ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΛΕΝΗ ΔΙΑΜΑΝΔΗ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2023

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

«Διερεύνηση του ρόλου των υποδοχέων στεροειδών ορμονών κατά τη διαφοροποίηση κυττάρων σε καλλιέργεια»

«Investigation of the role of steroid hormone receptors in differentiation of cells in culture»

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα

ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Μέλος

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ,ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ- ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Μέλος

ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ,ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ- ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή και τα οιστρογόνα ανήκουν στην οικογένεια των στεροειδών ορμονών και συμμετέχουν σε μια πληθώρα λειτουργιών των ευκαρυωτικών κυττάρων όπως στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την κυτταρική διαφοροποίηση. Μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τους αντίστοιχους μεταγραφικούς τους παράγοντες, συγκεκριμένα τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) και τον υποδοχέα οιστρογόνων (ERα), ελέγχουν τη μεταγραφή γονιδίων στον πυρήνα, αλλά και στα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν οι πιθανές μεταβολές των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, του υποδοχέα των οιστρογόνων και του ενεργοποιημένου υποδοχέα πολλαπλασιασμού των υπεροξεισωμάτων (PPARα) κατά την κυτταρική διαφοροποίηση. Για τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δυο τύποι κυτταρικών σειρών από ποντικό, τα κύτταρα νευροβλαστώματος Neuro-2a (N2A) και οι μυοβλάστες C2C12. Με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western Blot) και χρήση ειδικών αντισωμάτων ελέγχθηκε η πιθανή διαφορική έκφραση του GR και του ERα κατά τη διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης. Επίσης, διερευνήθηκαν τα επίπεδα του μεταγραφικού παράγοντα PPARα, του οποίου η σύνθεση ελέγχεται από τις στεροειδείς ορμόνες και ο ίδιος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό και συγκεκριμένα στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων. Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και ERα παραμένουν σταθερά κατά τη διαφοροποίηση των N2A κυττάρων, ενώ παρατηρείται αύξηση των επιπέδων του PPARα. Όσο αφορά τη διαφοροποίηση C2C12 κυττάρων, παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του GR κατά την $4^{η}$ ημέρα διαφοροποίησης των C2C12, ενώ τα επίπεδα του ERα παραμένουν σχετικά σταθερά. Αντίθετα, ο PPARα μειώνεται κατά την διάρκεια της διαφοροποίησης των C2C12. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υποστηρίζουν ότι ο PPARα και ο GR συμβάλλουν στη διαφοροποίηση και των δύο τύπων κυττάρων,όπως υποδηλώνεται μέσω της μεταβολής των πρωτεϊνικών τους επιπέδων. Όσο αφορά τον ERα δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στα πρωτεϊνικά του επίπεδα. Μένει να διερευνηθούν και τυχόν μεταβολές στη δραστικότητα των υπό μελέτη μεταγραφικών παραγόντων και η επίδραση των μεταβολών αυτών στους βιοχημικούς μηχανισμούς της διαφοροποίησης.

Λέξεις κλειδιά: στεροειδείς ορμόνες, υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών, υποδοχέας οιστρογόνων, διαφοροποίηση

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

ABSTRACT

Glucocorticoids and estrogens belong to the steroid hormone family and are involved in a multitude of eukaryotic cell functions such as growth, reproduction and cell differentiation. Through their interaction with their respective transcription factors, namely the glucocorticoid receptor (GR) and the estrogen receptor (ERα), they control the transcription of genes in the nucleus, but also in the mitochondria of cells. In this thesis, the possible changes in the protein levels of the glucocorticoid receptor, the estrogen receptor and the peroxisome proliferator activated receptor (PPARα) during cell differentiation were studied. For the study, two types of mouse cell lines were used, Neuro-2a (N2A) neuroblastoma cells and C2C12 myoblasts. The possible differential expression of GR and ERα during the process of cell differentiation was checked by the Western Blot method and using specific antibodies. Also, the levels of the transcription factor PPARα, whose synthesis is controlled by steroid hormones and which plays an important role in metabolism and specifically in β-oxidation of fatty acids, were investigated. From the results of the study, it appears that the protein levels of GR and ERα remain stable during the differentiation of N2A cells, while an increase in the levels of PPARα is observed. Regarding C2C12 cell differentiation, an increase in GR protein levels was observed on day 4 of C2C12 differentiation, while ERα levels remained relatively stable. In contrast, PPARα decreases during C2C12 differentiation. In conclusion, the results of this study support that PPARα and GR contribute to the differentiation of both cell types, as indicated by the change in their protein levels. Regarding ERα, no changes were observed in its protein levels. Any changes in the activity of the transcription factors under study and the effect of these changes on the biochemical mechanisms of differentiation remain to be investigated.

Key words: steroid hormones, glucocorticoid receptor, estrogen receptor, differentiation

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΠΙΝΑΚΕΣ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πυρηνικοί υποδοχείς

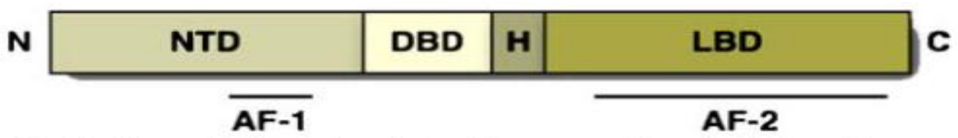
Οι πυρηνικοί υποδοχείς (NRs) συμμετέχουν σε μια πληθώρα λειτουργιών των ευκαρυωτικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής διαφοροποίησης, της ανάπτυξης, της αναπαραγωγής και του μεταβολισμού. Πρόκειται για μια υπεροικογένεια μεταγραφικών παραγόντων (TFs), οι οποίοι συμβάλλουν στον έλεγχο μεταγραφής γονιδίων στόχων μέσω της σύνδεσης ειδικών προσδετών σε αυτούς, συνήθως λιπόφιλων μορίων (Heitzer M. et al,2007). Ταξινομούνται στις παρακάτω κατηγορίες:

i. Τους υποδοχείς στεροειδών ορμονών, στους οποίους ανήκει ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER), ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR), ο υποδοχέας ανδρογόνων (AR) και ο υποδοχέας προγεστερόνης (PR).
ii. Τον υποδοχέα θυροειδών ορμονών (TR), τον υποδοχέα ρετινοικού οξέος (RAR) και των υποδοχέων του πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων (PPARs).
iii. Τους «ορφανούς υποδοχείς» , των οποίων ο προσδέτης παραμένει ακόμα άγνωστος. (Heitzer M. et al,2007).

1.2 Δομή πυρηνικών υποδοχέων

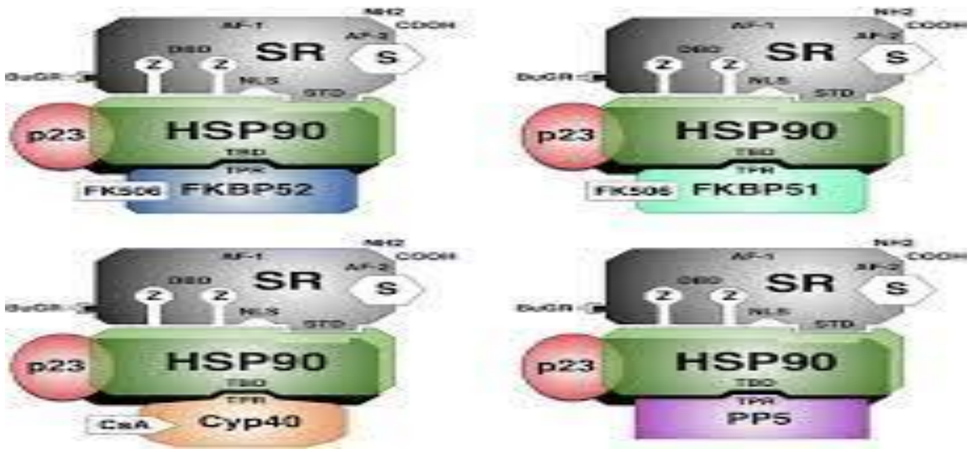
Οι πυρηνικοί υποδοχείς διαθέτουν κοινές δομικές περιοχές, συγκεκριμένα την περιοχή δέσμευσης του DNA (DBD), ένα λιγότερο καλά συντηρημένο καρβοξυλικό άκρο, την περιοχή δέσμευσης του συνδέτη (LBD) και ένα αποκλίνον αμινο τελικό άκρο. Η αμινοτελική περιοχή (NTD) είναι μεταβλητή μεταξύ των υποδοχέων με εξαίρεση την A περιοχή, που είναι πλούσια σε αρνητικά φορτισμένα όξινα αμινοξέα (AF-1). Δίπλα στην περιοχή AF-1 βρίσκεται η περιοχή δέσμευσης του DNA (DBD), με οκτώ κατάλοιπα κυστεΐνης και οργανωμένα τετραεδρικά δύο άτομα ψευδαργύρου. Αυτοί οι δακτύλιοι ψευδάργυρου δημιουργούν μια τρισδιάστατη διαμόρφωση που επιτρέπει τη δέσμευση του υποδοχέα σε αλληλουχία DNA και συμβάλλουν στο διμερισμό του υποδοχέα. Δίπλα στο DBD βρίσκεται μια μεταβλητή περιοχή άρθρωσης, που συνήθως περιέχει μια αλληλουχία πυρηνικής στόχευσης (NL1). Αυτή η άρθρωση επιτρέπει στον υποδοχέα να αλλάξει διαμόρφωση. Τέλος, η πολύ συντηρημένη περιοχή δέσμευσης συνδέτη (LBD) βρίσκεται στο καρβοξυλικό άκρο. Είναι απαραίτητη για τη δέσμευση ορμονών και το διμερισμό των υποδοχέων. Η περιοχή AF-2 εντοπίζεται στη LBD περιοχή. Η AF-2 αλλάζει διαμόρφωση, επιτρέποντας την αλληλεπίδραση των συμπαραγόντων που οδηγούν σε μεταγραφική ενεργοποίηση (συν-ενεργοποιητές) ή μεταγραφική καταστολή (συν-απενεργοποιητές). (Heitzer M. et al,2007).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169



Εικόνα 1. Ρυθμιστικές περιοχές των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών (Heitzer M. ,2007)

Οι μη δεσμευμένοι με προσδέτη-ορμόνη υποδοχείς στεροειδών ορμονών είναι ένα σύμπλοκο που αποτελείται από τον υποδοχέα, το διμερές των HSP90 (συνοδές πρωτεΐνες θερμικού σοκ 90), ένα μόριο του ρ23, και μία πρωτεΐνη επανάληψης τετρατρικοπεπτιδίου (TPR).Κατά τη σύνδεση της ορμόνης με τον υποδοχέα επέρχονται αλλαγές στη διαμόρφωσή του, αποδέσμευσή του από το σύμπλοκό του με τις συνοδές πρωτεΐνες και μετακίνησή του στον πυρήνα. (Heitzer M. et al,2007).



Εικόνα 2. Τέσσερα διακριτά σύμπλοκα των υποδοχέων στεροειδών, (Heitzer M., 2007)

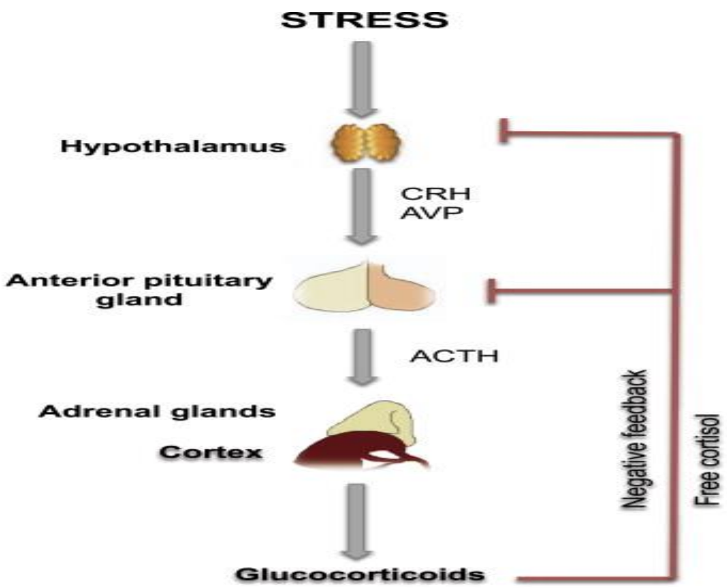
1.3 Στεροειδείς ορμόνες

Οι στεροειδείς ορμόνες συντίθενται από το κοινό πρόδρομο μόριο χοληστερόλη και απελευθερώνονται χωρίς να αποθηκευτούν. Είναι λιπόφιλα μόρια στο αίμα και συνδέονται με πρωτεΐνες του πλάσματος, τις ονομαζόμενες σφαιρίνες δέσμευσης στεροειδών ορμονών. Καθώς δρουν μόνο όταν είναι ελεύθερες, η σύνδεση τους με τις σφαιρίνες δέσμευσης στεροειδών ορμονών έχουν στόχο την ελεγχόμενη τους δράση.

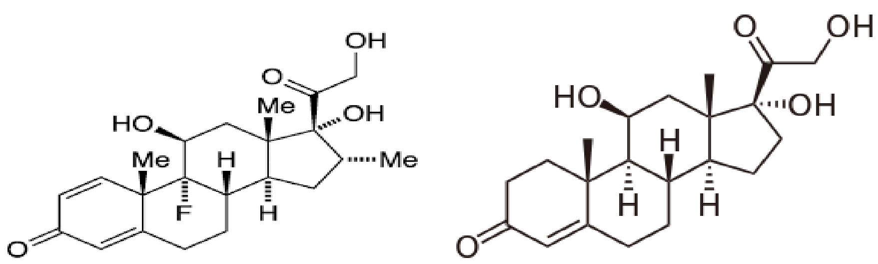
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

1.3.1 Γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) είναι στεροειδείς ορμόνες με δομή όμοια του κυκλοπεντανοφεναvθρενίου, που αποτελείται από 3 εξαμελείς δακτυλίους και 1 πενταμελή. Τα επινεφρίδια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των γλυκοκορτικοειδών. Ο υποθάλαμος εκρίνει την κορτικοτροπίνη, διεγείροντας με αυτό τον τρόπο την έκκριση της αδενοκορτικοτροπίνης στην υπόφυση. Η αδενοκορτικοτροπίνη διεγείρει την έκκριση της κορτιζόλης από τα επινεφρίδια. Η κορτιζόλη μπορεί να μετατραπεί στην ανενεργή μορφή της, την κορτιζόνη. Συμβάλλει στη διάσπαση του γλυκογόνου, επομένως στην απελευθέρωση της γλυκόζης και εμποδίζει την πρόσληψη της από το λιπώδη ιστό και τους σκελετικούς μύες. Ενεργοποιεί τη σύνθεση ενζύμων που συμμετέχουν στη γλυκονεογένεση καθώς και μηχανισμών που συμβάλλουν στην εξασφάλιση πρόδρομων μορίων για τη σύνθεση γλυκόζης. Έτσι, ενεργοποιεί τον καταβολισμό των πρωτεϊνών ώστε να απελευθερωθούν τα αμινοξέα, προκαλώντας απώλεια μυικής μάζας. Επίσης, ενισχύει την αποικοδόμηση των τριγλυκεριδίων στο λιπώδη ιστό προσφέροντας ενέργεια και πρόδρομα μόρια για τη γλυκονεογένεση, αυξάνοντας έτσι τη γλυκόζη στο αίμα και επίσης, αυξάνει τα ένζυμα που συμμετέχουν στον κύκλο της ουρίας (Boardman C. et al, 2014).



