



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗ
ΣΧΟΛΗ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη δικτύων πρωτεόστασης που εμπλέκονται στην
καρκινογένεση»**

ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΓΙΑΝΝΙΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΑΜ 41614

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ιωάννης Π. Τρουγκάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιωάννης Π. Τρουγκάκος (Επιβλέπων Καθηγητής)

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας Ζωικού Κυττάρου και Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας

Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ

Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη

Καθηγήτρια Κυτταρικής και Αναπτυξιακής Βιολογίας

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας

Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ

Ουρανία Η. Τσιτσιλώνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανοσολογίας

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας

Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ

ΕΚΠΟΝΗΣΗ

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Βιολογίας

Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής

Ομάδα «Μοριακής – Κυτταρικής Γήρανσης και Καρκινογένεσης»

Περιεχόμενα	
Πρόλογος	6
Περίληψη	7
Abstract	8
1. Εισαγωγή	9
1.1 Δίκτυο διατήρησης της πρωτεωμικής σταθερότητας	10
1.1.1 Μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος	10
1.1.1.1 Ουβικιτίνη	11
1.1.1.2 Πρωτεάσωμα	13
1.1.2 Μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος	15
1.1.3 Το μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2/KEAP1	18
1.1.4 Μοριακοί συνοδοί (Heat shock proteins-Hsps)	20
1.2 Ρύθμιση της πρωτεϊνoσύνθεσης	22
1.2.1 Ριβόσωμα	23
1.3 Επιδιόρθωση βλαβών γενετικού υλικού	24
1.4 Καρκίνος	25
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	27
2. Υλικά και Μέθοδοι	28
2.1 Υλικά	29
2.1.1 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας	29
2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια	29
2.1.3 Αντισώματα	31
2.1.4 PCR εκκινητές	31
2.1.5 Όργανα	33
2.2 Μέθοδοι	33
2.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες	33
2.2.1.1 Κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν και χαρακτηριστικά τους	33
2.2.1.2 Απόψυξη και ψύξη των κυτταρικών σειρών	35
2.2.1.3 Διατήρηση και ανακαλλιέργεια προσκολλώμενων κυττάρων	36
2.2.1.4 Επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία καλλιέργειας	36
2.2.2 Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη δοκιμασία MTT	37
2.2.3 Μέθοδος Bradford	38
2.2.4 Καταγραφή των ενζυμικών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων	38

2.2.5 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των καθεψινών B και L του λυσοσώματος	39
2.2.6 Μέτρηση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου	39
2.2.7 Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης	40
2.2.7.1 Απομόνωση ολικού RNA	40
2.2.7.2 Σύνθεση cDNA	40
2.2.7.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)	41
2.2.8 SDS-PAGE-Ανοσοαποτύπωμα Western	41
2.2.8.1 Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης κυττάρων	41
2.2.8.2 Προετοιμασία των δειγμάτων και αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS	42
2.2.8.3 Μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα ακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	42
2.2.8.4 Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών	43
2.2.8.5 Αποδέσμευση των αντισωμάτων από τη μεμβράνη	43
2.2.8.6 Απομόνωση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων	44
2.2.8.7 Ανίχνευση οξειδωμένων πρωτεϊνών	44
2.2.8.8 Ποσοτικοποίηση των ζωνών εντόπισης των πρωτεϊνών	44
2.2.9 Ανοσοφθορισμός	45
2.2.10 Ανίχνευση βλαβών στο DNA	45
2.2.10.1 Comet assay (single cell gel electrophoresis, SCGE)	45
2.2.10.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της 8-υδροξυ-2'δεογυγουανωσίνης (8-OHdG)	46
3. Αποτελέσματα	47
3.1 Μελέτη των πρωτεοστατικών μηχανισμών κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης	48
3.1.1 Επαγωγή του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος στο κυτταρικό μοντέλο χημικής καρκινογένεσης επιδερμίδας ποντικού	48
3.1.2 Επαγωγή του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσοσώματος στο κυτταρικό μοντέλο χημικής καρκινογένεσης επιδερμίδας ποντικού	50
3.1.3 Ενεργοποίηση του μονοπατιού αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2/KEAP1 στο κυτταρικό μοντέλο χημικής καρκινογένεσης επιδερμίδας ποντικού	52
3.1.4 Μειορρύθμιση των μοριακών συνοδών στο κυτταρικό μοντέλο χημικής καρκινογένεσης επιδερμίδας ποντικού	53

3.1.5 Αύξηση των συσσωματωμένων πρωτεϊνών (δείκτης εκτεταμένης πρωτεομικής αστάθειας) κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης.....	54
3.1.6 Αύξηση της γενωμικής αστάθειας κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης..	55
3.2 Συσχέτιση της ριβοσωμικής δυσλειτουργίας με τους μηχανισμούς κυτταρικής πρωτεόστασης.....	57
3.2.1 Επαγωγή του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος ύστερα από καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα P53.....	58
3.2.2 Επαγωγή του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσοσώματος σε κύτταρα με ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση	59
3.2.3 Συσσώρευση οξειδωτικού στρες σε κύτταρα με ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση.....	61
3.2.4 Επαγωγή της έκφρασης των μοριακών συνοδών ύστερα από καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα P53	62
3.2.5 Διαφορική ανθεκτικότητα των κυτταρικών σειρών με ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση σε παράγοντες διατάραξης της πρωτεόστασης	63
3.2.6 Αύξηση του συσσωματωμένου πρωτεϊνικού φορτίου στις σειρές με ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση	64
4. Συζήτηση–Συμπεράσματα	67
5. Βιβλιογραφία	72

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία με θέμα: «**Μελέτη δικτύων πρωτεόστασης που εμπλέκονται στην καρκινογένεση**»», πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «*Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική*». Η εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκου, στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, στο Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2017-2018.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Τρουγκάκο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την ευκαιρία που μου έδωσε, όπως επίσης και για τον πρόθυμο χαρακτήρα του να με βοηθήσει σε ό,τι ήταν απαραίτητο, για την επιστημονική του καθοδήγηση και τη διαρκή στήριξή του καθόλη τη διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την Καθηγήτρια κα Παπασιδέρη και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Τσιτσιλώνη για την τιμή που μου έκαναν να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς επιτροπής, καθώς και για την υποστήριξη και τις συμβουλές τους καθόλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια Διδάκτορα Αιμιλία Σκληρού, η οποία ανέλαβε να με καθοδηγήσει κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Την ευχαριστώ για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε, την τεράστια υπομονή της στο να με ηρεμεί όταν χρειαζόταν αλλά και την ψυχραιμία της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα Χριστίνα Χειμωνίδα, η οποία ήταν εκείνη που με ανέλαβε όταν ξεκίνησα τα πειράματα στο εργαστήριο του κ. Τρουγκάκου κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών σπουδών μου και ήταν υπεύθυνη για την εκπαίδευσή μου. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου: την Ελένη Τσακίρη (Μεταδιδακτορικός συνεργάτης), τη Sentiljana Gumeni (Μεταδιδακτορικός συνεργάτης), την Ελένη-Δήμητρα Παπανάγνου (υποψήφια Διδάκτωρ), τη Ζωή Ευαγγελάκου (υποψήφια Διδάκτωρ) και τη Μαρία Μανωλά (υποψήφια Διδάκτωρ) για τη στήριξη, τις συμβουλές τους και την άψογη συνεργασία μας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής για το ευχάριστο κλίμα καθώς και τον Καθηγητή Siniša Volarević (*Department of Molecular Medicine and Biotechnology, School of Medicine, University of Rijeka, Croatia*) και τον Δρ. Βασίλη Ζουμπουρλή (*Εθνικό Ιδρυμα Ερευνών, Ελλάδα*) για τη διάθεση των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία.

Κλείνοντας, ευχαριστώ ολόψυχα την οικογένειά μου για την αγάπη, τη στήριξη και τη συμπαράστασή της.

Περίληψη

Οι οργανισμοί εκτίθενται διαρκώς σε πληθώρα στρεσογόνων παραγόντων, οι οποίοι μεταβάλλουν και διαταράσσουν την ομαλή λειτουργία τους. Προκειμένου να διατηρηθεί η λειτουργικότητα των βιομορίων, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει (μεταξύ άλλων) το δίκτυο πρωτεόστασης, το οποίο διασφαλίζει τον έλεγχο της λειτουργικότητας του πρωτεώματος (σύνολο πρωτεϊνών που εκφράζονται από έναν οργανισμό). Μεταξύ των βασικών ρυθμιστών του δικτύου πρωτεόστασης είναι οι μηχανισμοί αυτοσυγκρότησης των ριβοσωμάτων και ρύθμισης της πρωτεϊνοσύνθεσης, οι μοριακοί συνοδοί, οι δύο κύριες μηχανές αποικοδόμησης, το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος, καθώς και το σηματοδοτικό μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2 (Nuclear factor -erythroid derived 2-like 2, NFE2L2)/KEAP1(Kelch-like ECH-associated protein 1). Εντούτοις, έχει δειχθεί πως κατά τη μέση ηλικία οι πρωτεϊνικές μηχανές και τα συστήματα ελέγχου του κυττάρου αρχίζουν να συσσωρεύουν βλάβες και τελικά η απορρύθμισή τους οδηγεί στο γήρας και σε ηλικιο-εξαρτώμενες παθήσεις, όπως ο καρκίνος.

