των στεροειδών ορμονών. Το πιο γνωστό γλυκοκορτικοειδές είναι η κορτιζόλη. Αποτελούν βασικές ορμόνες του οργανισμού, καθώς διαδραματίζουν κομβικό ρόλο σε πολλές βιολογικές διαδικασίες, όπως ο μεταβολισμός, η ανάπτυξη, η διαφοροποίηση, η πολυδιάστατη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και η διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού (Cain D. and Cidlowski J., 2017). Τα γλυκοκορτικοειδή δρουν κυρίως μέσω του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR), ο οποίος ανήκει στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και δρα ως μεταγραφικός παράγοντας (Heitzer M. et al, 2007). Οι γενωμικές δράσεις του GR ως μεταγραφικός παράγοντας αφορούν την ενεργοποίηση ή αναστολή της μεταγραφής γονιδίων στόχων (Oakley R., Cidlowski J., 2013). Επίσης, άμεση δράση του υποδοχέα στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής μεταγραφής και απόπτωσης, έχει τεκμηριωθεί (Psarra A., Sekeris C., 2011). Ωστόσο, τα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να δρουν και μη γενωμικά επηρεάζοντας διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια κινασών (Panettieri R. et al, 2019). Επιπλέον, τα γλυκοκορτικοειδή δρουν και μέσω του υποδοχέα GPR97, ο οποίος είναι ένας μεμβρανικός GPCR (Hsiao C. et al, 2018). Εκτός από τις δράσεις τους σχετικά με τον μεταβολισμό και το ανοσοποιητικό σύστημα, τα γλυκοκορτικοειδή παίζουν σπουδαίο ρόλο

στη διαφοροποίηση πολλών κυτταρικών τύπων (Busada J., Cidlowski J., 2017).

Συγκεκριμένα για τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών, είναι γνωστό πως φυσιολογικές δόσεις γλυκοκορτικοειδών, επισπεύδουν τη διαδικασία διαφοροποίησης. Πιο συγκεκριμένα, ενδογενείς δόσεις οδηγούν σε νωρίτερη έκφραση των επιπέδων βασικών MRFs (myogenic regulatory factors), όπως η MyoD και η μυογενίνη. Ακόμα, η σύντηξη μυϊκών ινών προς σχηματισμό μυοσωλήνων συμβαίνει νωρίτερα παρουσία γλυκοκορτικοειδούς στις ίδιες δόσεις, καθώς αυξάνονται και τα επίπεδα της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MyHC), που αποτελεί δείκτη της δημιουργίας τελικά διαμορφωμένων μυοσωλήνων. Η αύξηση της MyHC ενδεχομένως να οφείλεται στη δράση της kinesin-1, η οποία ενισχύεται παρουσία γλυκοκορτικοειδούς (Jong-Wei Lin et al, 2021). Συμπερασματικά, τα γλυκοκορτικοειδή φαίνεται να αυξάνουν την ταχύτητα της διαφοροποίησης και της δημιουργίας μυοσωλήνων (Belanto J. et al, 2010). Εκτός από μυοβλάστες, παρόμοιες παρατηρήσεις έχουν γίνει και σε satellite cells (Perpetuini A. et al, 2020).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις σε συνδυασμό με αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία για πιθανή φαρμακολογική δράση των γλυκοκορτικοειδών κατά της μυϊκής δυστροφίας Duchenne (Pas M., Jong P., Verburg F., 2000), δημιουργεί εύλογα το ερώτημα, εάν ο GR θα μπορούσε να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη διαφοροποίηση των μυοβλαστών σε μυοσωλήνες.

Στόχος λοιπόν της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση του ρόλου του GR στη διαφοροποίηση των μυοβλαστών, μέσω μελέτης του υποκυτταρικού εντοπισμού του υποδοχέα κατά τη διαφοροποίηση.