Εικόνα 3. Ρύθμισης της έκκρισης γλυκοκορτικοειδών (Boardman C., 2014)

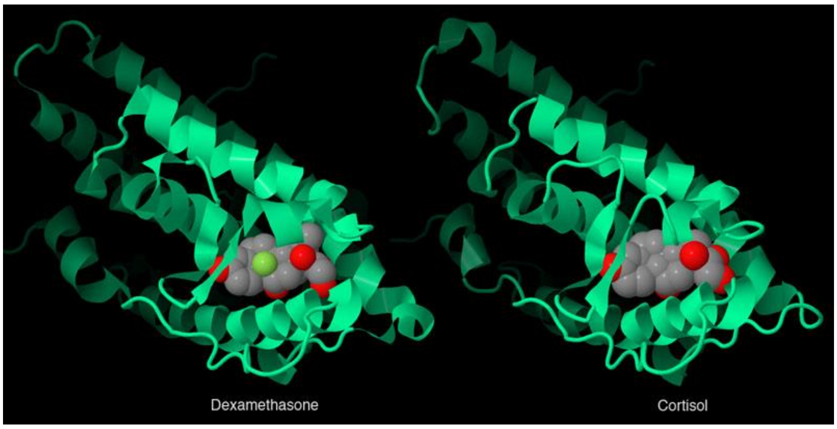


Εικόνα 4. Τα γλυκοκορτικοειδή δεξαμεθαζόνη (DEX) (αριστερά) και κορτιζόλη (δεξιά)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

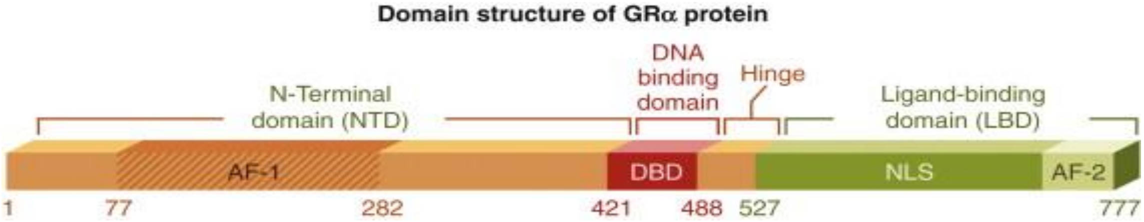
1.3.2 Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR)

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) είναι μια πρωτεΐνη περίπου 95 kDa, ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων των μεταγραφικών παραγόντων (TFs), κωδικοποιείται από το γονίδιο NR3C1 και αποτελείται από 777 αμινοξέα. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε ανενεγή μορφή, στον πυρήνα,μιτοχόνδρια και πλασματική μεμβράνη. (Psarra AM et al,2006). Οι εναλλακτικές θέσεις ματίσματος είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία ισομορφών υποδοχέων, για παράδειγμα των GRα, GRβ GRγ, GRA και GRP. Οι ισομορφές GRα, GRβ ως προϊόντα του ίδιου γονιδίου, αποτελούνται από οκτώ κοινά και ένα ένατο διαφορετικό εξόνιο (Bamberger et al., 1995). Ο GRα αποτελεί την κλασική ισομορφή GR, ενώ ο GRβ δρα ως αναστολέας της μεταγραφικής δραστηριότητας του GRα. Επιπλέον, αυτές οι ισομορφές υποβάλλονται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως μεθυλίωση, ακετυλίωση, νιτροζυλίωση, σουμοϋλίωση και φωσφορυλίωση, που επηρεάζουν τη σταθερότητα και τη λειτουργία του υποδοχέα (Onno C. et al,2018). Ο υποδοχέας GRβ δεν έχει ικανότητα δέσμευσης προσδέτη και η βιολογική του επίδραση οφείλεται μάλλον στον σχηματισμό ανενεργών διμερών με τον υποδοχέα GRα ή στον ανταγωνισμό με αυτόν για θέσεις δέσμευσης DNA. Στον υποδοχέα GRα γίνεται η σύνδεση των γλυκοκορτικοειδών (Hollenberg και Evans, 1988). Η παρουσία, στο γονίδιο GR, κωδικονίων ATG, τα οποία αντιστοιχούν στη met27, επιφέρει τη δημιουργία ενός δεύτερου υποδοχέα GR 91 kDa (GRα-B), πιο αποτελεσματικό από τον GRα-A 95 kDa στη γονιδιακή μετενεργοποίηση (Timmermans S. et al,2019). Η κορτιζόλη είναι η κύρια γλυκοκορτικοειδής ορμόνη και δρα σε όλο το σώμα μέσω του υποδοχέα GR για να συγχρονίσει τα όργανα και για να προσαρμοστούν σε στρεσογόνους παράγοντες.



Εικόνα 5. Ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (GR), (Abyad J., 2021)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169



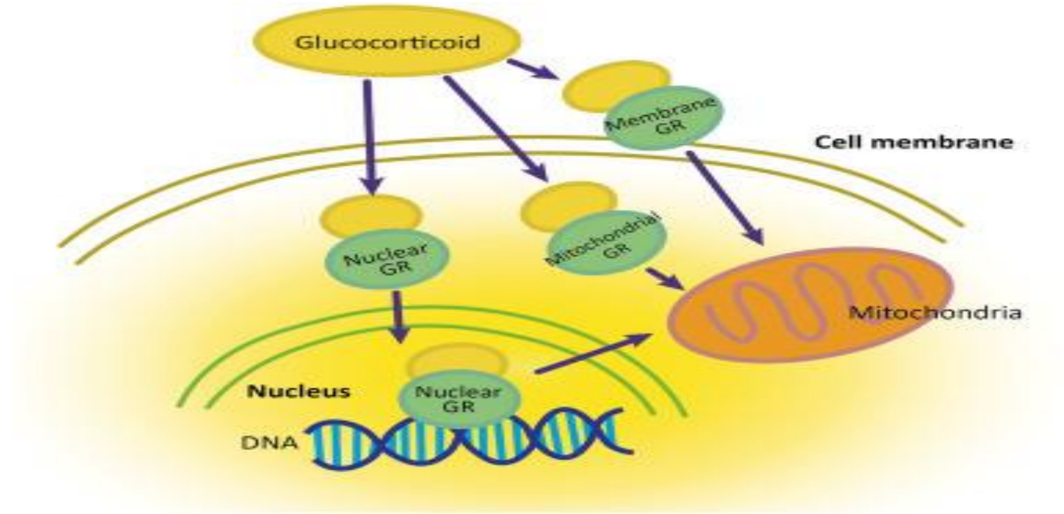
Εικόνα 6. Ρυθμιστικές περιοχές του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), (Smith L.K.,2010)

1.3.3 Σηματοδοτικά μονοπάτια του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών

i. Γονιδιωματικό μονοπάτι: Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, την κυτταρική μεμβράνη και τα μιτοχόνδρια. Κατά την ενεργοποίησή του, ο υποδοχέας αυτός μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα ή/και μιτοχόνδρια και λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας για τη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών, παραδείγματος χάριν του μεταβολισμού της γλυκόζης και της μιτοχονδριακής ομοιόστασης. Συγκεκριμένα, στον πυρήνα προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες που βρίσκονται στα γονίδια στόχους του GR, γνωστές και ως στοιχεία απόκρισης γλυκοκορτικοειδών (GREs). Επιπλέον, ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών μετακινείται στα μιτοχόνδρια για τη ρύθμιση της μεταγραφής του μιτοχονδριακού DNA (Choi G. et al,2021).

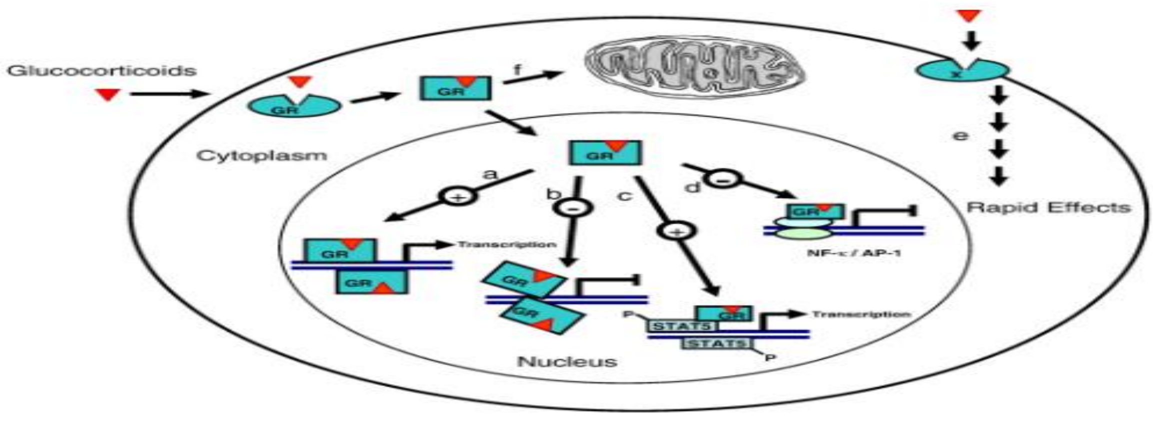
ii. Μη γονιδιωματικό μονοπάτι: Ο υποδοχέας GR προκαλεί μεταβολές στην κυτταρική λειτουργία, μετακινούμενος από την κυτταρική μεμβράνη στα μιτοχόνδρια ανεξάρτητα από τη μεταγραφή. Η μη γονιδιωματική οδός περιλαμβάνει τη δέσμευση του υποδοχέα GR με πρωτεΐνες της οικογένειας των Bcl-2, π.χ. την BAX, για τη ρύθμιση κασπασών και κινασών που συμμετέχουν στη μιτοχονδριακή απόπτωση και λειτουργία αντίστοιχα. Τέλος, ο υποδοχέας GR ενεργοποιεί δεύτερους αγγελιοφόρους για να επηρεάσουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων (Choi et al., 2018).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169



Εικόνα 7. Σηματοδοτικά μονοπάτια του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR), (Choi G.,2021)

Οι στεροειδείς ορμόνες με την σύνδεσή τους στους υποδοχείς στεροειδών και μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, μπορούν να ενεργοποιήσουν ή να αναστείλουν τη γονιδιακή μεταγραφή (a,b). Η ορμόνη μπορεί επίσης να οδηγήσει σε γρήγορες, μη γονιδιωματικές επιδράσεις μέσω της κλασσικής μορφής υποδοχέα, με υποδοχέα συζευγμένο με πρωτεΐνη G ή με μη αναγνωρισμένα μόρια (e). Επιπλέον, με τη σύνδεση της ορμόνης στον μεταγραφικό παράγοντα STAT5 ενεργοποιείται η μεταγραφική δραστικότητα του STAT5 (c), ενώ με τη σύνδεσή της στον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB ή τον ενεργοποιητή πρωτεϊνών-1 (AP-1), καταστέλλεται η δραστικότητα των μεταγραφικών αυτών παραγόντων (d). Στα μιτοχόνδρια, το σύμπλεγμα ορμόνης-υποδοχέα αλληλεπιδρά με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, ρυθμίζοντας τη μιτοχονδριακή μεταγραφή (f) (Psarra AM. et al,2008).

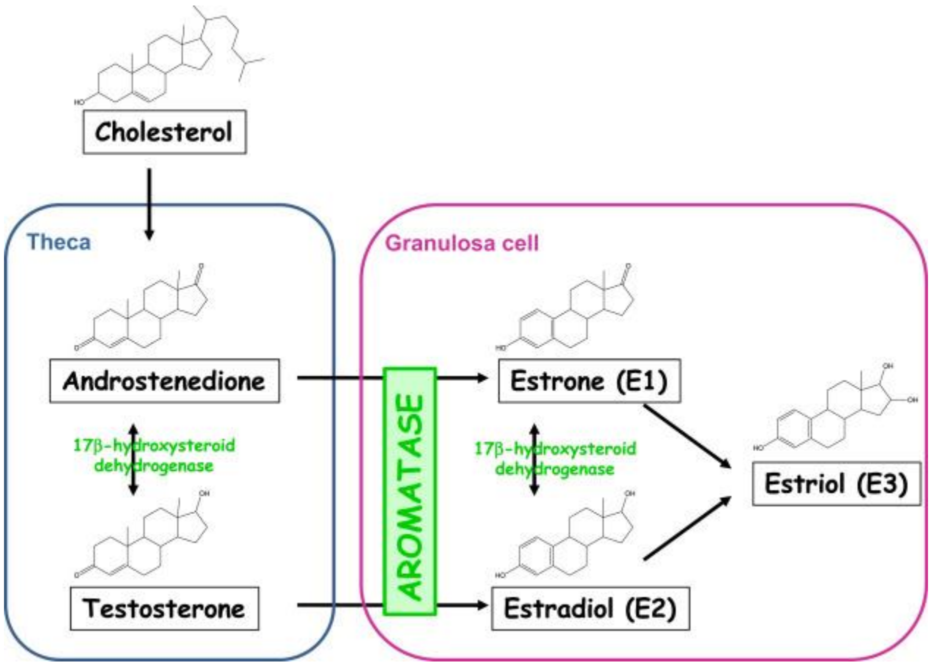


Εικόνα 8. Μηχανισμοί δράσης των γλυκοκορτικοειδών, (Psarra AM.,2008)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

1.3.4 Οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα είναι στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες συμβάλλουν στη διατήρηση φυλετικών χαρακτηριστικών και στην αναπαραγωγή, κυρίως στις γυναίκες. Παράγονται από τον πλακούντα , το ωχρό σωμάτιο, τα ωοθηλάκια και σε μικρότερες ποσότητες στο μαστό. Τα κυριότερα οιστρογόνα είναι η οιστρόνη (Ε1), η οιστραδιόλη (Ε2) και η οιστρόλη (Ε3). Διαθέτουν ένα φαινολικό δακτύλιο με μια ομάδα υδροξυλίου στον άνθρακα στη θέση 3. Το ισχυρότερο οιστρογόνο είναι η 17β-οιστραδιόλη, ενώ η οιστρόνη και η οιστριόλη είναι ασθενέστεροι αγωνιστές. Παρότι είναι ανενεργοί, η σημασία της ύπαρξής τους στους ιστούς είναι υπό διερεύνηση. Η παραγωγή των οιστρογόνων ξεκινά όταν η ανδροστενοδιόνη στα ωοθηλάκια εισβάλλει στα κύτταρα της ωοθήκης και μετατρέπεται σε οιστρόνη ή τεστοστερόνη και έπειτα σε οιστραδιόλη. Η μετατροπή της οιστρόνης σε οιστραδιόλη πραγματοποιείται από το ένζυμο 17β-HSD1 (Darbre P. ,2022).