Δεδομένου ότι μελέτες της ομάδας μας δεικνύουν ότι πιθανότατα η πρωτεωμική αστάθεια αποτελεί σημαντικό ορόσημο της καρκινικής εξαλλαγής, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο λειτουργικός ρόλος βασικών ρυθμιστών του δικτύου πρωτεόστασης κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης, καθώς και η συσχέτιση της ελαττωματικής πρωτεϊνοσύνθεσης με τους μηχανισμούς πρωτεόστασης. Ειδικότερα, παρατηρήσαμε διαφορετική έκφραση των πρωτεοστατικών μορίων τόσο στο κυτταρικό μοντέλο σταδιακής χημικής καρκινογένεσης όσο και στο κυτταρικό μοντέλο ελαττωματικής πρωτεϊνοσύνθεσης, γεγονός που καταδεικνύει τη σημασία του δικτύου πρωτεόστασης στη βιολογία και την εξέλιξη του καρκίνου.

Abstract

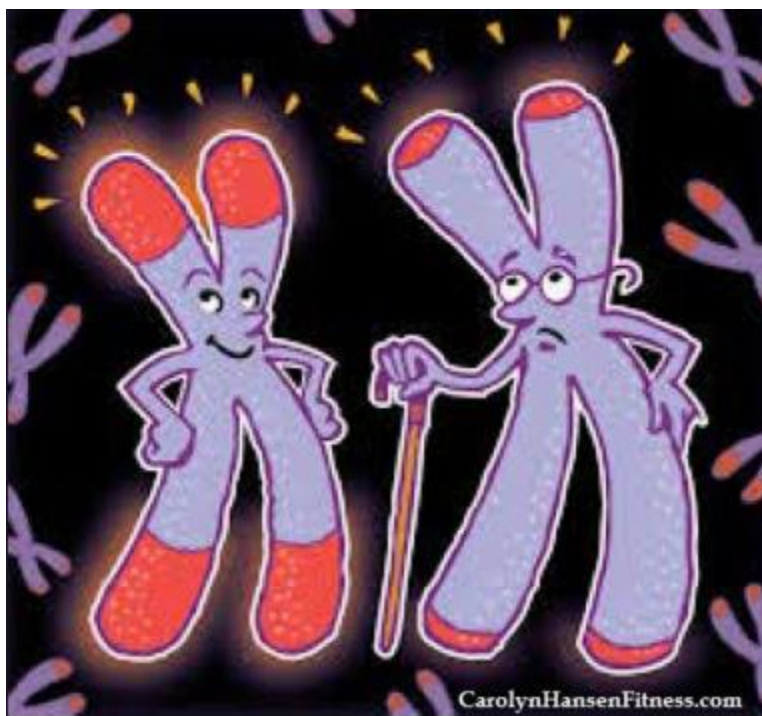
Organisms are continuously exposed to a plethora of stress-inducing factors that alter and disturb their normal function. For the maintenance of cellular homeodynamics, cells have developed (among others) the proteostasis network, which curates proteome (the complete set of proteins expressed by an organism) and ensures its functionality. Key components of the PN are the protein synthesis and trafficking modules, molecular chaperones, and the two main degradation machineries, namely the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways. Part of the PN are also considered the stress responses pathways including the oxidative stress-related pathway of antioxidant responses that is regulated by NRF2 (Nuclear factor -erythroid derived 2-like 2, NFE2L2)/ KEAP1(Kelch-like ECH-associated protein 1).

Nevertheless, recent studies by us and others indicate that during ageing both the protein machines and the cellular stress responses pathways become dysfunctional as they are deregulated by accumulating damage; these catastrophic events correlate with organismal ageing, cellular senescence and most (if not all) age-related diseases, including cancer. Given that proteostasis imbalance likely represents a hallmark of carcinogenesis, the aim of this study was to identify potential alterations in proteostatic modules expression and function during carcinogenesis. Furthermore, we studied the functionality of the proteostasis network components in cells which exhibit partially deficient protein synthesis, as a result of a mutated allele of a ribosomal protein encoding gene, in order to address how faulty protein synthesis affects proteome stability.

Herein, we report differential expression of proteostatic modules in cellular models of stepwise chemical skin-carcinogenesis and of faulty protein synthesis.

These findings demonstrate the significance of the proteostasis network deregulation in cancer biology and progression.

I. Εισαγωγή



1.1 Δίκτυο διατήρησης της πρωτεωμικής σταθερότητας

Οι πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από τεράστια ποικιλομορφία, απαντώνται στον ενδοκυττάριο ή εξωκυττάριο χώρο, διαθέτουν ενζυμικές ή δομικές ιδιότητες και μπορεί να κατέχουν βασικό ρόλο στην επιβίωση κάθε κυττάρου ή να αποτελούν ιδιαίτερο χαρακτηριστικό συγκεκριμένου τύπου κυττάρου, βοηθώντας έτσι στην απόκριση σε συγκεκριμένα σήματα (Trougakos et al., 2013). Η διατάραξη της ομοιοστασίας του συνόλου των πρωτεϊνών ενός οργανισμού (πρωτέωμα) οδηγεί σε πρωτεωμική αστάθεια. Η πρωτεωμική αστάθεια αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της καρκινογένεσης και όπως γίνεται κατανοητό η σωστή ρύθμιση και ο έλεγχος της λειτουργίας των πρωτεϊνών είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και τη μακροβιότητα του οργανισμού (Riera et al., 2016).

Υπεύθυνο για την ακεραιότητα της λειτουργίας και της δομής των πρωτεϊνών είναι το δίκτυο πρωτεόστασης. Το δίκτυο πρωτεόστασης αποτελείται από ένα σύνολο μορίων και διευθύνει αυστηρά τη σύνθεση, την αναδίπλωση, τη μετακίνηση και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και ο πυρήνας, πετυχαίνοντας έτσι τη διατήρηση της πρωτεόστασης στο κύτταρο (Wolff et al., 2014). Η επιτυχής επιδιόρθωση ή αποικοδόμηση λανθασμένα διπλωμένων ή μη λειτουργικών (μη-ενζυμικά τροποποιημένων) πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία τείνουν να δημιουργούν συσσωματώματα, αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του κυττάρου έναντι του πρωτεοτοξικού στρες αποτρέποντας την συσσώρευση τοξικών ολιγομερών και εξασφαλίζοντας τη συνεχή ανανέωση των ενδοκυττάρων συστατικών (López-Otín et al., 2013). Το δίκτυο πρωτεόστασης είναι ειδικά σχεδιασμένο τόσο ως προς τη στελέχωση όσο και ως προς την ενεργότητά του, ώστε να προσαρμόζεται στις εκάστοτε πρωτεϊνικές ανάγκες του κυττάρου και να επαναφέρει την ισορροπία ύστερα από καταστάσεις κυρίως οξειδωτικού και θερμικού στρες (Trougakos et al., 2013; Kaushik and Cuervo, 2015). Τα κυτταρικά βιομόρια που υφίστανται οξειδωτικές τροποποιήσεις αποικοδομούνται και αποβάλλονται μέσω αυτού του δικτύου, του οποίου κύριοι συντελεστές είναι τα πρωτεολυτικά μονοπάτια ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσοσώματος (Kiffin et al., 2004; Chondrogianni and Gonos, 2005; Hara et al., 2006; Knecht et al., 2009; Kirkin et al., 2009; Tonoki et al., 2009). Ακόμα, μέρος του δικτύου πρωτεόστασης αποτελεί το σηματοδοτικό μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2 (Nuclear factor -erythroid derived 2-like 2, NFE2L2)/ KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), οι μοριακοί συνοδοί καθώς και οι μηχανισμοί αυτοσυγκρότησης των ριβοσωμάτων και ρύθμισης της πρωτεϊνοσύνθεσης.

1.1.1 Μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος

Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Ubiquitin-Proteasome Pathway-UPP) είναι ένα ιδιαίτερα περίπλοκο σύστημα που αποικοδομεί το 80-90% των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών που έχουν διπλωθεί λανθασμένα ή εκείνων που έχουν μικρή διάρκεια ζωής. Το υπόλοιπο 10-20% των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών, που αποτελείται από πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις μεμβράνες και εξωκυττάρια

πρωτεΐνες που παγιδεύονται με την διαδικασία της ενδοκύττωσης, αποικοδομείται από το λυσόσωμα (Ciechanover, 2013). Το UPP αποτελείται από έξι βασικά συστατικά: την ουβικιτίνη (Ub), το ένζυμο που ενεργοποιεί την ουβικιτίνη (E1), μια ομάδα ενζύμων που προσδένουν την ουβικιτίνη (E2), μια μεγαλύτερη ομάδα από λιγάνες της ουβικιτίνης (E3), το πρωτεάσωμα και τις απο-ουβικιτινάσες (Deubiquitinases - DUBs).

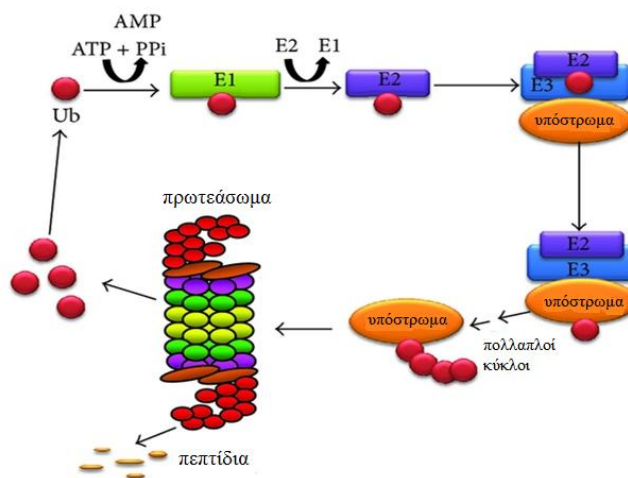
Η αποικοδόμηση πρωτεϊνών από το UPS είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία που εμπλέκει δύο διακριτά βήματα, την ουβικιτινίωση και την πρωτεασωμακή αποικοδόμηση.

