



ΕΘΝΙΚΟ
ΜΕΤΣΟΒΙΟ
ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Α.Π. : 64963
Αθήνα, 9-12-25

ΚΟΣΜΗΤΟΡΑΣ

Προς
τα Μέλη ΔΕΠ της Σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών ΕΜΠ

Π Ρ Ο Σ Κ Λ Η Σ Η

Παρακαλείστε να παρευρεθείτε στην παρουσίαση της Διδακτορικής Διατριβής που εκπόνησε στον Τομέα Μηχανολογικών Κατασκευών & Αυτομάτου Ελέγχου της Σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών ΕΜΠ, ο Υποψήφιος Διδάκτορας **κ. ΚΑΝΕΛΗΣ Έξαρχος του Γεωργίου**, πτυχιούχου Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης και κατόχου Μεταπτυχιακού Διπλώματος στην επιστημονική περιοχή της Βιοτεχνολογίας από το Πολυτεχνείο της Δανίας.

Η παρουσίαση θα πραγματοποιηθεί την **Τετάρτη 17 Δεκεμβρίου 2025, ώρα 15:00 μ.μ.**, διαδικτυακά στον κάτωθι σύνδεσμο:

<https://www.google.com/url?q=https://zoom.us/j/93854933883?pwd%3Dlr7qDyaWfMe7xC1bhvhTmlKSaCiKGw.1%26jst%3D2&sa=D&source=calendar&ust=1765573429308191&usq=AOvVaw3QCxhmatVldkz53e2rZ9Ku>
ID: 93854933883, Passcode: 408714

Το θέμα της Διδακτορικής της Διατριβής είναι:

Ελληνικός τίτλος: «Ανάλυση μονοπατιών σηματοδότησης & ταυτοποίηση βιοδεικτών μηχανιστικού χαρακτήρα εφαρμοσμένα στον εκφυλισμό του μεσοσπονδύλιου δίσκου»

Αγγλικός τίτλος: «Secretome and pathway analysis in stress induced disc degeneration in vitro»

Ο Κοσμήτορας της Σχολής


Ι. Αντωνιάδης
Καθηγητής Ε.Μ.Π

PhD Dissertation Title: Secretome and pathway analysis in stress induced disc degeneration *in vitro*

Author: Exarchos Kanelis, **Supervisor:** Prof. Alexopoulos G. Leonidas

Extended Summary

The present Ph.D. thesis focuses on the analysis and investigation of the role of inflammation, oxidative stress, and innate immunity in driving disc degeneration. Low back pain is extremely common and a major cause of disability and economic burden worldwide, with one of its main underlying causes being degeneration of the intervertebral discs. These discs sit between the vertebrae and are made of a soft, gel-like nucleus pulposus (NP) in the centre, surrounded by the annulus fibrosus, and capped by cartilaginous endplates. When discs degenerate, they lose height, hydration, and structural integrity, which is linked to chronic back pain and reduced quality of life. Although IDD has been studied extensively, its biology is complex, involving mechanical loading, biochemical changes, inflammation, and oxidative damage, with many of the molecular mechanisms remain to be fully clarified. NP cells, which usually exist in a protected, low-immune environment, can begin to produce inflammatory cytokines and chemokines themselves, reinforcing local damage. Among the key mediators, IL-1 β is especially important because it promotes expression of matrix-degrading enzymes while suppressing extracellular matrix synthesis, even at low, physiologically relevant concentrations measured in degenerate discs. Innate immune receptors such as TLR2 (often together with TLR6) respond to microbial molecules and tissue damage signals, including bacterial components from *Cutibacterium acnes* and matrix breakdown products like soluble biglycan, triggering NF- κ B and JNK signalling, cytokine release, and further matrix degradation. Oxidative stress adds another layer, with reactive oxygen species such as hydrogen peroxide present in NP tissue and commonly used *in vitro* to model stress-related damage. The current study uses IL-1 β to represent inflammatory cytokine signalling, a synthetic TLR2/6 agonist (Pam2CSK4) to mimic innate immune activation by microbial or damage signals, and hydrogen peroxide to model oxidative stress. Rather than looking few markers, the aim was to profile both secreted inflammatory and matrix-related proteins as well as intracellular signalling molecules in an integrated way using Luminex multiplexed assays. It also addresses an important gap by comparing NP cell responses in standard monolayer culture with those in a more physiological 3D alginate, low-glucose, low-oxygen environment, where NP cells regain a more native-like phenotype. The central hypothesis is that these three stimuli generate distinct but overlapping molecular signatures, and that examining extracellular and intracellular responses together will uncover key pathways and mediators that shape the inflammatory, catabolic environment characteristic of disc degeneration.