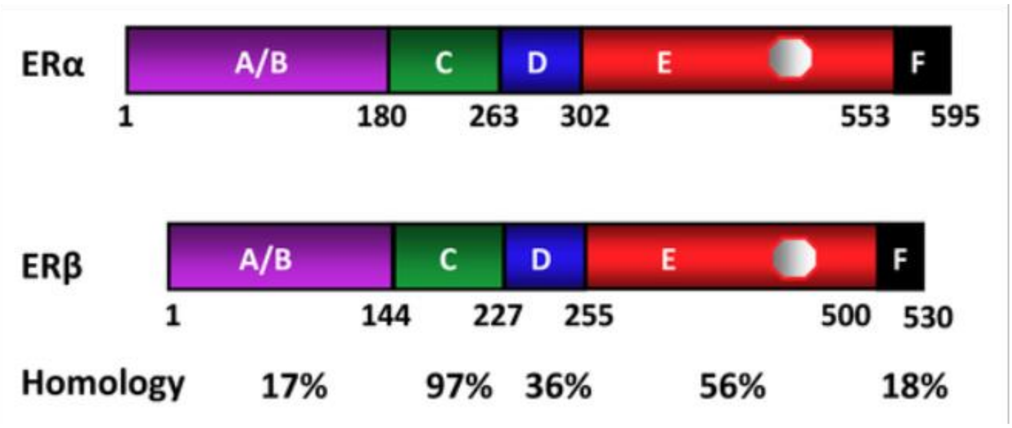
Εικόνα 9. Διάγραμμα ρύθμισης της έκκρισης οιστρογόνων από τις ωοθήκες, (Darbre P. ,2022)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

1.3.5 Ο υποδοχέας των οιστρογόνων (ER)

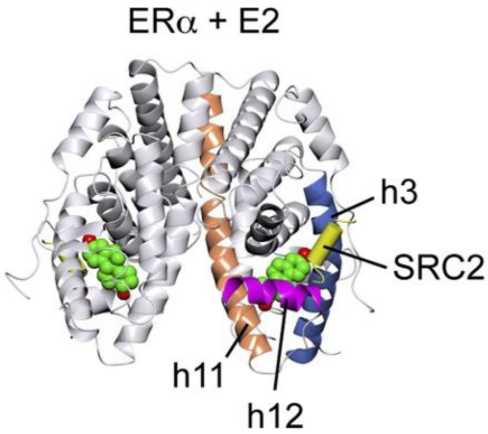
Ο υποδοχέας των οιστρογόνων (ER) ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και διαθέτει δυο υποτύπους, τον ERα και τον ERβ. Ο υπότυπος α αποτελείται από 595 αμινοξέα, αποτελεί μια πρωτεΐνη 67kDa, ενώ ο υπότυπος β από 530 αμινοξέα. Η 17β-οιστραδιόλη αποτελεί τον προσδέτη του υποδοχέα. Επιπλέον, υπάρχει και ο μεμβρανικός υποδοχέας οιστρογόνων συζευγμένος με G πρωτεΐνη (GPER), ο οποίος αποτελείται από 375 αμινοξέα, με μοριακό βάρος περίπου 42 kDa.

Οι υποδοχείς των οιστρογόνων διαθέτουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά, υπεύθυνα για τις διάφορες λειτουργίες τους και διακρίνονται σε έξι λειτουργικά διακριτές περιοχές. Οι αμινοτελικές περιοχές A/B διαθέτουν μια μικρή ομολογία αμινοξέων (17%) μεταξύ των υποδοχέων ERs. Η πανομοιότυπη κεντρική περιοχή C (97%) είναι η περιοχή σύνδεσης DNA (DBD). Η D περιοχή (36%) διαθέτει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και συνδέει την περιοχή C με την πολυλειτουργική περιοχή καρβοξυλικού άκρου (E). Η περιοχή E παρουσιάζει αρκετά υψηλή ομολογία αμινοξέων (56%) μεταξύ των υποδοχέων ER. Ονομάζεται διαφορετικά «περιοχή σύνδεσης συνδέτη» (LBD). Η περιοχή LBD είναι σφαιρική και διαθέτει μια θέση δέσμευσης ορμονών, μια διεπαφή διμερισμού και μια περιοχή αλληλεπίδρασης συν-ρυθμιστή, η οποία εξαρτάται από τον συνδέτη (AF-2). Με μικρή ομολογία αμινοξέων (18%), η περιοχή F βρίσκεται στο καρβοξυλικό άκρο των υποδοχέων (Yasar P. et al, 2016).



Εικόνα 10. Δομικές περιοχές των υποδοχέων οιστρογόνων (ERα, ERβ), (Yasar P.2016).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169



Εικόνα 11. Ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER), (J. C. Nwachukwu, 2014)

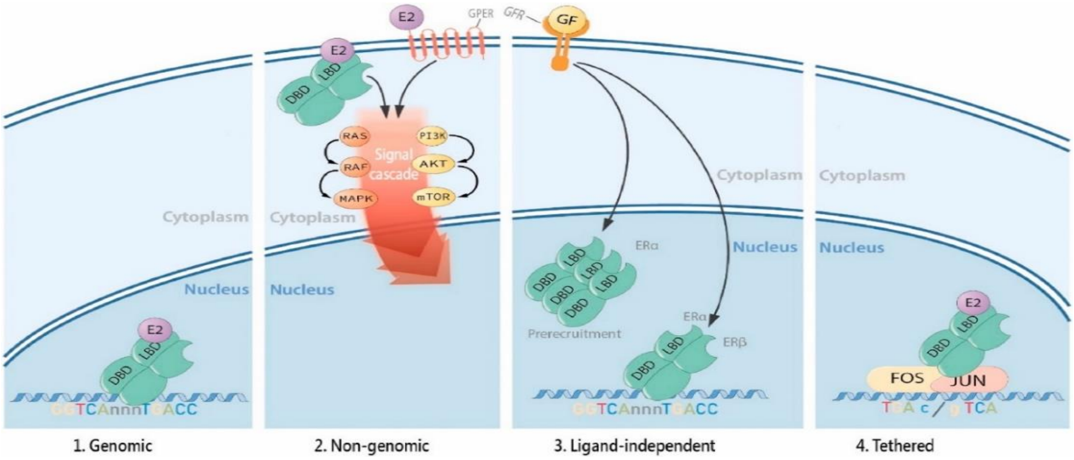
1.3.6 Σηματοδοτικά μονοπάτια του υποδοχέα οιστρογόνων

i. <u>Γενωμικό:</u> Οι ERα και ERβ διμερίζονται και μετατοπίζονται στον πυρήνα μετά τη δέσμευση του οιστρογόνου π.χ της 17β-οιστραδιόλης. Στον πυρήνα, συνδέονται με τα στοιχεία απόκρισης οιστρογόνου (ERE) ή αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων στόχων. Ο δεύτερος μηχανισμός είναι γνωστός ως «μηχανισμός συμπλοκοποίησης», καθώς περιλαμβάνει έμμεσες αλληλεπιδράσεις DNA που «συνδέουν» του υποδοχείς ER με άλλους μεταγραφικούς παραγοντες, όπως τα διμερή Fos/Jun (Safe and Kim, 2008).

ii. <u>Μη γενωμικό:</u> Η μη γονιδιωματική σηματοδότηση περιλαμβάνει αλληλεπίδραση μεταξύ της 17β-οιστραδιόλης και υποδοχέων ER ή του GPER. Οι αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης φέρουν γρήγορες αποκρίσεις σηματοδότησης, οι οποίες δεν περιλαμβάνουν μεταγραφικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης από τις οδούς AKT και MAPK. (Nanjappa et al., 2016).

iii. <u>Ανεξάρτητο συνδέτη:</u> Οι ανεξάρτητες από συνδέτη αποκρίσεις με τη μεσολάβηση του υποδοχέα ER παρατηρούνται με την ενεργοποίηση άλλων μονοπατιών, με αποτέλεσμα μεταγραφικές αποκρίσεις ανεξάρτητες από οιστρογονικούς συνδέτες στεροειδών. Υπάρχουν πολλά εξωκυτταρικά σήματα που μεσολαβούν στις δράσεις των μη δεσμευμένων υποδοχέων ERs συμπεριλαμβανομένων των πεπτιδικών αυξητικών παραγόντων (PGF), κυτοκινών, νευροδιαβιβαστών, άλλων ορμονών και μετάλλων. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα ER χωρίς προσδέτη οδηγεί σε καταρράκτες φωσφορυλίωσης. Μια αλληλεπίδραση σηματοδότησης ER συμβαίνει με πεπτιδικούς αυξητικούς παράγοντες (PGF), για παράδειγμα η οδός του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης (IGF-1): Ο IGF-1 ενεργοποιεί τον ER χωρίς συνδέτη και επίσης ρυθμίζεται από αυτόν (αμφίδρομη ρύθμιση), μέσω των ενεργοποιημένων πρωτεϊνικών κινασών (MAPKs), που οδηγούν τελικά σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του υποδοχέα ER (Biason-Lauber A. et al, 2022).

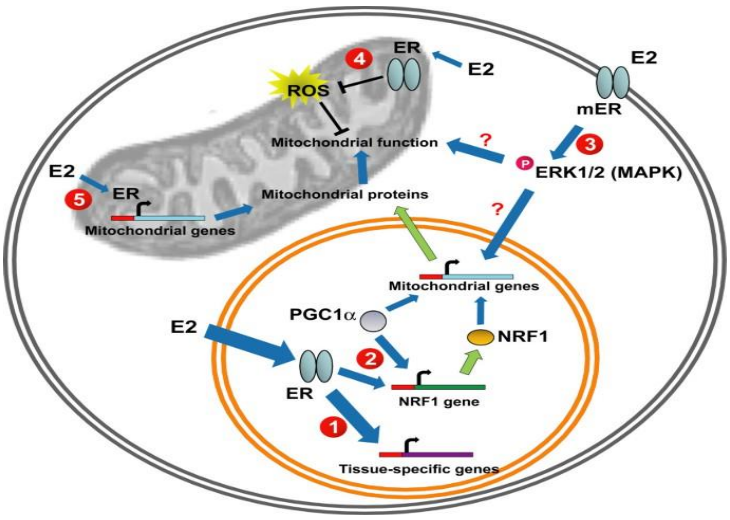
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169



Εικόνα 12. Σηματοδοτικά μονοπάτια του υποδοχέα οιστρογόνων (ER), (Lauber A. , 2022)

1.3.7 Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα οιστρογόνων

Τα οιστρογόνα συνδέονται με τους υποδοχείς οιστρογόνου (ERα και ERβ), συμβάλλοντας στην έκφραση γονιδίων ιστών που είναι απαραίτητα για τις κυτταρικές λειτουργίες (1). Επιπλέον, ρυθμίζεται η έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων, μέσω επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα PGC1α και NRF1 (2). Επίσης, ενεργοποιούνται οι καταρράκτες σηματοδότησης, οι οποίοι προστατεύουν τα μιτοχόνδρια από οξειδωτική βλάβη (3). Ακόμα, περιορίζεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS) στα μιτοχόνδρια (4). Τέλος, ρυθμίζεται άμεσα η έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων σε μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, υπεύθυνες για την λειτουργία των μιτοχονδρίων (5) (Michael C. Et al,2014).



Εικόνα 13. Μηχανισμοί δράσης των οιστρογόνων, (Michael C.,2014).

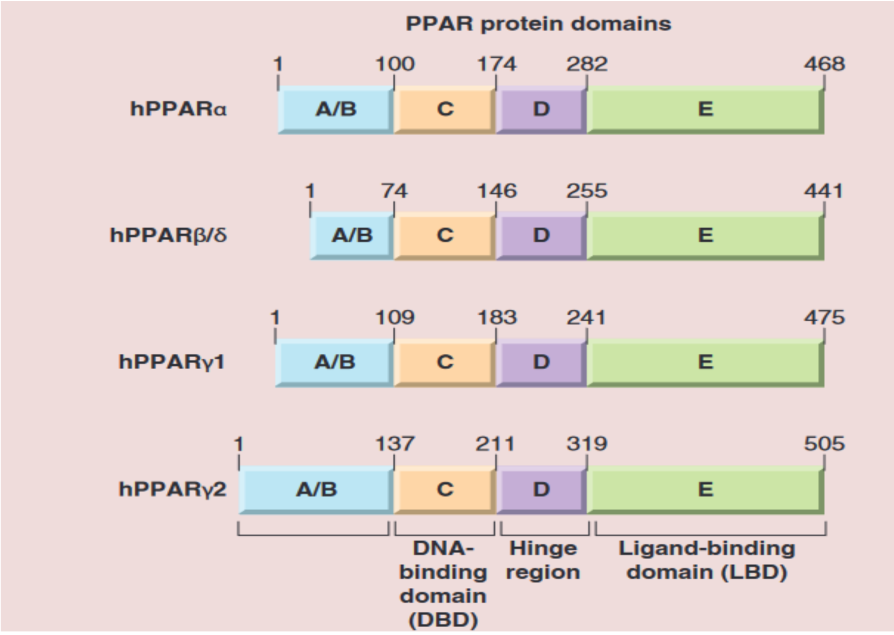
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

1.4 Υποδοχέας του πολλαπλασιαστή των υπεροξεισωμάτων ισομορφής α, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα)

Τα υπεροξεισώματα είναι υποκυτταρικά οργανίδια, τα οποία περιέχουν ένζυμα για το μεταβολισμό των λιπιδίων. Η δράση των υπεροξεισωμάτων μεσολαβείται μέσω υποδοχέων, των PPARs. Είναι μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι ενεργοποιούνται από προσδέτες που ανήκουν στην υπεροικογένεια των πυρηνικών ορμονικών υποδοχέων. Συμβάλλουν στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού, στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Περιέχουν τρεις ισομορφές: PPAR-α, PPARβ/δ και PPARγ, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια NR1C1,NR1C2 και NRC3 αντίστοιχα. Τα διμερή PPARα-RXR ενεργοποιούν γονίδια υπεύθυνα για το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, τον πολλαπλασιαμό των υπεροξεισωμάτων και την ομοιόσταση των λιπιδίων. Ο PPARα ελέγχει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε πολλές μεταβολικές οδούς της υπεροξεισωμικής και μιτοχονδριακής β-οξείδωσης, της δέσμευσης και ενεργοποίησης λιπαρών οξέων (Fatty Acids, FA), της σύνθεσης FA και λιπόλυσης, του μεταβολισμού λιποπρωτεϊνών, της γλυκονεογένεσης και των χολικών οξέων. Εκφράζεται σε ιστούς με υψηλούς ρυθμούς οξείδωσης FA, όπως η καρδιά, το συκώτι και οι σκελετικοί μύες. Επιπλέον, ο PPARα ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην αυτοφαγία και τη λιπόλυση τριγλυκεριδίων του ήπατος. (Sinha R. et al,2020).