1.1.1.1 Ουβικιτίνη

Η ουβικιτίνη (Ub) είναι μια μικρή ρυθμιστική πρωτεΐνη 76 αμινοξικών καταλοίπων και 8,5 kDa που είναι εξαιρετικά συντηρημένη και ευρέως κατανοημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, ενώ απουσιάζει πλήρως από τους προκαρυωτικούς. Παρά την απουσία της όμως, υπάρχουν βακτηριακές πρωτεΐνες που φαίνεται να έχουν δομική και λειτουργική ομολογία με την ουβικιτίνη και τα συστατικά του συστήματός της (Iyer et al., 2006). Υπάρχουν τέσσερα γονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα που κωδικοποιούν την ουβικιτίνη, τα *UBB*, *UBC*, *UBA52* και *RPS27A* (Kimura and Tanaka, 2010). Η ουβικιτίνη δύναται να σχηματίσει διαφορετικές αλυσίδες, οι οποίες συνδέονται μέσω των επτά καταλοίπων λυσίνης της, Lys ή K 6, 11, 27, 29, 33, 48 και 63 και μέσω της αμινοτελικής μεθειονίνης της ουβικιτίνης που μπορεί να συντηχθεί με το καρβοξυτελικό μοτίβο δικυκλίνης ενός άλλου μορίου ουβικιτίνης.

Η ουβικιτίνη μπορεί να προσδεθεί σε μια πρωτεΐνη είτε ως μονομερές, είτε ως μια αλυσίδα πολουβικιτίνης μέσω μιας διαδικασίας που καλείται ουβικιτινίωση. Η ουβικιτινίωση αποτελεί μια ενζυμική, μετα-μεταφραστική και ομοιοπολική τροποποίηση που υφίστανται οι πρωτεΐνες ενός κυττάρου. Ο προορισμός και η τύχη της πρωτεΐνης που θα υποστεί την τροποποίηση αυτή, διαφέρει ανάλογα με τον τύπο της αλυσίδας στην οποία προστίθεται. Για παράδειγμα, η ουβικιτινίωση σε κατάλοιπα λυσίνης 11 σχετίζεται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, σε κατάλοιπα λυσίνης 48 με την αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα και σε κατάλοιπα λυσίνης 63 με την αποικοδόμηση μέσω αυτοφαγίας, την επιδιόρθωση του γενετικού υλικού, την αντιγραφή και τη μεταγωγή σήματος (Shen et al., 2013). Η διαδικασία της ουβικιτινίωσης εξελίσσεται μέσω των διαδικασιών που ακολουθούν. Αρχικά, η ουβικιτίνη ενεργοποιείται από το σχηματισμό ενός δεσμού θειοεστέρα ανάμεσα στο καρβοξυτελικό άκρο της και του καταλοίπου κυστεΐνης του ενζύμου που ενεργοποιεί την ουβικιτίνη-E1, μια διαδικασία που εξαρτάται από την παρουσία ATP. Στην συνέχεια, η ουβικιτίνη μεταφέρεται σε ένα ένζυμο σύζευξης της ουβικιτίνης-E2 μέσω ενός επιπρόσθετου ενδιάμεσου θειοεστέρα. Τέλος, η ουβικιτίνη μεταφέρεται από το ένζυμο E2, στην πρωτεΐνη υπόστρωμα που βρίσκεται προσδεσμένη σε μια λιγάνη της ουβικιτίνης-E3, άμεσα ή μέσω ενός τρίτου ενδιάμεσου θειοεστέρα υψηλής ενέργειας, που οδηγεί στο σχηματισμό ενός ισοπεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στο

καρβοξυτελικό άκρο της ουβικιτίνης και στο κατάλοιπο λυσίνης του υποστρώματος ή μιας άλλης ουβικιτίνης (Gomes, 2013).



Εικόνα 1.1 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας πρωτεϊνικής αποικοδόμησης μέσω του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Προσαρμογή από Gomes, 2013).

Πιστεύεται ότι το ανθρώπινο σύστημα της ουβικιτίνης κωδικοποιεί δύο ένζυμα E1, περίπου πενήντα ένζυμα E2 και περισσότερα από πεντακόσια ένζυμα E3, τα οποία σχηματίζουν μια ιεραρχική πυραμίδα της μορφής E1-E2-E3. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ουβικιτινίωση είναι ένας αυστηρά ρυθμιζόμενος μηχανισμός (Pickart and Eddins, 2004). Επιπλέον, το ποιο πρωτεϊνικό μόριο πρόκειται να ουβικιτινιωθεί καθορίζεται από τα ένζυμα E2 και E3. Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο E3 πολλές φορές υποδεικνύει το πρωτεϊνικό υπόστρωμα, αφού συνδέεται με αυτό πριν αρχίσει η μεταφορά της ουβικιτίνης (Lewin, 2004). Η απο-ουβικιτινίωση είναι η διαδικασία εκείνη κατά την οποία αφαιρούνται οι αλυσίδες ουβικιτίνης από το υπόστρωμα. Η διαδικασία αυτή είναι πολύ σημαντική, καθώς το υπόστρωμα πρέπει να απαλλαγεί από την ουβικιτίνη για να εισαχθεί στο πρωτεάσωμα και να αποικοδομηθεί. Πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας ομάδας ισοπεπτιδασών που καλούνται απο-ουβικιτινάσες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να διασπών τον ισοπεπτιδικό δεσμό ανάμεσα στην ουβικιτίνη και το υπόστρωμα. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί περίπου εκατό απο-ουβικιτινάσες, οι οποίες κατηγοριοποιούνται σε έξι υποομάδες, οι πέντε από τις οποίες ανήκουν στις πρωτεάσες κυστεΐνης και η μία στα μεταλλοένζυμα. Δομικές και λειτουργικές μελέτες έχουν υποδείξει ότι οι διαφορετικές υποομάδες απο-ουβικιτινινασών εμφανίζουν διαφορετική προτίμηση ως προς τις αλυσίδες πολυ-ουβικιτίνης πάνω στις οποίες δρουν. Μερικές απο-ουβικιτινάσες απελευθερώνουν την ουβικιτίνη πριν την αναγνώριση από το πρωτεάσωμα, με αποτέλεσμα την αναστολή της αποικοδόμησης. Ένας επιπλέον ρόλος των απο-ουβικιτινινασών είναι η ρύθμιση των επιπέδων της ελεύθερης ουβικιτίνης και της συζευγμένης μορφής της (Nijman et al., 2005).

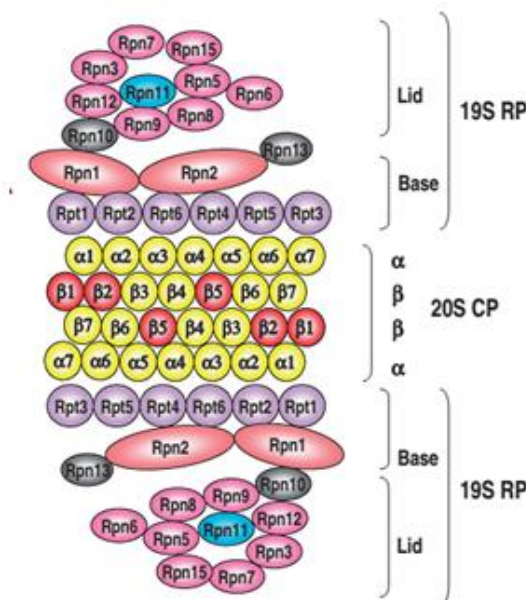
1.1.1.2 Πρωτεάσωμα

Το πρωτεάσωμα είναι μια μεγάλη και πολύπλοκη κυτταρική μηχανή με μοριακό βάρος της τάξης των 2,5 MDa που διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στις διαδικασίες της κυτταρικής ομοιόστασης και της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης από τα αρχαιοβακτήρια μέχρι τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από το 20S καταλυτικό κέντρο (Core Particle, CP) και ένα ή δύο 19S ρυθμιστικά μόρια (Regulatory Particle, RP), τα οποία συνδέονται στα άκρα του καταλυτικού κέντρου (Liu and Jacobson, 2013). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα οι ουβικιτινιλωμένες πρωτεΐνες μικρής διάρκειας ζωής αποικοδομούνται από το 26S πρωτεάσωμα (Pickart, 2000). Αντίθετα, η δράση του 20S πρωτεασώματος εστιάζεται στην αποικοδόμηση μη διπλωμένων, λανθασμένα διπλωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών. Συνεπώς, αυτή η πρωτεϊνική μηχανή εμπλέκεται σε μια πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών όπως ο έλεγχος της ποιότητας των πρωτεϊνών, η επιδιόρθωση του DNA, η έκφραση γονιδίων, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η μεταγωγή κυτταρικού σήματος αλλά και η αντιγονοπαρουσίαση (Tsakiri et al., 2013; Voutsadakis, 2017). Το πρωτεάσωμα έχει δείχθει ότι υπόκειται στη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα απόκρισης στο στρες, Nrf2 (nuclear factor -erythroid derived 2-like 2) (Sykietis and Bohmann, 2010).