Primary human nucleus pulposus cells from surgical disc samples were isolated and then expanded in standard 2D monolayer culture and then also re-differentiated in 3D alginate beads under low-glucose, low-oxygen conditions to better mimic the *in vivo* niche. Cells were stimulated with physiologically relevant and higher doses of IL-1 β , a TLR2/6 agonist (Pam2CSK4), or a sub-toxic concentration of H₂O₂, and their responses were measured. Outcomes included gene expression by qPCR, a 73-plex Luminex secretome assay and a 21-plex phosphoprotein Luminex assay, with viability assays used to define the H₂O₂ dose. Rigorous non-parametric statistics applied to identify stimulus-specific and overlapping changes across donors and culture formats.

Viability assays showed that NP cells tolerated H₂O₂ up to around fifty μ M with no significant loss of viability, with a gradual decline above 62.5 μ M and a sharp drop at 0.5–1 mM, so fifty μ M was chosen as a sub-toxic dose. In monolayer, both doses of IL-1 β (100 pg/mL, 1 ng/mL) and Pam2CSK4 strongly upregulated IL-1 β , IL-6, IL-8, and MMP-3 mRNA, whereas p16^{INK4a}, p21^{WAF1}, and all genes under H₂O₂ remained unchanged. Secretome profiling in 2D revealed a broad baseline remodelled by IL-1 β and Pam2CSK4: more than 50 proteins were significantly altered, with many pro-inflammatory cytokines, chemokines, and matrix regulators increased, and a smaller subset decreased. H₂O₂ in contrast significantly elevated only VEGF and MMP-7. In 3D alginate under

low glucose and physioxia, fewer markers changed overall, but IL-1 β (100 pg/mL) and Pam2CSK4 consistently increased IL-6, IL-8, GRO- α , ICAM-1, and MMP-7, with stimulus-specific effects on MMP-1, TGF- β 1, IP-10, and b-FGF. Phosphoproteomic analysis in monolayer showed that both IL-1 β and Pam2CSK4 converged on a shared signaling pattern, significantly increasing phosphorylation of I κ B α , NF- κ B, and c-JUN, whereas fifty μ M H₂O₂ selectively reduced p-FAK without activating this established inflammatory signature.

These findings indicate that IL-1 β and TLR2/6 activation drive a potent, overlapping inflammatory and catabolic program in NP cells, while sub-toxic oxidative stress exerts a more modest and qualitatively distinct influence. The robust induction of IL-6, IL-8, GRO- α , ICAM-1, and MMP-7 across both 2D and 3D systems, together with activation of NF- κ B and AP-1 signaling, suggests that these mediators form a core response module to immune-type stimuli in NP cells, relatively independent of culture format. Their known roles in disc degeneration, pain, matrix breakdown, and leukocyte recruitment support their relevance as mechanistic effectors and candidate biomarkers. The much broader secretory response in monolayer compared with alginate underscores how high-glucose, high-oxygen, serum-containing conditions exaggerate NP inflammatory output, whereas 3D physioxia constrains responses but preserves key pathways. This has practical implications: 2D models are sensitive for detecting changes, but 3D systems may better reflect in vivo magnitude and context. The minimal impact of fifty μ M H₂O₂ on inflammatory signaling, despite clear viability loss at higher doses, suggests that oxidative stress in NP cells may contribute to degeneration more through cell damage, altered adhesion, and pro-angiogenic remodelling than through a classical cytokine storm. Overall, the integrated secretome-phosphoproteome approach yields a focused, translatable five-marker panel plus NF- κ B/AP-1 phospho-readouts that could be used to benchmark therapies targeting IL-1R, TLR2/6, or downstream kinases in future disc degeneration studies, while also highlighting the importance of donor variability and microenvironment when interpreting NP cell behaviour.