Ο PPARα είναι μια πρωτεΐνη 55 kDa που αποτελείται από 468 αμινοξέα, μεταγράφεται από το γονίδιο PPARA, που αποτελείται από οκτώ εξόνια και περιέχει πέντε κύριους τομείς: το αμινοτελικό άκρο, την ανεξάρτητη περιοχή μετενεργοποίησης προσδέτη (ή A/B), την περιοχή σύνδεσης DNA (DBD) ή επικράτεια C, η οποία περιέχει δύο πολύ καλά διατηρημένα σύμπλοκα δακτύλων ψευδαργύρου, προάγοντας τη δέσμευσή του υποδοχέα στην ειδική αλληλουχία DNA στην περιοχή του προαγωγέα των γονιδίων των PPARs γνωστά ως στοιχεία απόκρισης υπεροξεισωμάτων (PPRE), την περιοχή της άρθρωσης ή D περιοχή λειτουργεί ως περιοχή σύνδεσης με συμπαράγοντες και για τη σύνδεση της DBD με την περιοχή δέσμευσης του προσδέτη E (LBD) και το καρβοξυτελικό άκρο. Η LDB συμβάλλει στο διμερισμό του υποδοχέα και στη σύνδεση συν-ενεργοποιητών και συν-απενεργοποιητών. Υπάρχουν δύο επικράτειες ενεργοποίησης: ένας στο αμινο τελικό άκρο (AF-1) και ένας στο καρβοξυλικό άκρο (AF-2). Η ενεργοποίηση AF-1 είναι αδύναμη, αλλά συνεργάζεται με το AF-2 στη δέσμευση του προσδέτη, οδηγώντας σε αυξημένη γονιδιακή μεταγραφή και έκφραση του PPAR-α, σχηματίζοντας ετεροδιμερή με τον υποδοχέα του ρετινοειδούς RXR. (Han L. Et al,2017).

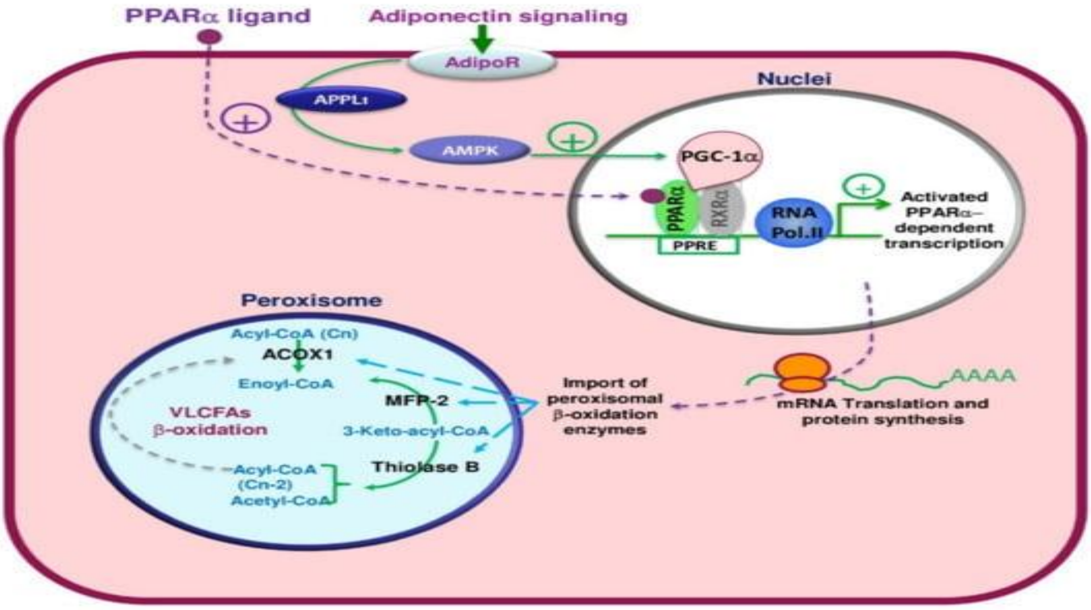
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169



Εικόνα 14. Δομικές περιοχές των υποδοχέων PPARs, (Han L. ,2017)

Η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων ενεργοποιείται από ασιτία, η οποία εξαρτάται από τον PPARα, κάτι που αποδεικνύεται από την εξασθένησή της σε ποντίκια χωρίς PPARα. Η αδιπονεκτίνη είναι μια ορμόνη που παράγεται από το λιπώδη ιστό, συμβάλλει στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων και της γλυκόζης, μετά την πρόσδεσή της στον υποδοχέα της αδιπονεκτίνης AdipoR. Η APPL1, μια πρωτεΐνη προσαρμογής, αποτελεί τον κύριο παράγοντα που συμβάλλει στη σηματοδότηση της αδιπονεκτίνης και της ινσουλίνης. Η πρωτεϊνική κινάση AMPK ρυθμίζει με μετα-μεταφραστική τροποποίηση τον συνενεργοποιητή του PPARγ, PGC-1α. Ο PGC-1α συνδέεται στον PPARα και τον υποδοχέα του ρετινοϊκού RXRα στον πυρήνα, όταν αυτοί συνδεθούν στις ειδικές αλληλουχίες DNA για τους PPARs, δηλαδή τα στοιχεία απόκρισης PPRE. Με αυτό τον τρόπο, ενεργοποιείται η δράση του υποδοχέα PPARα, οδηγώντας στη μετάφραση του mRNA και την σύνθεση πρωτεϊνών-ενζύμων της β-οξείδωσης των λιπαρών οξέων, της Ακυλ-CoA οξειδάσης Ι (ACOX1), της πολυλειτουργικής πρωτεΐνης θηλαστικών ΙΙ (MFP-2) και της Θειολάσης Β. Η ACOX1 μετατρέπει το Ακυλ-CoA σε Ενολ-CoA, η Θειολάση μετατρέπει το 3-κετο-ακυλ-CoA σε ακυλ- και ακετυλ-CoA , ενώ η MFP-2 το 3-κετο-ακυλ-CoA σε Ενολ-CoA. (Joutey M. et al,2021).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169



Εικόνα 15. Ρύθμιση της β-οξείδωσης από τον υποδοχέα PPARα (Joutey M.,2021)

1.5 Μιτοχόνδριο

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια υπεύθυνα για τις ενεργειακές ανάγκες των ευκαρυωτικών κυττάρων, μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στην αναπνευστική αλυσίδα και με κατανάλωση υψηλού ποσοστού οξυγόνου στην αερόβια παραγωγή ATP. Συνέπεια αυτού αποτελεί ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών (ROS). Εάν δεν δύναται να μειωθεί η παραγωγή ή απομάκρυνση ελευθέρων ριζών, οι ελεύθερες ρίζες συσσωρεύονται προκαλώντας αλλαγές στην αλληλουχία του DNA (μεταλλάξεις) και σε άλλα μακρομόρια, με αποτέλεσμα τη μειωμένη διαθεσιμότητα ATP και αυξημένο οξειδωτικό στρες, ενεργοποίηση της μιτοχονδριακής διαπερατότητας και έναρξης της κυτταρικής απόπτωσης. Τα μιτοχόνδρια είναι υπεύθυνα για αρκετές μεταβολικές διεργασίες, π.χ. κύκλος του Krebs, β-οξείδωση των λιπαρών οξέων και βιοσύνθεση της αίμης, αποκτώντας έτσι κεντρικό ρόλο στις κυτταρικές λειτουργίες. Συνεπώς, αυτά τα οργανίδια γίνονται δέκτες πολλών ρυθμιστικών σημάτων, που ρυθμίζουν το μεταβολισμό, καθώς και τις αναπτυξιακές και αποπτωτικές διεργασίες. Οι στεροειδείς και οι θυρεοειδικές ορμόνες, μεταξύ άλλων, αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές του μεταβολισμού, ενεργώντας στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια την επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου OXPHOS (Psarra AM. et al, 2008).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

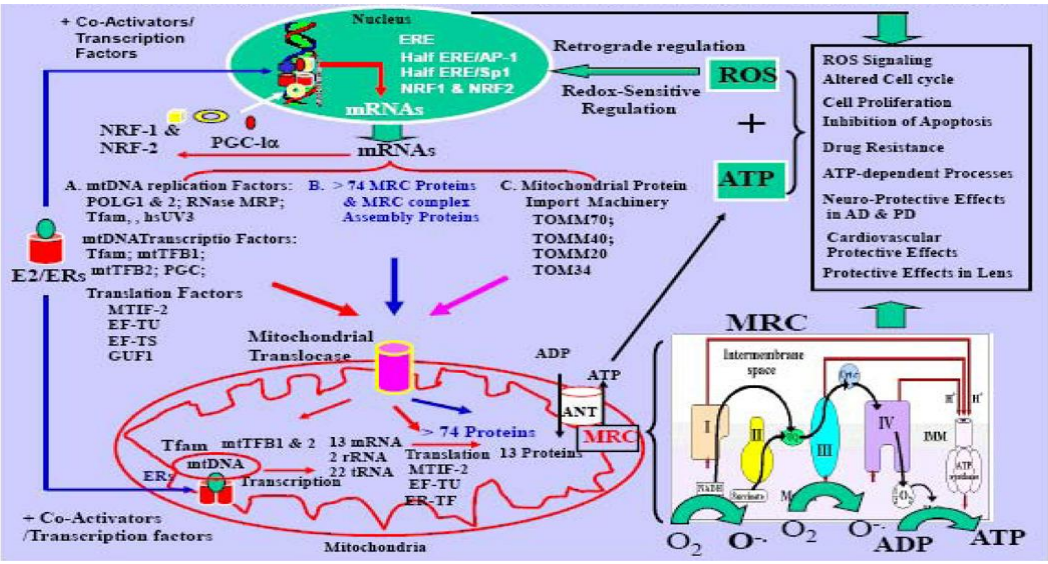
1.5.1 Ο ρόλος του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια

Τα γλυκοκορτικοειδή (GC) ρυθμίζουν την έκφραση των πυρηνικά κωδικοποιούμενων γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και του γονιδίου του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα mtTFA. . Η αναγνώριση των στοιχείων απόκρισης (GREs) στα γλυκοκορτικοειδή στο μιτοχονδριακό DNA και η ανίχνευση του γλυκοκορτικοειδούς υποδοχέα (GR) σε μιτοχόνδρια διαφορετικών τύπων κυττάρων σημαίνει ότι ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών GR ρυθμίζει άμεσα τη μιτοχονδριακή γονιδιακή έκφραση. Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) ελέγχουν μια ποικιλία διεργασιών που απαιτούν αυξημένη κατανάλωση ενέργειας, επομένως η ρύθμιση του μεταβολισμού της μιτοχονδριακής ενέργειας από τα γλυκοκορτικοειδή είναι ύψιστης σημασίας. Τα GCs μειώνουν τον έλεγχο της αναπνοής με την άμεση αναστολή της δράσης της οξειδάσης του κυτοχρώματος c σε μιτοχόνδρια από νεφρούς αρουραίου, αλλά και μέσω της αναστολής της δραστηκότητας των συμπλόκων I και V σε μιτοχόνδρια εγκεφάλου αρουραίου. Μελέτες έχουν εντοπίσει την παρουσία του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών σε μιτοχόνδρια διαφορετικών τύπων κυττάρων και ιστών, και έχουν επιβεβαιώσει την δράση των GCs στη μεταγραφή των μιτοχονδριακών γονιδίων μέσω της αλληλεπίδρασης του GR με τα μιτοχονδριακά GRE παράλληλα με την πυρηνική τους δράση. Πιο συγκεκριμένα, σε κύτταρα ηπατοκαρκινώματος (HepG2), ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) συνδέεται ειδικά με την D-ρυθμιστική περιοχή βρόγχου του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Ανακαλύφθηκε ότι επάγεται η έκφραση των μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων A, B1 και B2 (TFAM, TFB1M, TFB2M), του μιτοχονδριακού RNA 12S και 16S και πολλά μιτοχονδριακά κωδικοποιημένα γονίδια οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, όπως των ND 1–4, CYTB, ATP 6 και ATP 8 και COX I, υπό συνθήκες αναστολής της πυρηνικής μεταγραφής (Psarra et al,2011). Επιπλέον, στα κύτταρα HepG2 που υπερεκφράζουν τον μιτοχονδριακό υποδοχέα GR, παρατηρήθηκε αυξημένη σύνθεση RNA, υψηλή έκφραση πρωτεΐνης COX I, και μιτοχονδριακή παραγωγή ATP. (Psarra et al, 2011, Kokkinopoulou I.,2021).

1.5.2 Ο ρόλος του υποδοχέα των οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια

Τα οιστρογόνα, κυρίως η 17β-οιστραδιόλη (E2), επιδρούν σε πολλούς κυτταρικούς τύπους και όργανα, για παράδειγμα του καρδιαγγειακού, του ανοσοποιητικού, του γαστρεντερικού και αναπνευστικού συστήματος. Η αναπνευστική αλυσίδα (MRC) αποτελεί σημαντικό στόχο για τις δράσεις της οιστραδιόλης και των υποδοχέων οιστρογόνων (μιτοχονδριακό μονοπάτι). Τα γονίδια που εκφράζουν τις πρωτεΐνες MRC, κωδικοποιούνται από DNA (nDNA) και μιτοχονδριακό DNA (mtDNA). Η 17β-οιστραδιόλη (E_2) ρυθμίζει τη μεταγραφή πολλών γονιδίων mtDNA, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες συμπλέγματος MRC. Η παρουσία των ERα και ERβ στα μιτοχόνδρια υποδηλώνει την άμεση εμπλοκή τους στη μεταγραφή του mtDNA. Ο βρόχος D, η κύρια ρυθμιστική περιοχή του mtDNA περιέχει τέσσερα στοιχεία που ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα (mtEREs). Η 17β-οιστραδιόλη (E_2) προκαλεί την αλληλεπίδραση των υποδοχέων της με μεταγραφικούς παράγοντες, όπως των Tfam, TFB1M, TFB2M, κλπ μέσα στα μιτοχόνδρια, σχηματίζοντας ένα ενεργό μεταγραφικό σύμπλεγμα, ενισχύοντας έτσι τη μεταγραφή του mtDNA (Chen J.Q et al,2009).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169



Εικόνα 16. Ρόλος του υποδοχέα οιστρογόνων στα μιτοχόνδρια, (Chen J.Q.,2009)

1.6 Κυτταρική διαφοροποίηση

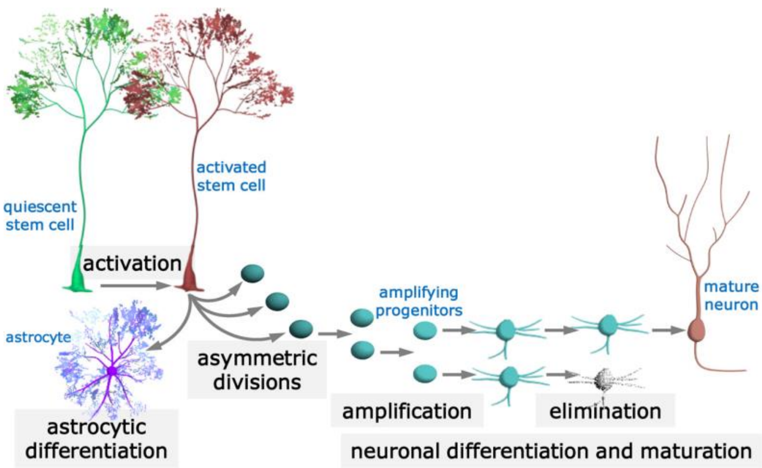
Κυτταρική διαφοροποίηση ονομάζεται η διαδικασία όπου ένα μη εξιδεικευμένο κύτταρο μετατρέπεται σε ένα εξειδικευμένο κυτταρικό τύπο. Λόγω της διαφοροποίησης αλλάζει σημαντικά το σχήμα και μέγεθος του κυττάρου, καθώς και η μεταβολική του δραστηριότητα και η ανταπόκρισή του σε σήματα. Οι αλλαγές αυτές οφείλονται στη γονιδιακή έκφραση, δεν αποκλείεται όμως και σε αλλαγή αλληλουχίας του DNA. Επιπροσθέτως, περιλαμβάνει την απενεργοποίηση γονιδίων που είναι περιττά σε ένα συγκεκριμένο ιστό. Έτσι, σε διαφορετικούς ιστούς τα κύτταρα ενώ έχουν ίδιο γονιδίωμα, διαθέτουν διαφορετικά φυσικά χαρακτηριστικά. Τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε άλλους κυτταρικούς τύπους, διαθέτουν πολυδυναμία και ονομάζονται βλαστοκύτταρα στα ζώα και μεριστωματικά κύτταρα στα φυτά (Inn Chuan Ng et al, 2017).