Το 20S CP αποτελείται στα ευκαρυωτικά κύτταρα από 28 α - και β -τύπου υπομονάδες που ομαδοποιούνται ανά επτά σε τέσσερις δακτυλίους (Maurin-Furlow, 2013). Οι δύο εσωτερικοί δακτύλιοι αποτελούνται από τις β -τύπου υπομονάδες (β 1-7) και οι δύο εξωτερικοί δακτύλιοι από α -τύπου υπομονάδες (α 1-7). Στα θηλαστικά, η κύρια πρωτεολυτική δραστηριότητα μεσολαβείται από τρεις β υπομονάδες, τις β 1, β 2 και β 5, που είναι καταλυτικές και φέρουν ενεργότητες πεπτιδασών. Συγκεκριμένα, η β 1 (PSMB6) υπομονάδα έχει ενεργότητα κασπάσης (caspase-like activity, LLE) και πρωτεολύει έπειτα από την παρουσία όξινων αμινοξικών καταλοίπων, η β 2 (PSMB7) υπομονάδα φέρει ενεργότητα θρυψίνης (trypsin-like activity, LRR) και πρωτεολύει έπειτα από βασικά κατάλοιπα, ενώ η β 5 (PSMB5) υπομονάδα παρουσιάζει ενεργότητα χυμοθρυψίνης (chymotrypsin-like activity, LLVY) και πρωτεολύει έπειτα από υδρόφοβα αμινοξέα (Schwartz and Hochstrasser, 2003). Το αποτέλεσμα της πρωτεολυτικής δράσης τους είναι η παραγωγή πεπτιδίων μήκους τεσσάρων ως δεκατεσσάρων αμινοξέων, τα οποία κατόπιν ανακυκλώνονται από το κύτταρο μέσω της δράσης άλλων πεπτιδασών (Voutsadakis, 2017).

Το 19S πρωτεάσωμα αναγνωρίζει τη σημασμένη με ουβικιτίνη-πρωτεΐνη στόχο και τη μεταφέρει στον καταλυτικό πυρήνα. Το 19S ρυθμιστικό τμήμα αποτελείται από δύο υποσύμπλοκα που καλούνται βάση και κάλυμμα (Walz et al., 1998). Η βάση αποτελείται από έξι ATPάσες τύπου AAA, τις Rpt1-6 και τρεις υπομονάδες που δεν ανήκουν στις ATPάσες, τις Rpn1, Rpn2 και Rpn13 (Tanaka, 2013). Το κάλυμμα αποτελείται από εννέα υπομονάδες που δεν ανήκουν στις ATPάσες με διακριτή αλληλουχία, δομή και λειτουργία, τις Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12 και Rpn15. Η βάση και το κάλυμμα συνδέονται με την βοήθεια του μορίου Rpn10 σχηματίζοντας έτσι το 19S ρυθμιστικό τμήμα. Οι υπομονάδες Rpn13 και Rpn10 δρουν ως υποδοχείς πολυουβικιτίνης, ενώ η υπομονάδα Rpn11 φέρει ενεργότητα απο-ουβικιτινάσης (Lander et al., 2012). Το 26S πρωτεάσωμα καταστρέφει κυρίως πρωτεΐνες που έχουν

σημανθεί με ουβικιτίνη. Η επιλογή αυτών γίνεται από το ένα εκ των δύο 19S τμημάτων (Glickman and Ciechanover, 2002). Αντίθετα, ο ATP-ανεξάρτητος πρωτεολυτικός μηχανισμός λειτουργεί χωρίς τη διαμεσολάβηση της ουβικιτίνης και φαίνεται να συμμετέχει στην αποικοδόμηση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Shringarpure et al., 2003).

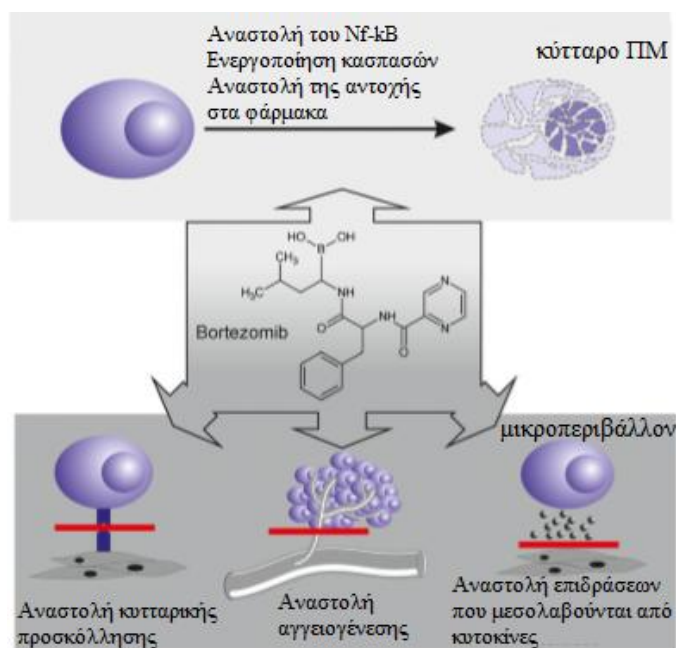


Εικόνα 1.2 Σχηματική αναπαράσταση του 26S πρωτεασώματος. Στο κέντρο της πρωτεολυτικής αυτής μηχανής εντοπίζεται το 20S καταλυτικό κέντρο (Core Particle, CP) με τους τέσσερις δακτυλίους του σε διάταξη α-β-β-α. Στα δύο άκρα αυτού βρίσκεται το 19S ρυθμιστικό σύμπλοκο (Regulatory Particle, RP) που αποτελείται από δύο επιμέρους τμήματα: το κάλυμμα (lid) και τη βάση (base) (Προσαρμογή από Tanaka, 2009).

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων σε πολλούς τύπους καρκίνου. Τέτοια παραδείγματα είναι ο καρκίνος του παχέος εντέρου (Arlt et al., 2009), ο μεταστατικός καρκίνος του ήπατος (Li et al., 2017), οι νεοπλασίες του θυροειδούς (Okamura et al., 2003) και διάφοροι τύποι μελανώματος (Ren et al., 2000). Το φαινόμενο αυτό πιθανότατα υποδηλώνει την προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες έντονης οξειδωτικής και πρωτεοτοξικής καταπόνησης.

Η δράση του πρωτεασώματος μπορεί να παρεμποδιστεί από συγκεκριμένους αναστολείς. Οι αναστολείς αυτοί αποτελούν μικρά μόρια, τα οποία στοχεύουν και καταστέλλουν τις καταλυτικές υπομονάδες του πρωτεασώματος οδηγώντας σε συσσώρευση κυκλινών ή κυκλινοεξαρτώμενων κινασών και ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών, αναστολή της απομάκρυνσης λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών και παρεμπόδιση του μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο αναστολέας πρώτης γενιάς bortezomib (Adams et al., 1999). Το bortezomib, γνωστό και ως PS-341 αποτελεί έναν αντιστρεπτό αναστολέα, του οποίου ο κεντρικός μηχανισμός δράσης αφορά στην ομοιοπολική πρόσδεση υψηλής συγγένειας στην καταλυτική υπομονάδα με ενεργότητα χυμοθρυψίνης του

πρωτεασώματος ή στη β5i υπομονάδα του ανοσοπρωτεασώματος. Παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί χαμηλότερης συγγένειας πρόσδεση και στις καταλυτικές υπομονάδες που φέρουν ενεργότητες θρυψίνης και κασπάσης (Berkers et al., 2005). Η ακριβής αναστολή μεσολαβείται από μια ομάδα φαρμακοφόρου, το οποίο στη δεδομένη περίπτωση αποτελεί παράγωγο του βορονικού οξέος.



Εικόνα 1.3 Μηχανισμός δράσης του αναστολέα πρωτεασώματος bortezomib (Προσαρμογή από Kubiczakova et al., 2014).

Παρόλα αυτά, το bortezomib, εκτός του ότι προκαλεί σημαντικές παρενέργειες, δεν είναι εξίσου αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση συμπαγών όγκων. Για αυτό το σκοπό, τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν και δοκιμάζονται στην κλινική οι νέες γενιάς αναστολείς πρωτεασώματος, το marizomib (NPI-0052) και το carfilzomib (Chen et al., 2011).

Ένας άλλος πρωτεασωμικός αναστολέας ο οποίος μέχρι στιγμής χρησιμοποιείται μόνο για την ταχεία και ευαίσθητη ανίχνευση του πρωτεασώματος (ως φθορίζων πρωτεασωμικός ιχνηθέτης – probe) σε *in vivo* και *in vitro* συστήματα, είναι ο Bodipy TMR-Ahx3L3VS ή αλλιώς MV151. Σε αντίθεση με το bortezomib, ο MV151 ιχνηθέτης στοχεύει ειδικά όλες τις ενεργές υπομονάδες τόσο του πρωτεασώματος όσο και του ανοσοπρωτεασώματος (Verdoes et al., 2006).

1.1.2 Μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος

Τα λυσοσώματα είναι οργανίδια με μονή μεμβράνη και περιέχουν ποικιλία πρωτεολυτικών ενζύμων για την αποικοδόμηση οξειδωμένων, λειτουργικών και μη πρωτεϊνών, αλλά και ενδοκυτταρικών συστατικών, όπως ολόκληρα οργανίδια, λιπίδια και πρωτεϊνικά συσσωματώματα (aggregates). Η λυσοσωμική κοιλότητα αποτελείται από πενήντα διαφορετικά πεπτιδικά ένζυμα, τις υδρολάσες, από τις οποίες πιο καλά

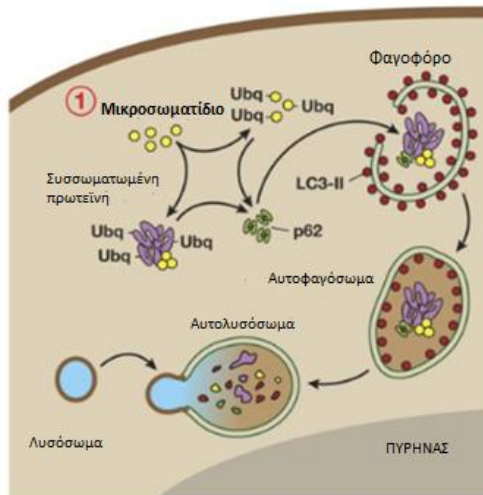
μελετημένες είναι οι καθεψίνες, οι οποίες χωρίζονται σε τρεις υποκατηγορίες, τις καθεψίνες κυστεΐνης, ασπαρτικού και σερίνης, ανάλογα με το αμινοξικό κατάλοιπο του ενεργού τους κέντρου και είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση του φορτίου που παραλαμβάνουν (Kirkegaard and Jäättelä, 2009). Επίσης, υπάρχουν και τα μεμβρανικά ένζυμα, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη διατήρηση του pH στο 5 στο εσωτερικό του οργανιδίου και την απομάκρυνση των προϊόντων αποικοδόμησης προς το κυτοσόλιο (De Duve and Wattiaux, 1966).