Τίτλος Διδακτορικής διατριβής: Ανάλυση μονοπατιών σηματοδότησης & ταυτοποίηση βιοδεικτών μηχανιστικού χαρακτήρα εφαρμοσμένα στον εκφυλισμό του μεσοσπονδύλιου δίσκου.

Συγγραφέας: Κανέλης Έξαρχος, Επιβλέπων: Καθ. Αλεξόπουλος Δεωνίδας

Εκτενής Περίληψη

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εστιάζει στην ανάλυση και εξερεύνηση του ρόλου της φλεγμονής, του οξειδωτικού στρες και της ενεργοποίησης στοιχείων του ανοσοποιητικού συστήματος στην προώθηση της εκφύλισης μεσοσπονδύλιων δίσκων. Η πόνος στη πλάτη είναι εξαιρετικά συχνό φαινόμενο και αποτελεί μείζον αίτιο αναπηρίας και οικονομικής επιβάρυνσης παγκοσμίως, με μία από τις κύριες υποκείμενες αιτίες να είναι η εκφύλιση των μεσοσπονδύλιων δίσκων. Οι δίσκοι αυτοί βρίσκονται μεταξύ των σπονδύλων και στο κέντρο αποτελούνται από έναν μαλακό, ζελατινώδη πυρήνα (nucleus pulposus, NP), ο οποίος περιβάλλεται από το ιστό annulus fibrosus. Όταν οι δίσκοι υφίστανται εκφύλιση, χάνουν ύψος, ενυδάτωση και δομική σταθερότητα, γεγονός που συνδέεται στενά με χρόνιο πόνο στη μέση και μειωμένη ποιότητα ζωής. Αν και η εκφύλιση του μεσοσπονδύλιου δίσκου (IDD) έχει μελετηθεί εκτενώς, η βιολογία της παραμένει ακόμα περίπλοκη, καθώς εμπλέκει μηχανικά φορτία, βιοχημικές αλλαγές, φλεγμονή και οξειδωτική βλάβη με αποτέλεσμα πολλά από τα μοριακά της αίτια να μην έχουν ακόμη πλήρως διευκρινιστεί. Τα κύτταρα NP, τα οποία συνήθως βρίσκονται σε ένα προστατευμένο, άνοσο-προνομιούχο περιβάλλον, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν τα ίδια φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοκίνες, ενισχύοντας τη τοπική βλάβη. Ανάμεσα στους βασικούς μεσολαβητές που ευθύνονται για τον εκφυλισμό, η κυτοκίνη IL-1β είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς προάγει την έκφραση ενζύμων που αποδομούν τη θεμέλια ουσία (matrix-degrading enzymes), ενώ καταστέλλει τη σύνθεση εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας όπως το κολλαγόνο. Η κυτοκίνη IL-1β έχει ποσοτικοποιηθεί ακόμη και σε χαμηλές, φυσιολογικά σχετικές συγκεντρώσεις μέσα σε εκφυλισμένους δίσκους. Κυτταρικοί υποδοχείς όπως ο TLR2 (συχνά σε σύμπραξη με τον TLR6) ανταποκρίνονται σε μικροβιακά μόρια και σήματα ιστικής βλάβης, συμπεριλαμβανομένων βακτηριακών συστατικών από *Cutibacterium acnes* και προϊόντων αποδόμησης της θεμέλιας ουσίας, όπως το biglycan. Τα ερεθίσματα αυτά ενεργοποιούν τις κυτταρικές οδούς NF-κΒ και JNK, οδηγώντας σε έκκριση κυτταροκινών και περαιτέρω αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας. Το οξειδωτικό στρες προσθέτει ένα επιπλέον επίπεδο πολυπλοκότητας, με δραστικές μορφές οξυγόνου όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου να ανιχνεύονται στον ιστό NP και να χρησιμοποιούνται ευρέως in vitro για τη μοντελοποίηση στρεσογόνου βλάβης (oxidative stress). Η παρούσα μελέτη χρησιμοποιεί την IL-1β για να αναπαραστήσει τη σηματοδότηση φλεγμονωδών κυτταροκινών, έναν συνθετικό αγωνιστή TLR2/6 (Pam2CSK4) για να μιμηθεί την ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσίας από μικροβιακά ή επιβλαβή σήματα, και υπεροξειδίο του υδρογόνου για να προσομοιώσει το οξειδωτικό στρες. Αντί να εξετάζει μόνο λίγους δείκτες, στοχεύει στην ολοκληρωμένη χαρτογράφηση τόσο εκκρινόμενων φλεγμονωδών και matrix-related πρωτεϊνών, όσο και ενδοκυττάριας μορίων σηματοδότησης, χρησιμοποιώντας πολυπλεκτικές Luminesx αναλύσεις. Παράλληλα, καλύπτει ένα σημαντικό κενό συγκρίνοντας τις αποκρίσεις των κυττάρων NP σε καλλιέργεια-μονοστρώδα (monolayer) με εκείνες σε ένα περισσότερο φυσιολογικό 3D περιβάλλον (αλγινικά σφαιρίδια), χαμηλής γλυκόζης και χαμηλού οξυγόνου, όπου τα κύτταρα NP ανακτούν ένα πιο φυσικό in vivo-όμοιο φαινότυπο. Η κεντρική υπόθεση είναι ότι αυτά τα τρία ερεθίσματα δημιουργούν διακριτές αλλά εν μέρει επικαλυπτόμενες μοριακές ανταποκρίσεις και ότι η ταυτόχρονη εξέταση εξωκυττάριας και ενδοκυττάριας αποκρίσεων θα αναδείξει κοινές οδούς και βασικά μόρια που διαμορφώνουν το φλεγμονώδες και ταυτόχρονα καταβολικό περιβάλλον που χαρακτηρίζει την εκφύλιση του δίσκου.