1.6.1 Διαφοροποίηση νευροβλαστών σε νευρικά κύτταρα

Τα Neuro-2a (N2A) αποτελούν μια κυτταρική σειρά, η οποία προέρχεται από νευρική ακρολοφία εγκεφάλου ποντικού και χρησιμοποιείται για τη μελέτη νευρώνων, τη νευρική διαφοροποίηση, την αξονική ανάπτυξη, κλπ. Τα N2A έχουν μορφολογία νευρωνικών και αμοιβοειδών βλαστοκυττάρων, που τους επιτρέπουν να διαφοροποιούνται ως απόκριση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες μέσα σε λίγες μέρες. Μετά την ενεργοποίησή τους, τα νευρικά βλαστοκύτταρα διαιρούνται συμμετρικά ή ασύμμετρα. Ο κύριος τρόπος διαίρεσης των ενεργοποιημένων βλαστοκυττάρων του ιππόκαμπου εγκεφάλου είναι ο ασύμμετρος. Η μείωση της νευρογένεσης όσο μεγαλώνει η ηλικία οφείλεται κυρίως στην ελάχιστη διαθεσιμότητα βλαστοκυττάρων και όχι σε μειωμένη τάση να διαιρεθούν.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

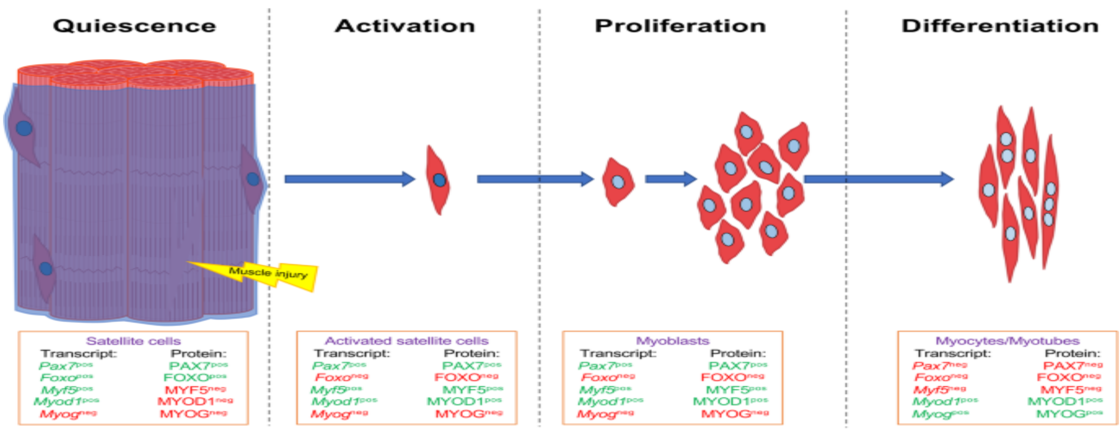
Ωστόσο, υπάρχει πιθανότητα με την υπερδιέγερση της διαίρεσης των βλαστοκυττάρων να οδηγηθούν στην πρόωρή τους εξάντληση (Lazutkin A. et al,2019). Η διαφοροποίηση τους σε νευρικά κύτταρα γίνεται αντιληπτή, καθώς σχηματίζουν πολύ μεγάλους άξονες, σε αντίθεση με τις μικρές νευρικές απολήξεις των νευροβλαστών. (Tremblay G. et al,2010).



Εικόνα 17. Διαφοροποίηση νευροβλαστών σε νευρικά κύτταρα, (Lazutkin A.,2019)

1.6.2 Διαφοροποίηση μυοινοβλαστών σε μυϊκά κύτταρα

Η κυτταρική σειρά των μυοβλαστών ποντικού C2C12 χρησιμοποιείται για τη μελέτη της μυογένεσης. Προκαλείται έξοδος των μυοβλαστών από τον κυτταρικό κύκλο, διαφοροποίηση και σύντηξη μεταξύ τους για σχηματισμό πολυπύρηνων μυο-σωλήνων. Κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, οι μυοσωληνίσκοι επιμηκύνονται και προκαλείται αύξηση των επιπέδων πρωτεϊνών, όπως μυοσίνη, α-ακτίνη, τροπονίνη, κλπ (Velica P. et al,2011). Οι μυοσωλήνες τελικά δημιουργούν τους διαφορετικούς τύπους μυικών ινών, χτίζοντας έτσι τους σκελετικούς μύες, υπεύθυνοι για την κίνηση και στάση του σώματος. Δείκτης διαφοροποίησης των μυοβλαστών αποτελεί η πρωτεΐνη MyoD1, με μοριακό βάρος περίπου 45kDa, της οποίας τα επίπεδά αυξάνονται τις πρώτες μέρες της διαφοροποίησης και έπειτα ξανά μειώνονται.



Εικόνα 18. Διαφοροποίηση μυοβλαστών σε μυικά κύτταρα, (Massenet J., 2021)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

1.6.3 Ο ρόλος των υποδοχέων στεροειδών ορμονών στη διαφοροποίηση

Μια από τις πιο σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες που συμμετέχουν οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών αποτελεί η διαφοροποίηση. Μελέτες σε νευροβλάστες ποντικού που διαφοροποιήθηκαν σε νευρικά κύτταρα παρουσία στεροειδών ορμονών όπως της E2, έδειξαν ότι υπάρχει μεγάλη αύξηση στην αναλογία του δείκτη διαφοροποίησης Tuj-1 των νευρώνων έναντι των νευροβλαστών. Η διαφοροποίηση των κυττάρων ρυθμίζεται από την ενδοκυτταρική οδό σηματοδότησης Ras/Raf/MAPK του υποδοχέα ERα (Nurnberg E. et al,2010). Επίσης, επιβεβαιώθηκε η επίδραση του υποδοχέα GR στην προώθηση ή καταστολή της διαφοροποίησης κυττάρων, όταν αυτά διαφοροποιήθηκαν παρουσία DEX (Bramble, M.S et al,2019).

1.7 Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση των πιθανών μεταβολών των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR), του υποδοχέα των οιστρογόνων ισομορφής α (ERα) και του υποδοχέα PPARα κατά την διαφοροποίηση κυττάρων νευροβλαστώματος και κυττάτων μυοβλαστών C2C12 από ποντικό, απουσία και παρουσία στεροειδών ορμονών. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης παρουσία και απουσία των ορμονών E2, DEX, DPN.

.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Επωαστήρας (Thermo Electron Corporation)	Ζυγός (KERN EW)
Υδατόλουτρο (P. Selecta)	Φωτόμετρο Spectronic 20 (GENESYSTEM)
Φυγόκεντρος (Entrofiger-BLII/PS Selecta)	Σετ εμφάνισης μεμβρανών (W.B Kodak)
Heat blocker (KISKER)	Quick spin (Nippon Genetics Europe GmbH)
Vortex (Bio Vortex V1)	Ανάστροφο Μικροσκόπιο (A. Kruss Optronic Germany)
Sonicator (helscher Ultrasound Technologies, UP400S)	Απαγωγός (Tel Star AV-30/70)
Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad mini-PROTEAN tetra cell)	Αναδευτήρας (Heidolph Rotamax)
Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (Biorad mini-trans Blot)	Συνεστιακό Μικροσκόπιο (Zeiss)

Πίνακας 1. Συσκευές και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας.

2.2 ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Φλάσκες για ανάπτυξη κυττάρων (Sarstedt)	Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Amersham Protran) Τετράγωνες καλυπτρίδες (Sigma) Αντικειμενοφόρες πλάκες (Sigma)
Πιάτα ανάπτυξης κυττάρων (Sarstedt)	Falcons 15ml, 50ml (Sarstedt) Tips για τις αυτόματες πιπέττες (Sarstedt)
Σιφώνια (Sarstedt)	Eppendorfs 1,5ml (Sarstedt)
Διηθητικά χαρτιά Whatman (Sigma)	Φωτογραφικά φιλμ ανίχνευσης σήματος (Fuji)

Πίνακας 2. Αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

2.3 Αντιδραστήρια-Διαλύματα-Αντισώματα

2.3.1 Αντιδραστήρια

APS (Sigma)	Tween 20 (Sigma)
Acrylamide (Bio-rad) Πολυβυνιλική αλκοόλη PVA	DMEM high glucose 4,5g/l -low glucose 1g/l και Horse Serum (HS) (Gibco)
ECL (Santa Cruz)	Trypsin-EDTA 5% 10x (Gibco)
Developer (Fuji)	DTT (SERVA)
Fixer (Fuji)	Protease Inhibitors (Sigma)
Bradford protein assay (Bio-rad)	Milk powder (Regilait)
SDS (Sigma)	Β-μερκαπτοαιθανόλη (Riedel de Haen)
TEMED (Applichem)	Protein ladder (Proteintech)
PMSF (SERVA)	Brophonelol blue (Fluka)
Χρωστική MitoTracker Red CMX-Ros (Thermo Fisher Scientific) Χρωστική Hoechst-33342 (Sigma)	PBS 10x (Gibco) Methanol (Sigma) Acetone (Sigma)

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας.

2.3.2 Διαλύματα

Lysis Buffer	20mM Tris pH 7.5, 250 mM NaCl, 0,5% v/v Triton 100X, 3mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, protease inhibors
APS 10%	0,1g APS σε 1ml ddH_2O
Διάλυμα Bradford	Αραίωση stock 5x σε 1x με ddH_2O
Sample Buffer 4x	1M Tris pH 6.8, 10% v/v SDS, 10% v/v γλυκερόλη, 5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% v/v κυανό της βρωμοφαινόλης
Running Buffer 10x	Διάλυση Tris και γλυκίνης σε ddH_2O
Transfer Buffer 10x	10% v/v Running Buffer 10x, 20% v/v MeOH , 0,05% v/v SDS, ddH_2O)
Tris-HCL 1.5M pH 8.8	Tris, ddH2O, ρύθμιση pH με προσθήκη HCL 12N
Tris 20mM pH 7.5	Tris 1M pH 7.5, ddH_2O
TBS 10x	Tris-base, NaCl, ρύθμιση pH στα 7.4-7.6 με προσθήκη HCL 12N
TBS-T 1x	ddH_2O, TBS 10x, Tween 20
Developer	Υπεύθυνο για την εμφάνιση σήματος

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

Fixer	Υπεύθυνο για τη μονιμοποίηση σήματος
PBS-T 1x	PBS 1x, 0,1% v/v Tween 20

Πίνακας 4. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας.

2.3.3 Θρεπτικά υλικά

1. DMEM low glucose 1.5g/l with phenol red [+] L-glutamate, [-] pyruvate
2. DMEM low glucose 1.5g/l without phenol red [+] L-glutamate, [-] pyruvate
3. DMEM high glucose 4.5g/l with 2% Horse Serum cis (2% HS cis)

Για την παραγωγή πλήρες θρεπτικού μέσου για την καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών προστίθενται: 10% FBS, 1% L-Gln, 1%P/S

2.3.4 Αντισώματα

Πρωτογενή αντισώματα έναντι	Δευτερογενή αντισώματα έναντι
GR 1/1000 (Santa Cruz)	Mouse IgG-HRP 1/50000 [γάλα σε σκόνη, TBST-1x, stock mouse IgG-HRP (Pierce)]
ERα 1/1000 (Proteintch)	Rabbit IgG-HRP 1/50000 [γάλα σε σκόνη, TBST-1x, stock rabbit IgG-HRP (Pierce)]
PPARα 1/500 (Santa Cruz)	
MyoD1 1/3000 (Proteintech)	
b actin 1/2000 (Proteintech)	

Πίνακας 5. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας.

2.4 Καλλιέργεια κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία ήταν οι Neuro-2a (N2A) και C2C12, οι οποίες προέρχονται από εγκέφαλο και μυ ποντικού αντίστοιχα. Το θρεπτικό υλικό και των δυο περιέχει 1g/L Glucose, 10% FBS, 1% L-Gln και 1%P/S. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν στους 37^{o}C και σε 5% CO_2.

2.5 Θρυψινοποίηση κυττάρων

Η θρυψινοποίηση συμβάλλει στην αποφυγή δημιουργίας κυτταρικών συσσωματωμάτων. Η θρυψίνη ως ένζυμο διασπά τις πεπτιδικές αλυσίδες των πρωτεϊνών που συγκρατούν τα κύτταρα στην επιφάνεια τις καλλιέργειας, κόβοντας το καρβοξυτελικό άκρο των αμινοξέων αργινίνη ή λυσίνη. Στη φλάσκα, αφού πρώτα αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό, προστίθεται θρυψίνη. Μετά από 2 λεπτά με έλεγχο στο μικροσκόπιο πρέπει όλα τα κύτταρα να είναι μεμονωμένα ή σε συσσωματώματα. Για τον τερματισμό της δράσης της θρυψίνης προστίθεται

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

τετραπλάσιος όγκος θρεπτικού υλικού από τον όγκο της θρυψίνης. Στη συνέχεια, τοποθετείται σε Falcon το περιεχόμενο της φλάσκας και φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά σε 1000rpm. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος, το οποίο περιέχει τα κύτταρα σε θρεπτικό υλικό για επανακαλλιέργεια.

2.6 Μέτρηση και στρώσιμο κυττάρων

Μετά τη θρυψινοποίηση, για την εκτέλεση των πειραμάτων απαιτείται η μέτρηση των κυττάρων. Για αυτό, 10 μL μεταφέρονται σε καλυπτρίδα στο αιμοκυτταρόμετρο neubauer και με το μικροσκόπιο βρέθηκε ο αριθμός των κυττάρων, αφού έγινε αναγωγή σε ml. Ο αριθμός των N2A κυμαίνεται στα 200.000 κύτταρα, ενώ των C2C12 στα 150.000. Ο τελικός όγκος του επιθυμητού αριθμού κυττάρων φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά σε 1000rpm. Έπειτα, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα που περιέχει τα κύτταρα διαλυτοποιείται σε DMEM με 10% FBS σε πιάτα 6 θέσεων (6 well plates). Τέλος, μεταφέρονται τα πιάτα στον κλίβανο για επώαση.