Τα μονοπάτια μέσω των οποίων το λυσόσωμα λαμβάνει τα εξωκυτταρικά και εσωτερικά υλικά που προορίζονται για αποικοδόμηση είναι τα ακόλουθα:

- Ενδοκύτωση: οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες ενδοκυτταρώνονται ολοκληρωτικά από τη μεμβράνη του κυττάρου και παραμένουν στα ενδοσώματα μέχρι να συγχωνευτούν με τα λυσοσώματα (Luzio et al., 2007).
- Κρινοφαγία: οι εκκριτικές πρωτεΐνες περικλείονται σε εκκριτικά κυστίδια που προέρχονται από το Golgi και συγχωνεύονται με τα λυσοσώματα (Glaumann, 1989).
- Αυτοφαγία: κυτταροπλασματικά συστατικά περιβάλλονται από κυστίδια με διπλή μεμβράνη και αποικοδομούνται μέσω του λυσοσωμικού μονοπατιού (Majeski and Dice, 2004).

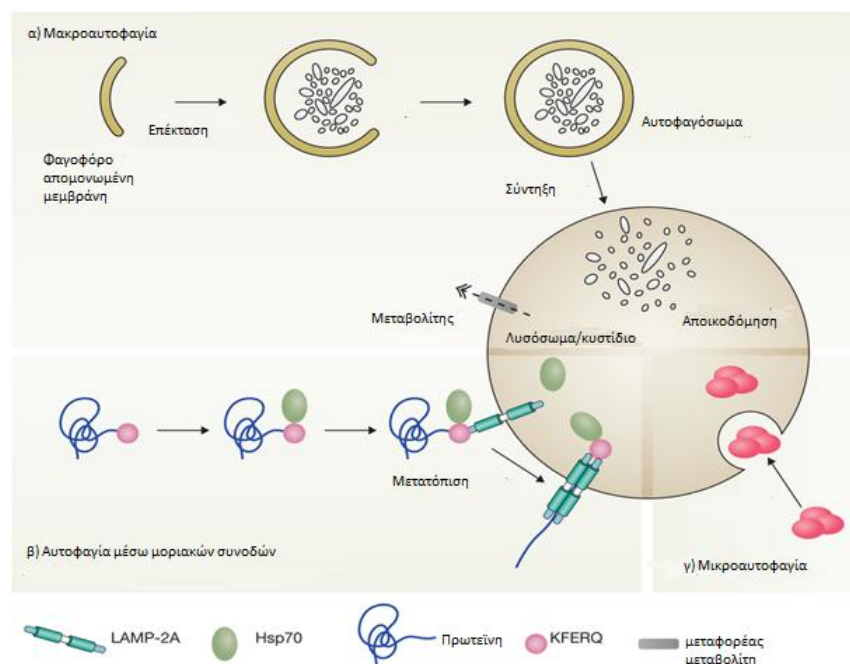
Η αυτοφαγία είναι μια εξελικτικά συντηρημένη διαδικασία, η οποία χαρακτηρίζει όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Αποτελεί μια αυστηρά ελεγχόμενη διεργασία που συμμετέχει στην ανάπτυξη του κυττάρου, καθώς και στη διατήρηση της ομοιοστασίας του, βοηθώντας να διατηρηθεί μια ισορροπία μεταξύ της σύνθεσης και της αποικοδόμησης των κυτταρικών συστατικών. Επιπλέον, η αυτοφαγία είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση ολόκληρων οργανισμών και δομών (βακτήρια, ιοί), ολόκληρων μη λειτουργικών οργανιδίων, όπως επίσης και πρωτεϊνών με μεγάλο χρόνο ζωής. Όσον αφορά στα μετα-μιτωτικά κύτταρα, το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο, ενώ δυσλειτουργία των μηχανισμών αυτοφαγίας συνεπάγεται ιδιαίτερα δραματικές επιπτώσεις για αυτά (Cuervo, 2004).

Πρωτεΐνες που μεσολαβούν στη διαδικασία αποικοδόμησης τέτοιων μεγάλων μορίων έχουν αναγνωριστεί σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Μια τέτοια πρωτεΐνη είναι η p62/SQSTM1, η οποία έχει δράση υποδοχέα ουβικιτίνης και έτσι μεταφέρει πρωτεΐνες που έχουν υποστεί επεξεργασία με ουβικιτίνη στο αυτοφαγικό μονοπάτι. Η p62 εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες πέραν της αυτοφαγίας όπως είναι η σηματοδότηση και ο κυτταρικός θάνατος. Η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να πολυμερίζεται και να αποικοδομείται αυτοφαγικά μέσω του N-άκρου (PB1) και να αλληλεπιδρά με την ουβικιτίνη μέσω του C-άκρου (UBA). Η p62 συνδέεται άμεσα στη LC3, η οποία είναι μεμβρανική πρωτεΐνη του αυτοφαγοσώματος μέσω ενός συγκεκριμένου μοτίβου (LIR).



Εικόνα 1.4 Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού της αυτοφαγίας σε ένα ευκαρυωτικό κύτταρο. Στην αρχή σχηματίζεται το φαγοφόρο, μία δομή με διπλή μεμβράνη που μεταφέρει το φορτίο το οποίο προορίζεται για αποικοδόμηση. Στη συνέχεια το φαγοφόρο επιμηκύνεται και κλείνει δημιουργώντας το αυτοφαγόσωμα, το οποίο συντήκεται με το λυσόσωμα για να δημιουργήσουν το αυτολυσόσωμα, το περιεχόμενο του οποίου καταστρέφεται (Προσαρμογή από Stern et al., 2012).

Η αυτοφαγία διακρίνεται σε τρεις τύπους, τη μακροαυτοφαγία, τη μικροαυτοφαγία και την αυτοφαγία μέσω μοριακών συνοδών (Chaperone-Mediated Autophagy-CMA). Κοινό χαρακτηριστικό όλων αποτελεί η τελική αποικοδόμηση των ενδοκυτταρικών συστατικών μέσω του λυσοσώματος.



Εικόνα 1.5 Οι τρεις τύποι αυτοφαγίας. Η αυτοφαγία χωρίζεται σε τρεις τύπους ανάλογα με το μηχανισμό με τον οποίο το υπόστρωμα μεταφέρεται στο λυσόσωμα (Προσαρμογή από Boya et al., 2013).

Η μακροαυτοφαγία αποτελεί μια μορφή αυτοφαγίας που επάγεται σε καταστάσεις στρες και είναι ο μόνος πρωτεολυτικός μηχανισμός που αποικοδομεί κατεστραμμένες μεμβράνες, κυτταρικά οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια, λιποσώματα, συσσωματώματα πρωτεϊνών, καθώς και ξένους οργανισμούς (ιούς). Κατά τη μακροαυτοφαγία, ολόκληρες περιοχές του κυτοσολίου απομονώνονται από μια συντιθέμενη διπλή μεμβράνη, η οποία κλείνει και δημιουργεί το αυτοφαγόσωμα. Στη δημιουργία του αυτοφαγώσματος συμμετέχουν και πρωτεΐνες που σχετίζονται με την αυτοφαγία, γνωστές ως ATGs (Autophagy related proteins). Στη συνέχεια, το αυτοφαγόσωμα συγχωνεύεται με το λυσόσωμα, ώστε οι πρωτεάσες του λυσοσώματος να αποικοδομήσουν το φορτίο που μεταφέρει (Yorimitsu, 2005).

Η μικροαυτοφαγία αποτελεί μια άλλη μορφή αυτοφαγίας, η οποία αποικοδομεί μικρότερα οργανίδια και κάποιες πρωτεΐνες με τη βοήθεια της πρωτεΐνης HSC70. Ειδικότερα, η λυσοσωμική μεμβράνη εγκολλώνεται εξω- ή ενδο-λυσοσωμικά για να περικλείσει ένα οργανίδιο που προορίζεται για αποικοδόμηση. Η αυτοφαγία μέσω μοριακών συνοδών είναι υπεύθυνη για την πρωτεόλυση κυτοσολικών πρωτεϊνών, οι οποίες φέρουν ένα συγκεκριμένο μοτίβο αναγνώρισης, συγκεκριμένα το πενταπεπτίδιο KFERQ. Οι μοριακοί συνοδοί (HSC70, HSP40, HSP90 κ.α.) αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη που προορίζεται για πρωτεόλυση μέσω του μοτίβου που φέρει και δημιουργούν μαζί της ένα σύμπλοκο. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο αυτό προσδένεται στον υποδοχέα Lamp-2a της λυσοσωμικής μεμβράνης, μέσα από τον οποίο θα περάσει η πρωτεΐνη αφού πρώτα ξεδιπλωθεί. Κοντά στην ενδοκυτταρική πλευρά του υποδοχέα LAMP-2A υπάρχει μια ενδολυσοσωμική μοριακή συνοδός (HSC70) που θα παραλάβει την ξεδιπλωμένη πρωτεΐνη και θα την εισάγει στη λυσοσωμική κοιλότητα όπου και θα πρωτεολυθεί (εικόνα 1.5). Τέλος, το σύμπλοκο των μοριακών συνοδών απελευθερώνεται από τη λυσοσωμική μεμβράνη και είναι έτοιμο να παραλάβει το επόμενο υπόστρωμα (Majeski and Dice, 2004).