Στα πειράματα διαφοροποίησης χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά C2C12, η οποία αποτελεί σειρά μυοβλαστών ποντικού. Ως μέσο διαφοροποίησης χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο που περιείχε σε τελική συγκέντρωση 2% v/v ορό αλόγου (Horse Serum). Για τις ανάγκες των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ακόμα τεχνικές ανοσοκυτταροχημείας όπως χρώσεις πυρήνων, μιτοχονδρίων και GR, μονιμοποίηση των κυττάρων και μικροσκοπική παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Ειδικότερα, τα κύτταρα διαφοροποιούνται

πάνω σε καλυπτρίδες, μέσα σε plate κυτταροκαλλιέργειας. Μετά τη διαφοροποίηση γινόταν η χρώση των μιτοχονδρίων με τη χρωστική Mito Tracker CMX-Ros σε ζωντανά κύτταρα. Ακολουθεί η μονιμοποίηση με τη χρήση οργανικών διαλυτών (100% μεθανόλη και 100% ακετόνη), ύστερα γίνεται η χρώση πυρήνων και GR και τέλος, γίνεται η παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος για τον υποκυτταρικό εντοπισμό του GR κατά τη διαφοροποίηση 10 ημερών στα κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε μέσο διαφοροποίησης για 10 ημέρες παρουσία και απουσία δεξαμεθαζόνης (Dex), σε τελική συγκέντρωση  $10^{-7}M$ . Η Dex είναι ένα συνθετικό γλυκοκορτικοειδές που ενεργοποιεί και οδηγεί τον GR στον πυρήνα και λειτουργεί ως θετικό control του υποκυτταρικού εντοπισμού. Κάποιες συνθήκες του πειράματος περιελάμβαναν επώαση των κυττάρων μετά τις 10 ημέρες σε θρεπτικό μέσο με cis-FBS (απομάκρυνση στεροειδών ορμονών από το μέσο ανάπτυξης των κυττάρων), παρουσία και απουσία Dex. Τα αποτελέσματα έδειξαν υποκυτταρική μετατόπιση του GR από το κυτταρόπλασμα των μη διαφοροποιημένων κυττάρων στον πυρήνα των διαφοροποιημένων κυττάρων.

Ακολούθησε παρόμοια μελέτη, υπο συνθήκες διαφοροποίησης 6 ημερών, με σκοπό να ελεγχθεί ο υποκυτταρικός εντοπισμός του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε ένα δεύτερο, διαφορετικό και πιο σύντομο χρονικό διάστημα. Τα αποτελέσματα, υποδεικνύουν και πάλι την υποκυτταρική μετατόπιση του υποδοχέα από το κυτταρόπλασμα των μη διαφοροποιημένων κυττάρων στον πυρήνα των διαφοροποιημένων κυττάρων.

Έπειτα έγινε προσπάθεια για τον προσδιορισμό του σημείου έναρξης αυτής της πυρηνικής μετατόπισης του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε μέσο διαφοροποίησης για 1,6,12,24 και 48 ώρες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν πως η μετατόπιση γίνεται σε πολύ πρώιμο στάδιο και με την πάροδο του χρόνου φαίνεται να γίνεται εντονότερη.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και παρατηρήσεις συμπεραίνουμε πως ο GR φαίνεται να συμμετέχει στη διαδικασία διαφοροποίησης των μυοβλαστών, μέσω ενεργοποίησής του και μετακίνησής του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Η συμμετοχή

αυτή φαίνεται να ξεκινά από την αρχή της διαδικασίας και να διαρκεί μέχρι και τα τελικά της στάδια.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας αποτελούν επιπλέον τεκμήρια για τη συνεισφορά του GR στη διαφοροποίηση των μυοβλαστών.