Τα κύτταρα NP άντεχαν το H₂O₂ έως περίπου 50 μM χωρίς σημαντική απώλεια βιωσιμότητας, με σταδιακή μείωση πάνω από τα 62,5 μM και απότομη πτώση στις συγκεντρώσεις 0,5–1 mM. Έτσι,

τα 50 μM επιλέχθηκαν ως υπο-τοξική δόση. Στη μονοστιβάδα, και οι δύο δόσεις IL-1 β (100 pg/mL, 1 ng/mL) καθώς και ο Pam2CSK4 αύξησαν έντονα την έκφραση των mRNA των IL-1 β , IL-6, IL-8 και MMP-3, ενώ τα p16^{INK4a}, p21^{WAF1} και όλα τα εξεταζόμενα γονίδια υπό H₂O₂ παρέμειναν αμετάβλητα. Η ανάλυση σε 2D αποκάλυψε ένα ευρύ φλεγμονώδες προφίλ, το οποίο διέφερε μεταξύ δοτών και επηρεάστηκε σημαντικά από την κυτοκίνη IL-1 β και τον Pam2CSK4. Πάνω από 50 πρωτεΐνες μεταβλήθηκαν σημαντικά, με πολλές προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, χημειοκίνες και ρυθμιστές της εξωκυττάριας μήτρας να αυξάνονται, και ένα μικρότερο υποσύνολο να μειώνεται. Αντιθέτως, το H₂O₂ αύξησε σημαντικά μόνο τα VEGF και MMP-7. Στη 3D καλλιέργεια, υπό χαμηλή γλυκόζη και οξυγόνο, λιγότεροι δείκτες μεταβλήθηκαν συνολικά, αλλά η IL-1 β (100 pg/mL) και ο Pam2CSK4 αύξησαν σταθερά τις πρωτεΐνες IL-6, IL-8, GRO- α , ICAM-1 και MMP-7, με ειδικές ανά ερέθισμα επιδράσεις στις πρωτεΐνες MMP-1, TGF- β 1, IP-10 και b-FGF. Η φωσφοπρωτεωμική ανάλυση σε 2D έδειξε ότι τόσο η IL-1 β όσο και ο Pam2CSK4 συγκλίνουν σε ένα κοινό πρότυπο σηματοδότησης, αυξάνοντας σημαντικά τη φωσφορυλίωση των I κ B α , NF- κ B και c-JUN, ενώ τα 50 μM H₂O₂ μείωσαν επιλεκτικά τη φωσφορυλίωση της FAK χωρίς να ενεργοποιήσουν αυτήν την προαναφερόμενη φλεγμονώδη υπογραφή.

Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η IL-1 β και η ενεργοποίηση του υποδοχέα TLR2/6 προάγουν ένα ισχυρό, σε μεγάλο βαθμό επικαλυπτόμενο φλεγμονώδες και καταβολικό πρόγραμμα στα κύτταρα NP, ενώ το υπό-τοξικό οξειδωτικό στρες ασκεί πιο ήπια διαφορετική επίδραση. Η επαγωγή των IL-6, IL-8, GRO- α , ICAM-1 και MMP-7 τόσο στα 2D όσο και στα 3D συστήματα, σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση της σηματοδότησης NF- κ B και AP-1, υποδηλώνει ότι αυτοί οι μεσολαβητές συγκροτούν ένα βασικό «μοτίβο απόκρισης» στα κύτταρα NP, σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητο από τη μορφή καλλιέργειας. Ο γνωστός ρόλος τους στην εκφύλιση του δίσκου, τον πόνο, την αποδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας και την προσέλκυση λευκοκυττάρων υποστηρίζει τη σημασία τους ως μηχανιστικούς παράγοντες-κλειδιά και δυνητικούς βιοδείκτες. Η πολύ ευρύτερη εκκριτική απόκριση σε 2D σε σύγκριση με 3D υπογραμμίζει ότι οι συνθήκες υψηλής γλυκόζης, υψηλού οξυγόνου και ορού ενισχύουν υπερβολικά τη φλεγμονώδη απόδοση των κυττάρων NP, ενώ σε 3D περιορίζεται το εύρος της απόκρισης. Αυτό έχει πρακτικές συνέπειες: τα 2D μοντέλα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα για την ανίχνευση αλλαγών, αλλά τα 3D συστήματα πιθανόν να αντανακλούν καλύτερα το in vivo μέγεθος και πλαίσιο των αποκρίσεων. Η περιορισμένη επίδραση των 50 μM H₂O₂ στη φλεγμονώδη σηματοδότηση, παρά τη σαφή απώλεια βιωσιμότητας σε υψηλότερες δόσεις, υποδηλώνει ότι το οξειδωτικό στρες στα κύτταρα NP μπορεί να συμβάλλει στην εκφύλιση περισσότερο μέσω κυτταρικής βλάβης, διαταραγμένης κυτταρικής προσκόλλησης και προ-αγγειογεννητικής αναδιαμόρφωσης, παρά μέσω μιας κλασικής απελευθέρωσης κυτταροκινών». Η ολοκληρωμένη προσέγγιση μέσω της ανάλυσης εκκρινόμενων & φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών οδηγεί σε ένα πάνελ πέντε δεικτών, σε συνδυασμό με τις φωσφορυλίώσεις NF- κ B/AP-1, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη σύγκριση θεραπειών που στοχεύουν τον IL-1R, τον TLR2/6 ή γενικά σε μελλοντικές μελέτες εκφύλισης μεσοσπονδύλιου δίσκου, αναδεικνύοντας παράλληλα τη σημασία της μεταβλητότητας μεταξύ δοτών και του μικροπεριβάλλοντος στην ερμηνεία της συμπεριφοράς των κυττάρων NP.