Επιλεκτική αναστολή της αυτοφαγίας μπορεί να γίνει με τη χλωροκινίνη, η οποία συσσωρεύεται στα λυσοσώματα και αυξάνει το pH τους. Συνεπώς, αναστέλεται η δράση των λυσοσωμικών υδρολασών και εμποδίζεται η σύντηξη του αυτοφαγώσματος με το λυσόσωμα και κατ' επέκταση η αποικοδόμηση (Lee et al., 2011).

1.1.3 Το μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2/KEAP1

Σύμφωνα με τη θεωρία των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS), τα ROS συσσωρεύονται με την πάροδο του χρόνου καθιστώντας τα κύτταρα και τους ιστούς δυσλειτουργικά, οδηγώντας τα εν τέλει σε απόπτωση ή/και νέκρωση. Λόγω του ότι το μοριακό οξυγόνο σχετίζεται άμεσα με το διατήρηση της ζωής, υπάρχει σε αφθονία στα βιολογικά συστήματα, ενώ ταυτόχρονα η ικανότητά του να ανάγεται από μονά ηλεκτρόνια, το καθιστούν την κύρια αιτία σχηματισμού ROS (Bruyninckx et al., 1978). Σημαντικότερη πηγή δημιουργίας των ROS αποτελεί το μιτοχόνδριο (Harman, 1981). Τα ROS είναι μόρια που βρίσκονται σε πολύ ασταθή μορφή, διότι περιέχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στοιβάδα και έτσι έχουν την τάση να προσλαμβάνουν ένα επιπρόσθετο ηλεκτρόνιο από γειτονικά

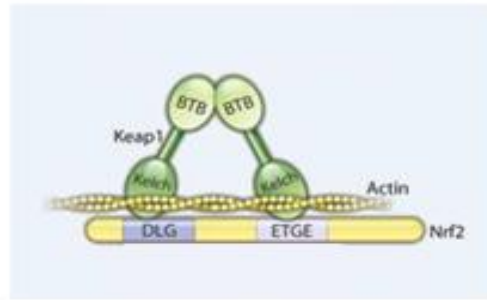
τους μόρια, αφήνοντας αυτά σε ασταθή μορφή και επηρεάζοντας έτσι, την αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου και κατ' επέκταση του ίδιου του οργανισμού. Όταν διαταραχθεί η ισορροπία ανάμεσα στο ρυθμό δημιουργίας και εξουδετέρωσης των ROS, τότε προκαλείται το οξειδωτικό στρες (Burton and Jauniaux, 2011).

Η απόκριση του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της πρωτεόστασης. Το κύριο αντιοξειδωτικό σηματοδοτικό μονοπάτι είναι αυτό του NRF2/KEAP1 (Sykiotis and Bohmann, 2008). Η πρωτεΐνη KEAP1 έχει δομή πρόσδεσης στην ακτίνη και διαθέτει ένα αμινο-τελικό μοτίβο BTB/POZ και ένα καρβοξυ-τελικό μοτίβο Kelch για την πρόσδεση της E3 λιγάσης CULLIN 3 (CULLIN 3-dependent E3 ligase-CUL3) και του μεταγραφικού παράγοντα NRF2, αντίστοιχα (Furukawa and Xiong, 2005). Ειδικότερα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2 εντοπίζεται προσδεμένος στην πρωτεΐνη KEAP1, η οποία τον οδηγεί προς αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα μέσω της CUL3. Τα ένζυμα αντιοξειδωτικής απόκρισης της φάσης II, σε αυτή την περίπτωση, είναι ανενεργά και στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant Response Elements - AREs) βρίσκονται ισχυρά συνδεδεμένα διμερή της πρωτεΐνης MAF ή κατασταλτικοί παράγοντες, όπως η πρωτεΐνη BACH1 (Villeneuve et al., 2010).

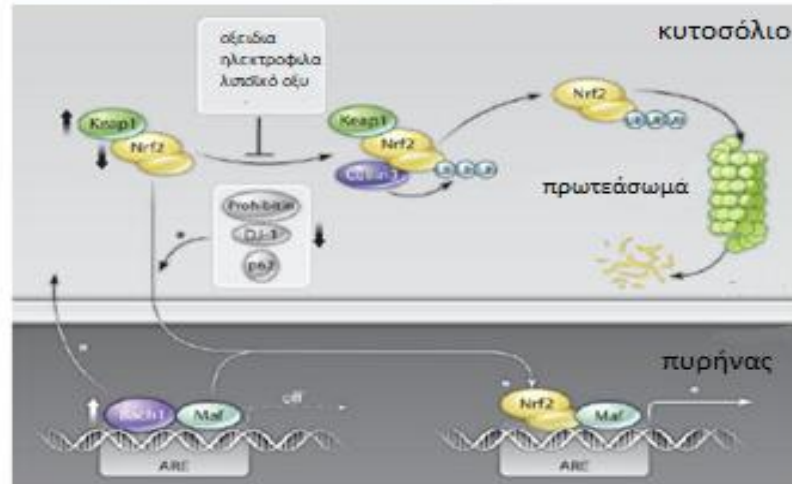
Το σύμπλοκο KEAP1/CUL3 εντοπίζεται στο κυτοσόλιο και τον πυρήνα, καθώς η πρωτεΐνη KEAP1 διαθέτει σήμα εξόδου από τον πυρήνα (nuclear export signal-NES) (Kaspar et al., 2012). Η πρωτεΐνη KEAP1 είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στο οξειδωτικό στρες, καθώς διαθέτει μια σειρά από κατάλοιπα κυστεΐνης που δρουν ως αισθητήρες σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Holland and Fishbein, 2010). Παρουσία οξειδωτικού στρες, αλλάζει η τριτοταγής δομή του KEAP1, με αποτέλεσμα να μη μπορεί να προσδεθεί ο NRF2 και να ελευθερώνεται. Έτσι, διευκολύνεται η είσοδός και κατ' επέκταση η συσσώρευσή του στον πυρήνα. Μετά την είσοδό του στον πυρήνα, ο NRF2 διμερίζεται με την πρωτεΐνη MAF και προσδένεται στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης επάγοντας την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, καθώς και των ενζύμων αντιοξειδωτικής απόκρισης της φάσης II (Sykiotis and Bohmann, 2010) (**Εικόνα 1.6**).

Ο NRF2 μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί μέσω φωσφορυλίωσής του από την κινάση PKR-like endoplasmic reticular (PERK) παρουσία στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Cullinan et al., 2003) καθώς και από την κινάση Protein kinase C (PKC) (Niture et al., 2009). Με αυτό τον τρόπο αποκαθίσταται η οξειδοαναγωγική ισορροπία και η βλάβη ελαχιστοποιείται. Επιπλέον, ο NRF2 καταστέλεται από την κινάση Glycogen synthase kinase 3 (Gsk3) αφού η κινάση αυτή φωσφορυλιώνει την κινάση FYN η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και καταστέλει τον NRF2 (Jain and Jaiswal, 2007).

α



β



Εικόνα 1.6 Το σύμπλοκο NRF2/KEAP1 απουσία και παρουσία οξειδωτικού στρες.

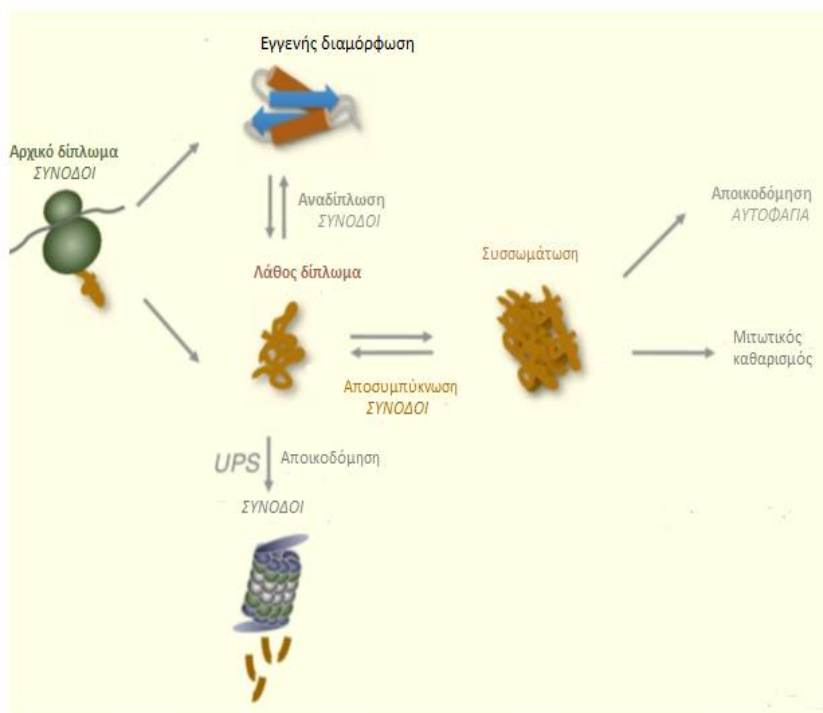
α. Η πρωτεΐνη KEAP1 έχει δομή πρόσδεσης στην ακτίνη και διαθέτει ένα αμινο-τελικό μοτίβο BTB/POZ και ένα καρβοξυ-τελικό μοτίβο Kelch για την πρόσδεση της E3 λιγάσης CULLIN 3 και του μεταγραφικού παράγοντα NRF2, αντίστοιχα. Απουσία οξειδωτικού στρες, ο μεταγραφικός παράγοντας NRF2 εντοπίζεται προσδεσμένος στην πρωτεΐνη KEAP1, η οποία τον οδηγεί προς αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, μέσω της E3 λιγάσης CULLIN 3 (CULLIN 3-dependent E3 ligase-CUL3). **β.** Παρουσία οξειδωτικού στρες, ο NRF2 απελευθερώνεται από την KEAP1 και εισέρχεται στον πυρήνα. Εκεί, διμερίζεται με την πρωτεΐνη MAF και προσδένεται στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (AREs) επάγοντας την έκφραση των γονιδίων στόχων του (Προσαρμογή από Sykiotis and Bohmann, 2010).