Η παραπάνω συνεισφορά φαίνεται με τη συμμετοχή του GR στη διαδικασία διαφοροποίησης των μυοβλαστών μέσω μεταβολής της υποκυτταρικής κατανομής του. Παρά όλα αυτά για την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων απαιτούνται επιπρόσθετες πειραματικές επαναλήψεις, βιολογικές επαναλήψεις και εναλλακτικοί τρόποι προσέγγισης του επιστημονικού ερωτήματος που πραγματεύεται η συγκεκριμένη εργασία. Για παράδειγμα αν και φαίνεται μια υποκυτταρική μετατόπιση, τα παραπάνω πειράματα δεν παρέχουν δεδομένα για αλληλεπιδράσεις του GR με άλλα μόρια σχετιζόμενα με τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών. Επιπλέον, υπάρχει το ενδεχόμενο ο GR να κινητοποιεί τη διαφοροποίηση δρώντας στο μιτοχονδριακό DNA, καθώς υπάρχουν ανάλογες ενδείξεις τόσο από *in vitro*, όσο κι από *in vivo* μοντέλα (Weber K. et al, 2002).

Ως μελλοντικές προεκτάσεις της έρευνας αυτής θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν πειράματα υποκυτταρικής κλασμάτωσης σε συνδυασμό με ανοσοαποτύπωση κατά Western για τη μεταβολή των πρωτεϊνικών επιπέδων και της υποκυτταρικής κατανομής του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης, ελέγχου συν-ανοσοκατακρήμνισης (co-IP) του GR με κάποιο σημαντικό για τη διαφοροποίηση μεταγραφικό παράγοντα, όπως είναι η MyoD, η μυογενίνη, ή ο MYF5 (Zanou N., Gailly P.,2013). Μια διαφορετική προσέγγιση θα ήταν η διεξαγωγή πειράματος RNA-seq σε μυοβλάστες κατά τη διαφοροποίηση παρουσία κι απουσία αναστολέα του GR και κατόπιν ανάλυση οντολογίας με σκοπό τον εντοπισμό γονιδίων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση και η έκφρασή τους πιθανόν να ρυθμίζεται από τον GR.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν βασικές ορμόνες, δεδομένου ότι ρυθμίζουν σημαντικές βιολογικές διαδικασίες εκ των οποίων μία είναι η διαφοροποίηση. Σχετικά με το ρόλο του GR στη διαφοροποίηση των μυοβλαστών, χρειάζονται επιπλέον μελέτες για την εξακρίβωση των λειτουργιών και των αλληλεπιδράσεών του με τους

MRFs που κατευθύνουν τη διαφοροποίηση όπως η MyoD, προκειμένου να διαπιστωθεί η έκταση επιρροής του στη διαδικασία διαφοροποίησης. Επιπλέον, η διερεύνηση των μηχανισμών δράσης του στα πλαίσια της διαφοροποίησης των μυοβλαστών είναι σημαντική και για την κατανόηση του ευρύτερου φαινομένου της κυτταρικής διαφοροποίησης.

## 5. Βιβλιογραφία

1. Brook C., Marshall N., 2004: *Βασική Ενδοκρινολογία*, (μτφρ.). Αλεβιζάκη-Χαρχαλάκη Μ., επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα.
2. Panettieri R., Schaafsma D., Amrani Y., Koziol-White C., Rennolds Ostrom R., Tliba O., 2019. “Non-genomic effects of glucocorticoids: an updated view”. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(1):38-49
3. Oakley R. And Cidlowski J., 2013. “The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease”. *Mechanisms of allergic diseases*, 132(5),1033-1044
4. O. Schakman, S. Kalista , C. Barbé , A. Loumaye , J.P. Thissen, 2013. “Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy”. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(10), 2163–2172
5. Pas M., Jong P., Verburg F., 2000. “Glucocorticoid inhibition of C2C12 proliferation rate and differentiation capacity in relation to mRNA levels of the MRF gene family”. *Molecular Biology Reports*, 27: 87–98
6. Zanou N., & Gailly P., 2013. “Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways”. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70:4117–4130
7. Larson A., Syverud B., Florida S., Rodriguez B., Pantelic M., Larkin L., (2018). “Effects of dexamethasone dose and timing on tissue-engineered skeletal muscle units”. *Cells Tissues Organs*, 205(4): 197–207