2.7 Προσθήκη ουσιών

N2A: Το στρώσιμο των κυττάρων N2A πραγματοποιήθηκε σε δυο πιάτα 6 θέσεων (διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα) σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Μετά από επώαση 36 ωρών, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από το ένα πιάτο και προστίθεται θρεπτικό μέσο DMEM με 2% FBS και ρετινοικό οξύ (20μM) για να διαφοροποιηθούν τα κύτταρα, ενώ στο άλλο πιάτο προστίθεται ξανά 10% FBS, καθώς δεν επιθυμούμε τη διαφοροποίησή τους. Μετά από 2 μέρες ξανά αφαιρείται το θρεπτικό με 2% FBS και ρετινοικό και προστίθεται θρεπτικό DMEM με 2% FBS cis (επεξεργασμένο με ενεργό άνθρακα) και ρετινοικό οξύ, ενώ το άλλο πιάτο επωάζεται ξανά με θρεπτικό που περιέχει 10% FBS. Το θρεπτικό με 2% FBS cis δεν περιέχει το δείκτη pH Phenol red, του οποίου η δομή μοιάζει με αυτή των στεροειδών ορμονών, με αποτέλεσμα τυχόν ψευδώς θετικά αποτελέσματα στο πείραμα, όσο αφορά τη δράση στεροειδών ορμονών. Επιπλέον, ο ενεργός άνθρακας συγχρονίζει τα κύτταρα να βρίσκονται στην ίδια φάση. Έπειτα από 2 μέρες γίνεται η προσθήκη ουσιών στα δυο πιάτα, μια ουσία στην κάθε θέση και συγκεκριμένα των: DEX (10^{-8}M) διαλυμένη σε EtOH, E2 (10^{-9}M), διαλυμένη σε EtOH και DPN (10^{-8}M), διαλυμένο σε DMSO.

C2C12: Στρώσαμε τρία πιάτα C2C12 (Μη διαφοροποιημένα (ND), διαφοροποιημένα (DIF) 4 και 6 ημερών) με θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS. Τη 2^{η} μέρα προστέθηκε στα πιάτα των DIF 4 και 6 ημερών DMEM με 2% HS cis ως μέσο διαφοροποίησης. Την 4^{η} μέρα προσθέσαμε 2% HS cis και τις ορμόνες E2, DEX, DPN. Επώαστηκαν για 48 ώρες. Την 6^{η} μέρα συλλέξαμε το πιάτο των DIF 4 ημερών, ανανεώσαμε το πιάτο των DIF 6 ημερών με 2% HS cis και προσθέσαμε τις ορμόνες E2 (10^{-9}M), DEX (10^{-8}M) και DPN (10^{-8}M),. Την 8^{η} μέρα, συλλέξαμε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

το πιάτο των DIF 6 ημερών. Στις συνθήκες που δε προστέθηκαν οι ουσίες αυτές προστέθηκαν οι διαλύτες τους DMSO και EtOH ως Control, συνθήκη αναφοράς.

2.8 Συλλογή και λύση κυττάρων

Προκειμένου να συλλεχθούν τα κύτταρα απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και γίνεται πλύση των κυττάρων με PBS 1x. Στη συνέχεια, συλλέγουμε τα κύτταρα σε Eppendorf με το scraper σε πάγο και φυγοκεντρούμε στους 4^{o}C για 5 λεπτά στα 2000rpm. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αποθηκεύεται στους -80^{o}C για πειραματικές χρήσεις. Επόμενο βήμα αποτελεί η λύση των κυττάρων με το Lysis Buffer, το οποίο περιέχει DTT (1M), protease inhibitors σε αραίωση 1/50 και PMSF (0,02M) σε πάγο για 25 λεπτά. Επιπλέον, για την διάσπαση υπολειμμάτων DNA επιτυγχάνεται λύση με υπερήχους , όπου εκτέθηκαν τα δείγματα σε αυτούς 5 φορές ανά 35s.

2.9 Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford-Παρασκευή δειγμάτων για Western Blot

Η μέθοδος Bradford στηρίζεται στο ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 που περιέχει το αντιδραστήριο Bradford μπορεί να μεταβάλλει το χρώμα της από καφέ σε μπλε , όταν προσδένεται με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Η μεταβολή αυτή σε απορρόφηση μπορεί να μετρηθεί στα 595nm. Το αντιδραστήριο πρέπει να αραιωθεί με ddH_2O από 5x σε 1x και να προστεθεί στα δείγματα με αναλογία 1/1000. Το τυφλό περιέχει lysis buffer. Ακολουθεί επώαση σε σκοτεινό μέρος για 20 λεπτά. Έπειτα, υπολογίζεται η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης με την κατασκευή πρότυπης καμπύλης BSA. Τέλος, με βάση τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το PC, προσθέτουμε στα δείγματα τους κατάλληλους όγκους sample buffer 4x και Tris-HCL pH 7,5 για την ηλεκτροφόρηση. Για τη διάσπαση της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών θερμαίνουμε τα δείγματα για 5 λεπτά πριν την ηλεκτροφόρηση στους 95^{o}C.

2.10 Ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE)

Το Western blotting αναφέρεται στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (PAGE) με βάση το μοριακό τους βάρος. Το SDS φορτίζει αρνητικά τις πρωτεΐνες, ώστε να μετακινηθούν με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προς την άνοδο, που είναι θετικά φορτισμένη. Για να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου δύο φάσεων. Η πρώτη φάση αποτελεί το gel επιστοίβαξης (Stacking gel σταθερής συγκέντρωσης), το οποίο είναι υπεύθυνο για την επιστοίβαξη των δειγμάτων των πρωτεϊνών με τέτοιο τρόπο, ώστε όλες να τρέξουν ταυτόχρονα, ξεκινώντας από το ίδιο ύψος. Η δεύτερη φάση αποτελεί το gel διαχωρισμού (Separating gel 10%), όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν ανάλογα με το μοριακό τους βάρος,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (90 Volt). Τα συστατικά του διφασικού πηκτώματος αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

Stalking gel	Separating gel (10%)
ddH_2O	ddH_2O
Tris-HCL 0,125M pH 6,8	Tris-HCL 0,375M pH 8,8
SDS 0,1% (w/v)	SDS 0,1% (w/v)
Acr 4% (w/v)	Acr 10% (w/v)
APS 1% (w/v)	APS 1% (w/v)
TEMED 0,04% (v/v)	TEMED 0,04% (v/v)

Πίνακας 6. Συστατικά του διφασικού πηκτώματος της ηλεκτροφόρησης.

2.11 Ηλεκτρομεταφορά

Μετά την ηλεκτροφόρηση ακολουθεί ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η μεμβράνη και η πηκτή μεταφέρονται σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer). Η τοποθέτησή του gel και της μεμβράνης στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς γίνεται ανάμεσα σε ένα ζευγάρι σφουγγαριών και ένα ζευγάρι διηθητικών χαρτιών Whatman.Πρέπει να αποφεύγονται φυσαλίδες που παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά των πρωτεϊνών στην εργασία αυτή έγινε κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 0,35A για 70 min.

2.12 Ανοσοανίχνευση πρωτεϊνών - Εμφάνιση σήματος

Η ανοσοανίχνευση σαν τεχνική συμβάλλει στο να εντοπιστεί μια καθηλωμένη σε μεμβράνη πρωτεΐνη με τη χρήση αντισώματος. Όταν η καθηλωμένη πρωτεΐνη που λειτουργεί ως αντιγόνο αλληλεπιδράσει με το πρωτογενές αντίσωμα, μπορεί να ανιχνευτεί με τη χρήση ενός δεύτερου αντισώματος, που εντοπίζει το πρωτογενές και συνδέεται σε αυτό. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ηλεκτρομεταφορά εμβαπτίζεται υπό ήπια ανάδευση για 1 ώρα σε Blocking Buffer ώστε να αποφευχθούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, μέσω της δέσμευσης πρωτεϊνών του γάλακτος σε αυτές. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης με   TBS-T 1x. Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα υπό συνεχή ανάδευση όλη τη νύχτα στους 4^{o}C. Έπειτα, ακολουθούν 5 πλύσεις της μεμβράνης με TBS-T 1x για 5min η κάθε μία υπό ανάδευση, και στη συνέχεια, επωάζεται η μεμβράνη ξανά υπό ανάδευση για 1 ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα , το οποίο φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένη υπεροξειδάση του χρένου (HRP). Τέλος, ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης με TBS-T 1x για 5min. Η ανίχνευση ειδικού σήματος, οφείλεται στο φαινόμενο της χημειοφωταύγειας, καθώς το δευτερογενές αντίσωμα , μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου ECL (διαλύματα A και B) και 3min στο σκοτάδι πριν τοποθετηθεί η μεμβράνη στην κασετίνα έκθεσης, δίνει προϊόν το οποίο παράγει έντονο φως, ώστε να αποτυπωθεί σε φωτογραφικό φιλμ σαν σκούρόχρωμη ζώνη. Υπεύθυνο για την εμφάνιση του σήματος στο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

φωτογραφικό φιλμ είναι το αντιδραστήριο Developer, ενώ για την μονιμοποίησή του σήματος το αντιδραστήριο Fixer.

2.13 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Οι κανονικοποιήσεις όλων των διαδικασιών του πειράματος πραγματοποιήθηκαν στο Microsoft Office Excel. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Image J για τις ποσοτικοποιήσεις των πρωτεϊνικών ζωνών, συμπεριλαμβανομένου της β-ακτίνης, ενώ για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Adobe Photoshop CC.

2.14 Τεχνική Ανοσοκυτταροχημείας

Η μέθοδος της ανοσοκυτταροχημείας συμβάλλει στον προσδιορισμό βιολογικών μορίων, στηριζόμενη στη σύνδεση πρωτεΐνης-αντιγόνου που μας ενδιαφέρει με το πρωτογενές αντίσωμα. Για την ανίχνευση του πρωτογενούς αντισώματος χρησιμοποιείται ένα δευτερογενές αντίσωμα που φέρει μια φθορίζουσα ουσία. Τα βήματα της τεχνικής είναι τα εξής:

1. <u>Χρώση των μιτοχονδρίων με την χρωστική MitoTracker CMX-Ros (200nM):</u> Καλυπτρίδες τοποθετούνται σε τρυβλία, όπου αναπτύσσονται τα κύτταρα, παρουσία κατάλληλου θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα επωάζονται με την CMX για 30 λεπτά και έπειτα αφαιρείται το θρεπτικό μέσο.

2. <u>Μονιμοποίηση των κυττάρων:</u> Αρχικά, προστίθεται κρύα (-20^{o}C) μεθανόλη υπεύθυνη για τη διατήρηση της δομής των κυττάρων στα τρυβλία ανάπτυξής τους και αυτά τοποθετούνται για 10 λεπτά στους -20^{o}C. Στη συνέχεια, αφαιρείται και προστίθεται κρύα ακετόνη στα κύτταρα, τα οποία τοποθετούνται πάλι στους -20^{o}C για 2 λεπτά. Η ακετόνη καθιστά τη μεμβράνη διαπερατή στα αντισώματα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Τέλος, αφαιρείται η ακετόνη και κάνουμε πλύση με PBS 1x. Αφότου αυτό αφαιρεθεί, οι καλυπτρίδες τοποθετούνται στους -20^{o}C.

3. <u>Χρώση πυρήνων:</u> Για τη χρώση των πυρήνων, χρησιμοποιούμε τη χρωστική Hoechst διαλυμένη σε PBST-1x σε τελική συγκέντρωση 1/1000 (1μg/ml). Τα κύτταρα επωάζονται με αυτή για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σκοτεινό μέρος. Ακολουθούν 2-3 πλύσεις με PBS 1x. Τέλος, επιστρώνουμε τις καλυπτρίδες σε αντικειμενοφόρες πλάκες με το διάλυμα PVA.

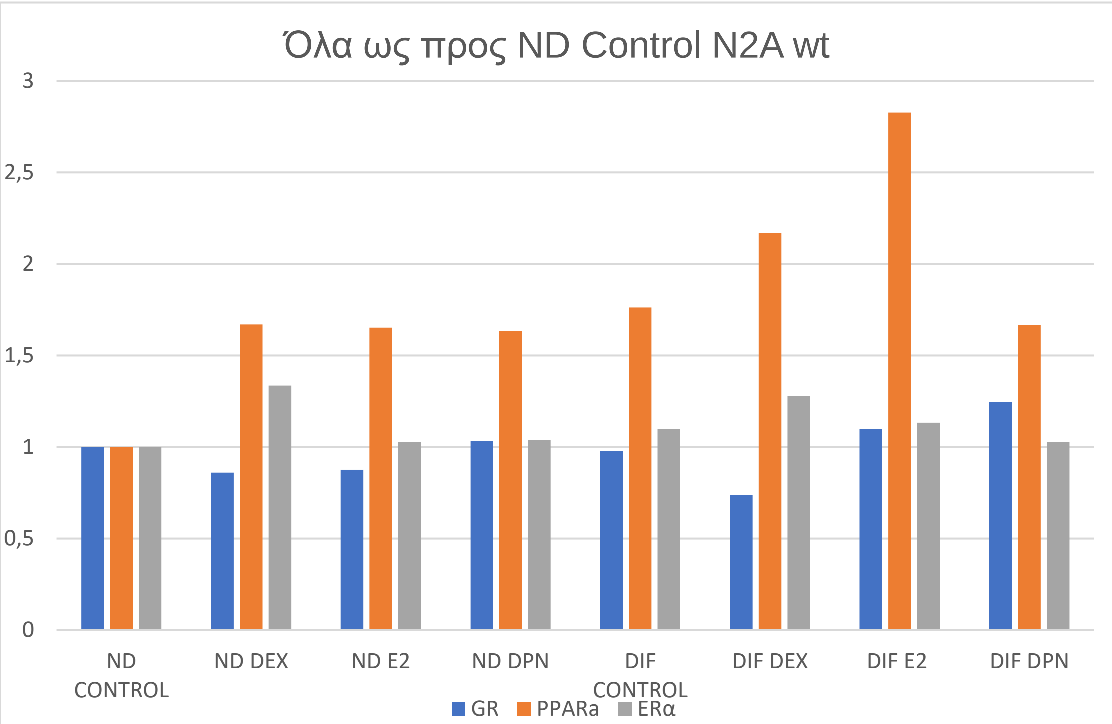
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αξιολόγηση του ρόλου των υποδοχέων στεροειδών ορμονών στη διαφοροποίηση κυττάρων Neuro-2a (N2A) παρουσία και απουσία E2, DEX, DPN

Προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, συγκεκριμένα των GR, ERα καθώς και του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα PPARα στην κυτταρική διαφοροποίηση, διερευνήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων σε κύτταρα Neuro-2a (N2A). Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS για 36 ώρες, έπειτα με DMEM με 2% FBS και ρετινοϊκού οξέους (20μM), ως μέσου διαφοροποίησης και μετά από 2 μέρες με DMEM με 2% FBS cis και ρετινοϊκό οξύ (20μM). Μετά από 2 μέρες, προστέθηκαν οι ορμόνες E2 (10^{-9} M) διαλυμένη σε EtOH, DEX (10^{-8} M) διαλυμένη σε EtOH και DPN (10^{-8} M) διαλυμένο σε DMSO. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και τα επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων και β-ακτίνης διερευνήθηκαν μέσω της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Ως μόριο κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη.