1.1.4 Μοριακοί συνοδοί (Heat shock proteins-Hsps)

Η επίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως αύξηση θερμοκρασίας, αλλαγή pH, οξείδωση, μεταλλάξεις και άλλες χημικές τροποποιήσεις έχουν ως αποτέλεσμα τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Τέτοιες μετουσιωμένες πρωτεΐνες, αντιδρούν μεταξύ τους μέσω υδρόφοβων καταλοίπων δημιουργώντας έτσι συσσωματώματα (aggregates), τα οποία είναι τοξικά για το κύτταρο.

Στη διατήρηση της κυτταρικής πρωτεόστασης συμμετέχει ένα δίκτυο μοριακών συνοδών (molecular chaperones), το οποίο ελέγχει το σωστό δίπλωμα των πρωτεϊνών, την αναδίπλωση των μη σωστά διπλωμένων πρωτεϊνών (μη λειτουργικών πρωτεϊνών), ενώ παράλληλα παρεμποδίζει τη δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Οι μοριακοί συνοδοί αποτρέπουν το σχηματισμό συσσωματωμάτων είτε επιδιορθώνοντας πρωτεΐνες, αντιδρώντας με τα υδρόφοβα αμινοξέα των κατεστραμμένων πρωτεϊνών υποβοηθώντας έτσι την επαναδίπλωσή

τους, είτε οδηγώντας τις στα πρωτεολυτικά μονοπάτια (Tower, 2009) (**Εικόνα 1.7**). Ονομάζονται πρωτεΐνες θερμικού σοκ, γιατί αρχικά περιγράφηκαν στην απόκριση του κυττάρου στην αύξηση της θερμοότητας, ενώ τώρα είναι γνωστό ότι εκφράζονται και σε άλλες καταστάσεις στρες. Οι μοριακές συνοδοί κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε μεγάλου μοριακού βάρους π.χ. HSP90, HSP70 και σε μικρές HSPs (sHSPs). Οι sHSPs είναι ATP–ανεξάρτητες, ενώ οι μεγάλου μοριακού βάρους είναι εξαρτώμενες από το ATP.



Εικόνα 1.7 Ο ρόλος των μοριακών συνοδών. Οι μοριακοί συνοδοί και το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Ubiquitin-proteasome system, UPS) συνεργάζονται για την αναδίπλωση των πρωτεϊνών, την αναδίπλωση των μη σωστά διπλωμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση της δημιουργίας πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Προσαρμογή από Shibata and Morimoto, 2014).

Οι πρωτεΐνες θερμικού στρες Heat shock protein 70 (HSP70) και Heat shock protein 90 (HSP90) διαθέτουν στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο το μοτίβο EEVD, το οποίο επιτρέπει τη σύνδεση άλλων μοριακών συνοδών (co-chaperones). Τα σύμπλοκα αυτά συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των μη σωστά διπλωμένων πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα (Odunuga et al., 2003). Συγκεκριμένα, πρώτα η HSP70 αναγνωρίζει μία μη σωστά διπλωμένη πρωτεΐνη και στη συνέχεια, ακολουθεί η πρόσδεση των μοριακών συνοδών HIP (HSP70 interacting protein) και HSP40, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ισχυρού δεσμού μεταξύ της HSP70 και της μη σωστά διπλωμένης πρωτεΐνης (υπόστρωμα). Εάν το υπόστρωμα (πρωτεΐνη στόχος) μπορεί να διπλωθεί, τότε δημιουργείται το σύμπλοκο HOP (Hsp70-Hsp90 organizing protein), που οδηγεί στο σωστό δίπλωμα της πρωτεΐνης στόχου.

Η έκφραση των μοριακών συνοδών HSPs γίνεται μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα HSF-1 (Heat Shock Factor -1). Σε συνθήκες απουσίας στρες, ο μεταγραφικός παράγοντας HSF-1 παραμένει ανενεργός στο κυτταρόπλασμα, καθώς είναι προσδεμένος στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο p97/CDC48-HDAC6-Hsp90. Όσον αφορά στη σχέση των HSPs με τον καρκίνο, έχει βρεθεί πως οι πρωτεΐνες αυτές υπερεκφράζονται σε μια πληθώρα καρκινικών τύπων και εμπλέκονται στην ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την ικανότητα αναγνώρισης του όγκου από το ανοσοποιητικό σύστημα (Ciocca and Calderwood, 2005; Trougakos et al., 2013). Έτσι, κάποιες από αυτές χρησιμεύουν ως βιοδείκτες του βαθμού διαφοροποίησης και επιθετικότητας συγκεκριμένων καρκινικών τύπων (Ciocca and Calderwood, 2005).

Στις μοριακές συνοδούς ανήκει και η CLUSTERIN (CLU), η οποία αποτελεί μία εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη. Η CLU θεωρείται βιοδείκτης οξειδωτικού στρες και έχει βρεθεί να συμβάλλει τόσο στην ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση όσο και στην προστασία από καρκινογένεση (Trougakos et al., 2009).

1.2 Ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης

Το πρώτο βήμα για την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας σχηματισμού πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και κατ' επέκταση παθογένειας είναι η αποφυγή της δημιουργίας ελαττωματικών μορίων. Το πρώτο σημείο ελέγχου λοιπόν είναι η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης, η οποία φαίνεται να συμβάλλει καταλυτικά στην επέκταση της μακροβιότητας (Tavernarakis, 2007). Η συγκεκριμένη ρύθμιση επιτυγχάνεται μέσω των ριβοσωμάτων και άλλων παραγόντων που ελέγχουν τη σύνθεση των εκκολαπτόμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων (Wolff et al., 2014).

Η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης χωρίζεται σε 4 επιμέρους σημεία ποιοτικού ελέγχου. Πρώτο επίπεδο ελέγχου αποτελεί η ρύθμιση του ρυθμού της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω των ριβοσωμάτων και των κυτταρικών αισθητήρων (στα μιτοχόνδρια ή στο ενδοπλασματικό δίκτυο) που αντιλαμβάνονται τη διαθεσιμότητα σε ενέργεια και υποστρώματα (mRNA και αμινοξέα) (Baird and Wek, 2012; Shalgi et al., 2014). Η δυνατότητα μείωσης του ρυθμού πρωτεϊνοσύνθεσης είναι καθολική για τη μακροβιότητα αρκετών οργανισμών μοντέλων, όπως έχει δείχθει στη ζύμη, στο σκώληκα και τον μυ ύστερα από καταστολή του μονοπατιού TOR, από τη μείωση των διαθέσιμων επιπέδων ριβοσωμικών υπομονάδων ή από την ελάττωση παραγόντων ενεργοποίησης της πρωτεϊνοσύνθεσης. Στοιχεία από μελέτες αποδεικνύουν ότι η επέκταση του προσδόκιμου ζωής των μοντέλων αυτών προέρχεται από την επιλεκτική πρωτεϊνοσύνθεση συγκεκριμένων mRNA και όχι από μεταβολές στο συνολικό πρωτεϊνικό φορτίο, καθώς ο συνολικός αριθμός των παραγόμενων πρωτεϊνικών μορίων δεν μεταβάλλεται (Riera et al., 2016).

Ένα δεύτερο επίπεδο ελέγχου είναι η ικανότητα των tRNA συνθετασών να αναγνωρίζουν και να απομακρύνουν λανθασμένα ενσωματωμένα αμινοξέα από το ενεργό τους κέντρο ενισχύοντας έτσι την πιστότητα της πρωτεϊνοσύνθεσης (Lee et al., 2006). Το τρίτο επίπεδο ελέγχου αφορά την ικανότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων να αναδιπλώνονται πριν ακόμα ολοκληρωθεί η πρωτεϊνοσύνθεση με τη βοήθεια μοριακών συνοδών σε μια προσπάθεια του κυττάρου να εξασφαλιστεί η

σωστή αναδίπλωση μεγάλων πολυπεπτιδικών μορίων και κατ' επέκταση η σωστή λειτουργία τους (Shalgi et al., 2013). Τελευταίο επίπεδο ρύθμισης της πρωτεϊνικής σύνθεσης αποτελεί ο έλεγχος της ποιότητας των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων μέσω της ακεραιότητας της δομής και της λειτουργίας των ίδιων των ριβοσωμάτων. Τα λανθασμένα, συναρμολογημένα ριβοσώματα αναγνωρίζονται και είτε επιδιορθώνονται ή αποικοδομούνται ολόκληρα, μια διαδικασία που επιτυγχάνεται με ουβικιτινίωση του ριβοσώματος και αυτοφαγία (ριβοφαγία). Η ριβοφαγία συναντάται συχνά σε περιπτώσεις υποσιτισμού (Kraft et al., 2008).