8. Han D., Yang W., Kao T., (2017). "Dexamethasone Treatment at the Myoblast Stage Enhanced C2C12 Myocyte Differentiation". *International Journal of Medical Sciences*, 14(5): 434-443
9. Vandewalle J., Luybaert A., Bosscher K., and Libert C., 2017. "Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids", *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(1): 42-54
10. Sherwood L. 2016: *Human Physiology: From cells to systems*.
11. Katzenellenbogen J., Katzenellenbogen B, 1996. "Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses". *Chemistry & Biology*, 3: 529-536
12. Germain P., Bourguet W., Altucci L., Gronemeyer H., 2003. "Nuclear receptor superfamily: Principles of signaling". *Pure and Applied Chemistry*, 75: 1619-1664
13. Heitzer M., Wolf I., Sanchez E., Witchel S., DeFranco D, 2007. "Glucocorticoid receptor physiology". *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 8:321–330
14. Hsiao C., Chu T., Wu C., Biggelaar M., Pabst C., Hébert J., Kuijpers T., Scicluna B., I K., Chen T., Liebscher I., Hamann J., Lin H., 2018. "The Adhesion G Protein-Coupled Receptor GPR97/ADGRG3 Is Expressed in Human Granulocytes and Triggers Antimicrobial Effector Functions". *Trends in Immunology*.
15. Rogatsky I., Ivashkiv L., 2006. "Glucocorticoid modulation of cytokine signaling". *Tissue Antigens*, 17: 233–247
16. Psarra A., Sekeris C., 2008. "Steroid and Thyroid Hormone Receptors in Mitochondria. *Life*, 60(4): 210–223
17. Psarra A., Sekeris C., 2011. "Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(10), 1814-1821.
18. Psarra A., Sekeris C., 2009. "Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783(1), 1-11
19. Fang X., Song Z., Xie M., Liu Y., Zhang W., 2020. "Synergistic effect of glucocorticoids and IGF-1 on myogenic differentiation through the Akt/GSK-3 $\beta$  pathway in C2C12 myoblasts". *International Journal of Neuroscience*, 130:1125-1135

20. Charge S., Rudnicki M., 2004. "Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration". *Physiological Reviews*, 84(1):209-238.
21. Busada J., Cidlowski J., 2017. "Mechanisms of Glucocorticoid Action During Development". *Current Topics in Developmental Biology*, 125:147-170
22. Cain D. and Cidlowski J., 2017. "Immune regulation by glucocorticoids". *Nature Reviews Immunology*, 17(4):233-247
23. Belanto J., Diaz-Perez S., Magyar, C., Maxwell M., Yilmaz Y., Topp K., Boso G., Jamieson C., Cacalano N., Jamieson C., 2010. "Dexamethasone induces dysferlin in myoblasts and enhances their myogenic differentiation". *Neuromuscular Disorders*, 20(2):111-121
24. Perpetuini A., Giuliani G., Reggio A., Cerretani M., Santoriello M., Stefanelli R., Palma A., Vumbaca S., Harper S., Castagnoli L., Bresciani A., Cesareni G., 2020. "Janus effect of glucocorticoids on differentiation of muscle fibro/adipogenic progenitors". *Scientific Reports*, 10-5363
25. Lin J., Huang Y., Chen Y., Chuang T., Lan T., Liu Y., Pan H., You L., Wang Y., Lin K., Chiou A., Kuo J., 2021. "Dexamethasone accelerates muscle regeneration by modulating kinesin-1-mediated focal adhesion signals". *Cell Death Discovery*, 7:35
26. Weber K., Bruck P., Mike Z., Kupper J., Klingenspor M., Wiesner R., 2002. "Glucocorticoid Hormone Stimulates Mitochondrial Biogenesis Specifically in Skeletal Muscle". *Endocrinology* 143(1):177-184.
27. Rovito D., Rerra A., Ueberschlag-Pitiot V., Joshi S., Karasu N., Dacleu-Siewe V., Rayana K., Ghaibour K., Parisotto M., Ferry A., Jelinsky S., Laverny G., Klaholz B., Sexton T., Billas I., Duteil D., Metzge D., 2021. "Myod1 and GR coordinate myofiber-specific transcriptional enhancers. *Nucleic Acids Research*, 49(8):4472-4492