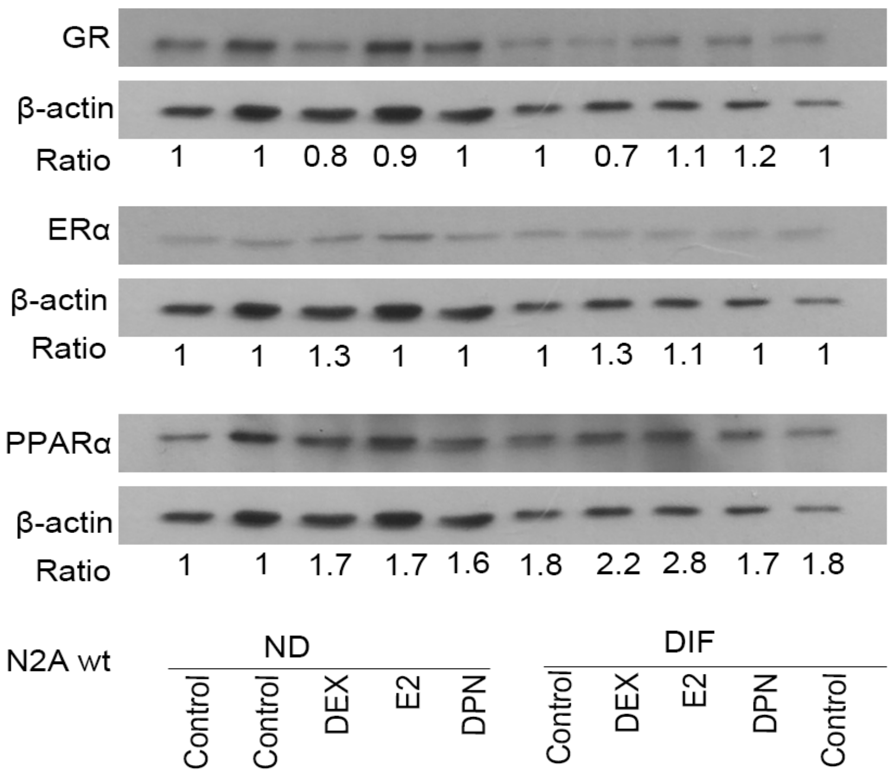
A)



Διάγραμμα 1. Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων GR, ERα και PPARα και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών του μορίου β-ακτίνης στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα Neuro-2a (N2A). ND: μη διαφοροποιημένα, DIF: διαφοροποιημένα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

Στο **Διάγραμμα 1.** παρατηρούμε ότι ο GR παραμένει σχετικά σταθερός, καθώς διακρίνεται μόνο μια μικρή αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του κατά 9% στα διαφοροποιημένα κύτταρα παρουσία E2 και κατά 20% παρουσία DPN. Παρατηρούμε επίσης μια μικρή μεταβολή του ERα, καθώς αυξάνεται κατά 30% στα διαφοροποιημένα και μη διαφοροποιημένα κύτταρα αναφοράς. Αντιθέτως, παρατηρούμε μια πολύ μεγάλη αύξηση κατά 60% του PPARα στα διαφοροποιημένα και μη κύτταρα παρουσία όλων των ορμονών. Στα διαφοροποιημένα, η αύξηση αυτή ενισχύεται παρουσία E2 και DEX, καθώς είναι μεγαλύτερη της μονάδας. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα των μορίων απεικονίζονται αναλυτικά βάση κάθε συνθήκης στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 19. Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων GR,ERα και PPARα σε διαφοροποιημένα και μη κύτταρα N2A παρουσία και απουσία ορμονών E2 (10^{-9}M), DEX (10^{-8}M), DPN (10^{-8}M).

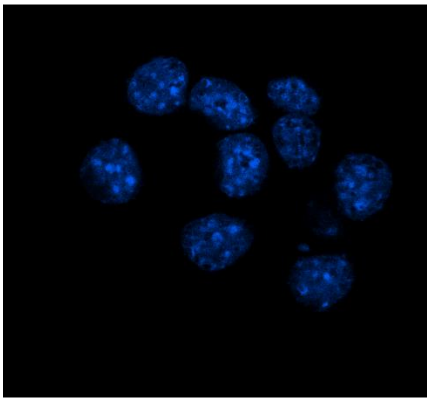
Σύμφωνα με τους λόγους των μορίων που απεικονίζονται στην **Εικόνα 19.** , συμπεραίνουμε ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR και του ERα παραμένουν σχετικά σταθερά, σε αντίθεση με αυτά του PPARα , τα οποία αυξάνονται τόσο παρουσία ορμονών όσο και κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

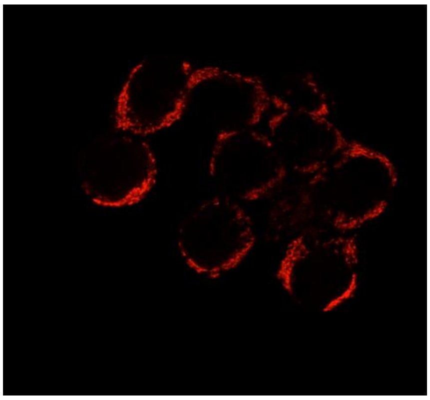
Επιπλέον, προκειμένου να ελέγξουμε εάν τα N2A κύτταρα διαφοροποιήθηκαν, εφαρμόσαμε τεχνικές ανοσοκυτταροχημείας. Αρχικά, για τη χρώση των μιτοχονδρίων των κυττάρων χρησιμοποιήσαμε τη χρωστική CMX , έπειτα μονιμοποιήσαμε τα κύτταρα με κρύα μεθανόλη και ακετόνη (-20^{O}C) και τέλος για τη χρώση των πυρήνων χρησιμοποιήσαμε τη χρωστική Hoechst. Οι εικόνες φθορισμού που ελήφθησαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο απεικονίζονται στην **Εικόνα 20**.

A) Μη διαφοροποιημένα N2A κύτταρα

Hoechst

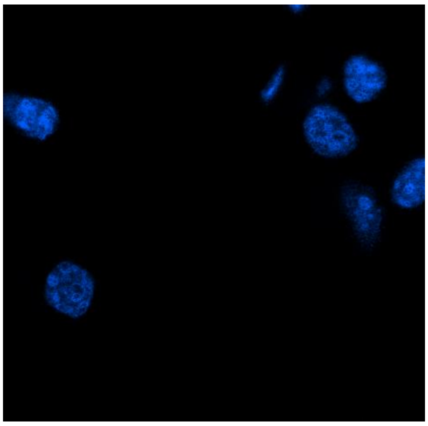


CMX

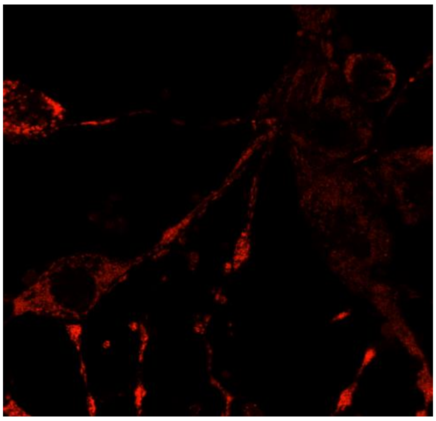


B) Διαφοροποιημένα N2A κύτταρα

Hoechst



CMX



Εικόνα 20. Υποκυτταρικός εντοπισμός των πυρήνων και των μιτοχονδρίων των N2A κυττάρων. A) Μη διαφοροποιημένα N2A κύτταρα, B) Διαφοροποιημένα N2A κύτταρα.

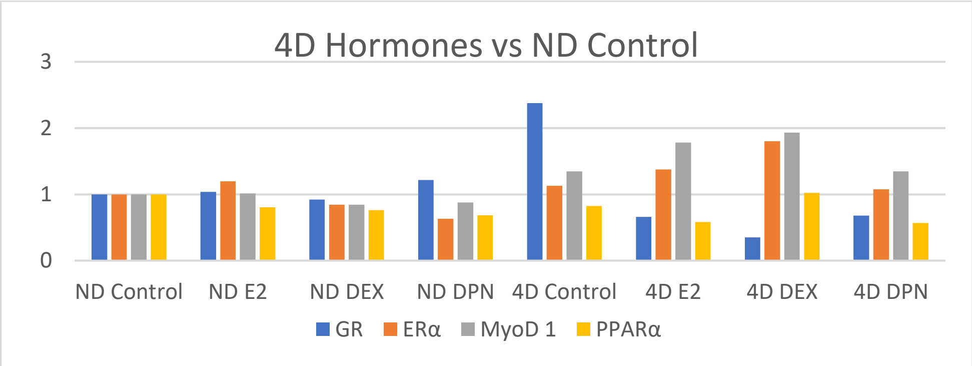
Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εμφανής η διαφοροποίηση των N2A κυττάρων, καθώς παρατηρούμε την ύπαρξη μεγάλων αξόνων ή αλλιώς νευρικών απολήξεων να εκβάλλουν από τα μιτοχόνδρια (Εικόνα B,CMX) σε αντίθεση με τα μη διαφοροποιημένα N2A, όπου κάτι τέτοιο δεν είναι εμφανές στο αντίστοιχη εικόνα (Εικόνα A, CMX).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

3.2 Αξιολόγηση του ρόλου των υποδοχέων στεροειδών ορμονών στη διαφοροποίηση κυττάρων C2C12 παρουσία και απουσία E2, DEX, DPN

Προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος των υποδοχέων των στεροειδών ορμονών, συγκεκριμένα των GR, ERα και PPARα στην κυτταρική διαφοροποίηση, διερευνήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων σε κύτταρα ποντικού C2C12, μετά από 4 και 6 ημέρες επαγωγής διαφοροποίησης. Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα επωάστηκαν σε θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS για 36 ώρες και έπειτα από 2 μέρες με DMEM με 2% HS cis ως μέσο διαφοροποίησης. Μετά από 2 μέρες, προστέθηκαν οι ορμόνες E2 (10^{-9} M) διαλυμένη σε EtOH, DEX (10^{-8} M) διαλυμένη σε EtOH και DPN (10^{-8} M) διαλυμένος σε DMSO. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και τα επίπεδα των μεταγραφικών παραγόντων και β-ακτίνης διερευνήθηκαν μέσω της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Ως μόριο κανονικοποίησης των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η β-ακτίνη. Επίσης προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του παράγοντα MyoD1, που αποτελεί δείκτη διαφοροποίησης.

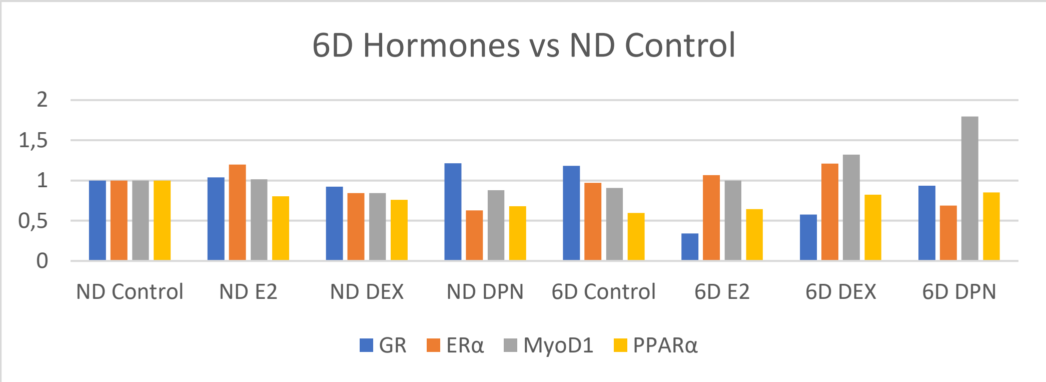
A) 4 ημέρες διαφοροποίησης



Διάγραμμα 2. Ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων GR, ERα και PPARα και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών του μορίου β-ακτίνης στα ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα C2C12. ND: μη διαφοροποιημένα, 4D: 4 ημέρες διαφοροποίησης.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

B) 6 ημέρες διαφοροποίησης



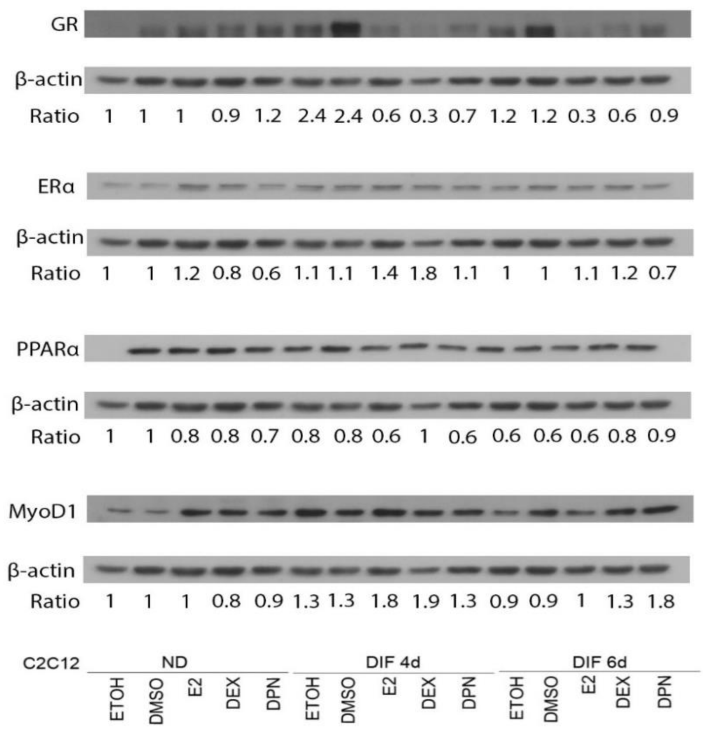
Διάγραμμα 3. Κανονικοποίηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών ζωνών των μορίων GR, ERα ,MyoD1 και PPARα ως προς την πυκνότητα των πρωτεϊνικών ζωνών του μορίου β-actin στα διαφοροποιημένα 6 ημερών κύτταρα C2C12. ND: μη διαφοροποιημένα, 6D: 6 ημέρες διαφοροποίησης

Στο **Διάγραμμα 2** παρατηρούμε αύξηση του GR περίπου κατά 1,5 μονάδα στις 4 μέρες διαφοροποίησης απουσία ορμονών , αλλά μείωσή του κατά 30% παρουσία E2, DPN και 70% παρουσία DEX. Αντιθέτως, ο ERα αυξάνεται κατά 40% παρουσία E2 και 80% παρουσία DEX. Επιπλέον, παρατηρείται μείωση του PPARα περίπου κατά 40% παρουσία E2, DPN στις 4 μέρες αλλά και απουσία ορμονών κατά 20%. Τέλος, η MyoD1 ως δείκτης διαφοροποίησης των μυϊκών κυττάρων αυξάνεται στις 4 μέρες διαφοροποίησης κατά 30% απουσία ορμονών, ενώ παρουσία αυτών περίπου στο 80-90%.

Στο **Διάγραμμα 3** διακρίνουμε την αύξηση του GR κατά 18% στις 6 μέρες διαφοροποίησης απουσία ορμονών, μείωσή του κατά 70% παρουσία E2 και 40% παρουσία DEX. O ERα φαίνεται να παρουσιάζει μικρή αύξηση κατά 20% παρουσία DEX και μικρή μείωση κατά 20% παρουσία DPN. O PPARα μειώνεται παρουσία ορμονών περίπου στο 20-40% και απουσία ορμονών κατά 40%. Τέλος, η MyoD1 παρουσιάζει αύξηση κατά 30% παρουσία DEX και μεγαλύτερη αύξηση 80% παρουσία DPN.

Τα αποτελέσματα Western Blot ανάλυσης απεικονίζονται στην **Εικόνα 21.**

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169



Εικόνα 21. Απεικόνιση των πρωτεϊνικών επιπέδων των μορίων GR, ERα και PPARα σε μη διαφοροποιημένα και 4 και 6 ημέρες μετά την επαγωγή διαφοροποίηση κυττάρων C2C12 παρουσία και απουσία ορμονών E2 (10^{-9}M), DEX (10^{-8}M), DPN (10^{-8}M).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και ανάλυση αυτών, όπως απεικονίζεται από τους λόγους των επιπέδων των υπό εξέταση μορίων σε σχέση με τα επίπεδα ακτίνης (**Εικόνα 21)**, προκύπτει ότι GR φαίνεται να αυξάνεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης κυρίως στο χρονικό διάστημα των 4 ημερών, αύξηση που φαίνεται να αναιρείται στο χρονικό διάστημα των 6 ημερών. Η παρουσία E2 κατά 4 και 6 ημέρες φαίνεται να προκαλεί μείωση των επιπέδων του. Ο ERα φαίνεται να παραμένει σταθερός κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης τόσο των 4 όσο και των 6 ημερών. Ωστόσο η παρουσία E2 και DEX φαίνεται να προκαλεί αύξηση των επιπέδων του στο χρονικό διάστημα των 4 ημερών, δράση η οποία δεν παρατηρείται στις 6 ημέρες. Ο PPARα δείχνει να μειώνεται όσο περνάνε οι μέρες της διαφοροποίησης. Τέλος, η MyoD1 φαίνεται να ακολουθεί το αναμενόμενο μοτίβο καθώς αυξάνεται στις 4 ημέρες και στη συνέχεια επανέρχεται σε σταθερά επίπεδα. Μοτίβο όμοιο με αυτό της μεταβολής των επιπέδων του GR. Επίσης, η MyoD1 παρουσιάζει μέγιστο στις 4 ημέρες παρουσία E2 και DEX. Παρατηρούμε και μια αύξηση της στις 6 ημέρες παρουσία DPN.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών συμμετέχουν σε μια πληθώρα λειτουργιών των ευκαρυωτικών κυττάρων, όπως της κυτταρικής διαφοροποίησης, της ανάπτυξης, της αναπαραγωγής και του μεταβολισμού. Αποτελούν μέλη μιας υπεροικογένειας μεταγραφικών παραγόντων , οι οποίοι συμβάλλουν στον έλεγχο της μεταγραφής των γονιδίων στόχων μετά τη σύνδεσή τους με τους αντίστοιχους προσδέτες, στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες είναι λιπόφιλα μόρια. Επίσης, ελέγχουν τη μεταγραφή μιτοχονδριακών γονιδίων. Στους υποδοχείς στεροειδών ορμονών ανήκουν ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) , ο υποδοχέας των οιστρογόνων (ERα) , κλπ (Heitzer M. et al, 2007).

Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν στεροειδείς ορμόνες που συμβάλλουν στην απελευθέρωση της γλυκόζης και στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών των τριγλυκεριδίων στο λιπώδη ιστό προσφέροντας ενέργεια και πρόδρομα μόρια για τη γλυκονεογένεση, αυξάνοντας έτσι τη γλυκόζη στο αίμα. Η κορτιζόλη αποτελεί το κυριότερο γλυκοκορτικοειδές. (Boardman C. et al, 2014). Τα οιστρογόνα συμβάλλουν στη διατήρηση φυλετικών χαρακτηριστικών και στην αναπαραγωγή, κυρίως στις γυναίκες. Τα κυριότερα οιστρογόνα είναι η οιστρόνη (Ε1) , η οιστραδιόλη (Ε2) και η οιστρόλη (Ε3). Το οιστρογόνο-συνδέτης του υποδοχέα ER είναι η 17β-οιστραδιόλη (Darbre P. et al ,2022). Τα υπεροξεισώματα είναι υποκυτταρικά οργανίδια τα οποία περιέχουν ένζυμα για το μεταβολισμό των λιπιδίων. Ο PPARα συμμετέχει σε πληθώρα λειτουργιών, μία εκ των οποίων αποτελεί η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων.

Μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι η διαφοροποίηση τους, όπου ένα μη εξιδεικευμένο κύτταρο μετατρέπεται σε ένα εξειδικευμένο κυτταρικό τύπο, αλλάζοντας το σχήμα, το μέγεθος καθώς και τη μεταβολική τους δραστηριότητα. (Inn Chuan Ng et al, 2017).

Αρχικά, επωάσαμε κύτταρα N2A με θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS, το οποίο αντικαταστάθηκε μετά από 36 ώρες με 2% FBS και ρετινοϊκό οξύ (20μM) για την επαγωγή της διαφοροποίησης των κυττάρων. Παράλληλα αναπτύχθηκαν και κύτταρα αναφοράς, μη διαφοροποιημένα (ανάπτυξη σε θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS). Μετά από 2 μέρες ξανά αλλάξαμε το θρεπτικό με 2% FBS και ρετινοϊκό και προσθέσαμε θρεπτικό DMEM με 2% FBS cis και ρετινοϊκό οξύ στα διαφοροποιημένα μόνο κύτταρα. Έπειτα από 2 μέρες έγινε η προσθήκη ορμονών στα διαφοροποιημένα και μη κύτταρα, μια ουσία στην κάθε θέση και συγκεκριμένα των: DEX (10^{-8}M) διαλυμένη σε EtOH, E2 (10^{-9}M), διαλυμένη σε EtOH και DPN (10^{-8}M), διαλυμένο σε DMSO.

Όσον αφορά τα C2C12, τα επωάσαμε με θρεπτικό μέσο DMEM με 10% FBS. Τη 2η μέρα προστέθηκε στα πιάτα με τα κύτταρα που επιθυμούμε να διαφοροποιηθούν DMEM με 2% HS cis, ως μέσο διαφοροποίησης. Την 4η μέρα προσθέσαμε 2% HS cis και τις ορμόνες DEX (10^{-8}M) , E2 (10^{-9}M), και DPN (10^{-8}M). Την 6η μέρα συλλέξαμε το πιάτο των διαφοροποιημένων 4 ημερών, ανανεώσαμε το πιάτο των διαφοροποιημένων κυττάρων των 6

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

ημερών με 2% HS cis και προσθέσαμε τις ορμόνες E2, DEX, DPN. Τέλος, την 8η μέρα, συλλέξαμε το πιάτο των διαφοροποιημένων κυττάρων των 6 ημερών και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση κατά Western.

Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western του GR και του ERα σε κυτταρικά εκχυλίσματα των N2A δείχνουν ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα των υποδοχέων παραμένουν σχετικά σταθερά, σε αντίθεση με αυτά του PPARα, τα οποία σημείωσαν αύξηση τόσο παρουσία ορμονών όσο και κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι πιθανόν ο PPARα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των N2A παρουσία και απουσία ορμονών (Lin C. et al,2018). Υπολείπεται ο χαρακτηρισμός της δραστικότητας, τόσο του PPARα όσο και των GR και ERα, των οποίων τα επίπεδα δεν μεταβλήθηκαν κατά τη διαφοροποίηση, ώστε να διερευνηθεί πλήρως η συμμετοχής τους στη διαφοροποίηση N2A κυττάρων.

Αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western των υπό εξέταση μεταγραφικών παραγότων, καθώς και του δείκτη διαφοροποίησης MyoD1 σε κυτταρικά εκχυλίσματα των C2C12 δείχνουν ότι ο GR αυξάνεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης κυρίως στο χρονικό διάστημα των 4 ημερών, αύξηση που αναιρείται στο χρονικό διάστημα των 6 ημερών. Η παρουσία E2 στις 4 και 6 ημέρες προκαλεί μείωση των επιπέδων του. Ο ERα ωστόσο, παραμένει σταθερός κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης διάρκεια 4 και 6 ημερών. Ωστόσο η παρουσία E2 και DEX φαίνεται να προκαλεί αύξηση του στο χρονικό διάστημα των 4 ημερών, δράση η οποία δεν παρατηρείται στις 6 ημέρες. Ο PPARα δείχνει να μειώνεται όσο περνάνε οι μέρες της διαφοροποίησης. Τέλος, η MyoD1 φαίνεται να ακολουθεί το αναμενόμενο μοτίβο καθώς αυξάνεται στις 4 ημέρες και στη συνέχεια επανέρχεται σε σταθερά επίπεδα. Παρουσιάζει μέγιστο στις 4 ημέρες παρουσία E2 και DEX. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι πιθανόν ο PPARα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση των C2C12 παρουσία και απουσία ορμονών. Υπολείπεται ο χαρακτηρισμός της δραστικότητας, τόσο του PPARα όσο και των GR και ERα, των οποίων τα επίπεδα δεν μεταβλήθηκαν κατά τη διαφοροποίηση, ώστε να διερευνηθεί πλήρως η συμμετοχής τους στη διαφοροποίηση C2C12 κυττάρων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

❖ Heitzer, M. D., Wolf, I. M., Sanchez, E. R., Witchel, S. F., & DeFranco, D. B. (2007). Glucocorticoid receptor physiology. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 8(4), 321–330. https://doi.org/10.1007/s11154-007-9059-8

❖ Boardman, C., Chachi, L., Gavrila, A., Keenan, C. R., Perry, M. M., Xia, Y. C., Meurs, H., & Sharma, P. (2014). Mechanisms of glucocorticoid action and insensitivity in airways disease. Pulmonary Pharmacology and Therapeutics, 29(2), 129–143. https://doi.org/10.1016/j.pupt.2014.08.008

❖ Psarra, A. M. G., Solakidi, S., & Sekeris, C. E. (2006). The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: Presence and action of steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells. Molecular and Cellular Endocrinology, 246(1–2), 21–33. https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.11.025

❖ Timmermans, S., Souffriau, J., & Libert, C. (2019). A general introduction to glucocorticoid biology. Frontiers in Immunology, 10(JULY). https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01545

❖ Smith, L. K., & Cidlowski, J. A. (2010). Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. In Progress in brain research (Vol. 182, Issue 10). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/s0079-6123(10)82001-1

❖ Choi, G. E., & Han, H. J. (2021). Glucocorticoid impairs mitochondrial quality control in neurons. Neurobiology of Disease, 152, 105301. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105301

❖ Psarra, A. M. G., & Sekeris, C. E. (2008). Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. IUBMB Life, 60(4), 210–223. https://doi.org/10.1002/iub.37

❖ Biason-Lauber, A., & Lang-Muritano, M. (2022). Estrogens: Two nuclear receptors, multiple possibilities. Molecular and Cellular Endocrinology, 554(June), 111710. https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111710

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

- Sinha, R. A., Rajak, S., Singh, B. K., & Yen, P. M. (2020). Hepatic lipid catabolism via PPARα-lysosomal crosstalk. International Journal of Molecular Sciences, 21(7). https://doi.org/10.3390/ijms21072391

- Han, L., Shen, W. J., Bittner, S., Kraemer, F. B., & Azhar, S. (2017). PPARs: Regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR-β/δ and PPAR-γ. Future Cardiology, 13(3), 279–296. https://doi.org/10.2217/fca-2017-0019

- Tahri-joutey, M., Andreoletti, P., Surapureddi, S., Nasser, B., Cherkaoui-malki, M., & Latruffe, N. (2021). Mechanisms Mediating the Regulation of Peroxisomal Fatty Acid Beta-Oxidation by PPAR α. https://doi.org/10.3390/ijms22168969

- Kokkinopoulou, I., & Moutsatsou, P. (2021). Mitochondrial glucocorticoid receptors and their actions. International Journal of Molecular Sciences, 22(11). https://doi.org/10.3390/ijms22116054

- Psarra, A. G., & Sekeris, C. E. (2011). Biochimica et Biophysica Acta Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells Role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. BBA - Molecular Cell Research, 1813(10), 1814–1821. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.05.014

- Chen, J. Q., Cammarata, P. R., Baines, C. P., & Yager, J. D. (2009). Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 1793(10), 1540–1570. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.06.001

- Ng, I. C., Pawijit, P., Tan, J., & Yu, H. (2019). Anatomy and physiology for biomaterials research and development. In Encyclopedia of Biomedical Engineering (Vols. 1–3). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.99876-3

- Tremblay, R. G., Sikorska, M., Sandhu, J. K., Lanthier, P., Ribecco-Lutkiewicz, M., & Bani-Yaghoub, M. (2010). Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. Journal of Neuroscience Methods, 186(1), 60–67. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.11.004

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

- Lazutkin, A., Podgorny, O., & Enikolopov, G. (2019). Modes of division and differentiation of neural stem cells. Behavioural Brain Research, 374(June), 112118. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112118

- N¨urnberg E, Horschitz S, Schloss P, Meyer-Lindenberg A, Basal glucocorticoid receptor activation induces proliferation and inhibits neuronal differentiation of human induced pluripotent stem cell-derived neuronal precursor cells, Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology (2010) https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.04.017

- Bramble, M.S., Vashist, N. & Vilain, E. Sex steroid hormone modulation of neural stem cells: a critical review. *Biol Sex Differ* **10**, 28 (2019). https://doi.org/10.1186/s13293-019-0242-x

- Lin C, Chen P-Yi, Chan H-Chin, Huang YPing, Chang NW, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha accelerates neuronal differentiation and this might involve the mitogen-activated protein kinase pathway, International Journal of Developmental Neuroscience (2018), https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.08.006

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ψαρρά Άννα Μαρία, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετέχω στην ερευνητική της ομάδα για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και για το ενδιαφέρον που επέδειξε καθόλη την διάρκεια της. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Γεωργαντόπουλο Αχιλλέα, για την αμέριστη βοήθεια και την υπομονή του κατά τη διάρκεια υλοποίησης αυτής της εργασίας, τις απεριόριστες γνώσεις που μου μετέδωσε αλλά και για τη συνεχή καθοδήγηση του. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου για τη στήριξή τους σε κάθε μου βήμα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
15/12/2025 10:13:50 EET - 18.97.9.169