1.2.1 Ριβόσωμα

Το ριβόσωμα, το υποκυτταρικό οργάνιδο το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση των πρωτεϊνών, δημιουργείται στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μέσω μιας πολύπλοκης διαδικασίας συγκρότησης μακρομορίων, και αναμφισβήτητα, η διαδικασία αυτή είναι μία από τις κυριότερες λειτουργίες του κυττάρου. Τα ριβοσώματα διαφορετικών ειδών κυττάρων έχουν την ίδια βασική δομή, αλλά διαφέρουν στο μέγεθος. Έτσι, τα ριβοσώματα όλων των κυττάρων αποτελούνται από δυο υπομονάδες. Καθεμία από τις υπομονάδες περιλαμβάνει χαρακτηριστικά rRNAs και ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Τα ευκαρυωτικά ριβοσώματα αποτελούνται από 4 rRNAs, (5S, 5.8S, 18S και 25/28S) και περίπου 82 ριβοσωμικές πρωτεΐνες (στον επίμυ). Οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες κατανέμονται στις δυο υπομονάδες του ριβοσώματος. Έτσι, στη μικρή υπομονάδα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 33 πρωτεΐνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται με το λατινικό γράμμα S (Small) και έναν αριθμό, ενώ στη μεγάλη υπομονάδα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 49 πρωτεΐνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται με το λατινικό γράμμα L (Large) και έναν αριθμό (Wool et al., 1995).

Η βιογένεση των ριβοσωμάτων εναρμονίζεται με την κυτταρική ανάγκη για πρωτεϊνική σύνθεση και η αυξημένη βιογένεση ριβοσωμάτων σχετίζεται γενικά με την αυξημένη πολλαπλασιαστική δραστηριότητα. Λόγω του γεγονότος ότι η συγκρότηση και η λειτουργία του ριβοσώματος εξαρτάται από μια στοιχειομετρική ισορροπία των ριβοσωμικών πρωτεϊνών, πτώση στα επίπεδα μιας ή περισσότερων ριβοσωμικών πρωτεϊνών, μπορεί να μειώσει την ικανότητα ή ακόμα και να καταστήσει τη μεταφραστική μηχανή μη λειτουργική και επομένως να δοθεί το σήμα στο κύτταρο για αυτοκαταστροφή (Naora and Naora, 1999). Η υπερενεργοποίηση της βιογένεσης των ριβοσωμάτων η οποία επάγεται από ογκογόνα σήματα ή από την απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην πορεία της ογκογένεσης (Pelletier et al., 2017). Η σημαντικότητα αυτών των παρατηρήσεων υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν φάρμακα που αναστέλλουν τη βιογένεση των ριβοσωμάτων με στόχο μία βιώσιμη θεραπευτική προσέγγιση καρκινικής θεραπείας (Bywater et al., 2012).

Ο σημαντικός ρόλος τουλάχιστον μερικών ριβοσωμικών πρωτεϊνών φαίνεται από τις παθολογικές ή θανατηφόρες συνέπειες που αυτές προκαλούν με την μεταλλαγή ενός και μόνο αλληλόμορφου γονιδίου τους. Μόνο μερικές ετερόζυγες μεταλλαγές

στα θηλαστικά έχουν βρεθεί να είναι βιώσιμες και καθεμία από αυτές οδηγεί σε ένα πολύ συγκεκριμένο φαινότυπο. Ετερόζυγες μεταλλάξεις στις ριβοσωμικές πρωτεΐνες RPS19, RPS24, RPS17, RPL35a, RPL5 και RPL11 έχουν ανιχνευτεί σε ανθρώπους με αναιμία Diamond-Blackfan, η οποία χαρακτηρίζεται από απουσία ή μειωμένη ερυθροποίηση, όπως και σε λευχαιμίες και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα.

Η ετερόζυγη μεταλλαγή στη ριβοσωμική πρωτεΐνη RPL24 είναι αυτή που προκαλεί το φαινότυπο *Belly spot and Tail* (BST) στα ποντίκια. Τα ποντίκια με αυτό το φαινότυπο εμφανίζουν τα εξής χαρακτηριστικά: μειωμένο μέγεθος σώματος, άσπρο κοιλιακό σημάδι, ανωμαλίες στον αμφιβληστροειδή, μικρή ουρά καθώς και άλλες σκελετικές παραμορφώσεις. Στα ποντίκια αυτά εμφανίζεται μια γενικότερη πτώση της πιστότητας (και πιθανώς και του ρυθμού) της πρωτεϊνοσύνθεσης, στον οποίο οφείλεται και ο συγκεκριμένος φαινότυπος. Όταν η μεταλλαγή αυτή βρίσκεται σε συνδυασμό με αποσιώπηση του P53 γονιδίου, ο φαινότυπος αντιστρέφεται αλλά μειώνεται το προσδόκιμο ζωής, γεγονός που καταδεικνύει τη σημασία του P53 στην κυτταρική επιβίωση (Barkic et al., 2009).

1.3 Επιδιόρθωση βλαβών γενετικού υλικού

Ο πρωταρχικός σκοπός για κάθε είδους οργανισμό είναι να μεταφέρει το γενετικό του υλικό ανέπαφο και αναλλοίωτο στην επόμενη γενιά, το οποίο μπορεί να επιτευχθεί παρά τους συνεχόμενους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA. Για να αντιμετωπίσουν αυτές τις απειλές τα κύτταρα ανέπτυξαν ένα πολύπλοκο σύστημα ανίχνευσης και επιδιόρθωσης των βλαβών στο γενετικό υλικό (DNA damage repair-DDR). Η μεγάλη ποικιλία των ανωμαλιών που μπορούν να ανιχνευτούν στο γενετικό υλικό επέφερε πολλαπλούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Στα κύτταρα των θηλαστικών ρόλο κλειδί κατέχει η πρωτεϊνική κινάση ATM, η οποία στρατολογείται και ενεργοποιείται από θραύσεις στη δίκλωνη αλυσίδα του DNA (DSBs- double strand breaks). Η ATM έχει ως υπόστρωμα ακόμα την ιστόνη H2AX, η οποία όταν φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 139 καλείται γH2AX και αποτελεί βιοδείκτη ύπαρξης θραύσης στη δίκλωνη αλυσίδα. Λόγω της τροποποίησης της ιστόνης, το DNA καθίσταται λιγότερο συμπυκνωμένο επιτρέποντας στα μόρια της επιδιορθωτικής μηχανής να το προσεγγίσουν και με αυτό τον τρόπο να αποκατασταθεί η βλάβη. Στόχοι της ATM αποτελούν οι πρωτεϊνικές κινάσες CHK1 και CHK2, οι οποίες μαζί με την ATM δρουν, ώστε να μειώσουν τη δράση των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (Jackson and Bartek, 2010). Οι κινάσες αυτές ενεργοποιούν την πρωτεΐνη P53 φωσφορυλιώνοντάς την προκαλώντας έτσι τη σταθεροποίηση και τη συνεπακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσής της. Η ενεργοποίηση αυτή μπορεί να περιλαμβάνει επιπλέον περίπλοκες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (π.χ.ακετυλιώσεις) που έχουν ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του μορίου για ώρες. Η πρωτεΐνη P53 μπορεί να ενεργοποιήσει την επιδιόρθωση του DNA αλλά και να σταματήσει την κυτταρική αύξηση σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο στο σημείο G1/S. Όταν η βλάβη είναι μη αναστρέψιμη, επάγεται η απόπτωση του κυττάρου (Cheng and Chen, 2010).

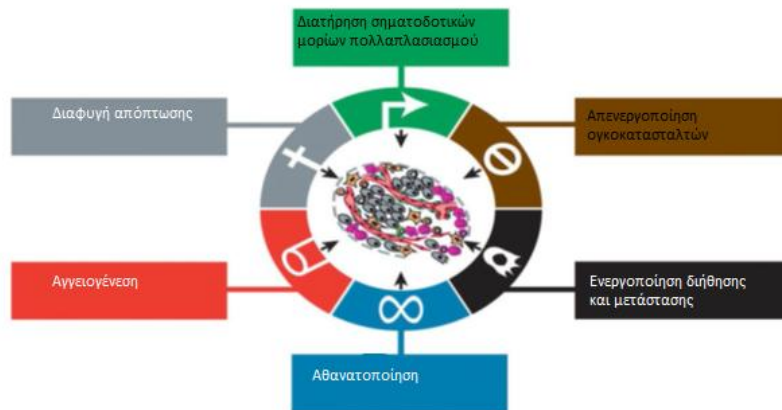
1.4 Καρκίνος

Η εμφάνιση του καρκίνου προκαλείται από τον ανεξέλεγκτο και συνεχή πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αφού αυτά δεν ανταποκρίνονται αποτελεσματικά στα σήματα που ελέγχουν τους μηχανισμούς ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (Reece et al., 2011). Η παντελής έλλειψη ελέγχου των μηχανισμών αυτών είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης βλαβών στα ρυθμιστικά συστήματα του κυττάρου με το πέρασμα του χρόνου. Για το λόγο αυτό άλλωστε ο καρκίνος χαρακτηρίζεται και ως ασθένεια του γήρατος. Ο καρκίνος αποτελεί μία πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική διαδικασία, γιατί η κυτταρική εξαλλαγή (καρκινογένεση) δεν είναι μια αυτόματη διαδικασία, αλλά απαιτεί συσσώρευση μεταλλαγών που σιγά-σιγά θα έχει ως αποτέλεσμα να παρακαμφθούν οι μηχανισμοί ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και είναι συνέπεια αλληλεπίδρασης γενετικού υλικού και περιβάλλοντος.

Τα γενικά χαρακτηριστικά της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων συνοψίζονται ως εξής: μεγάλη πυκνότητα κορεσμού, μειωμένη ανάγκη για προσθήκη ορού στο θρεπτικό υλικό στην περίπτωση καλλιεργούμενων κυττάρων, μειωμένη ανάγκη για προσκόλληση σε υπόστρωμα, ανάπτυξη όγκων σε πειραματόζωα, μη αναστολή της αύξησης λόγω επαφής, ανάπτυξη στιβάδων, αυξημένο μεταβολισμό και έκκριση πρωτεασών, μεταβολές στην οργάνωση του κυτταροσκελετού και στα μόρια που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος («Βιολογία Κυττάρου», Μαργαρίτης, 2008).

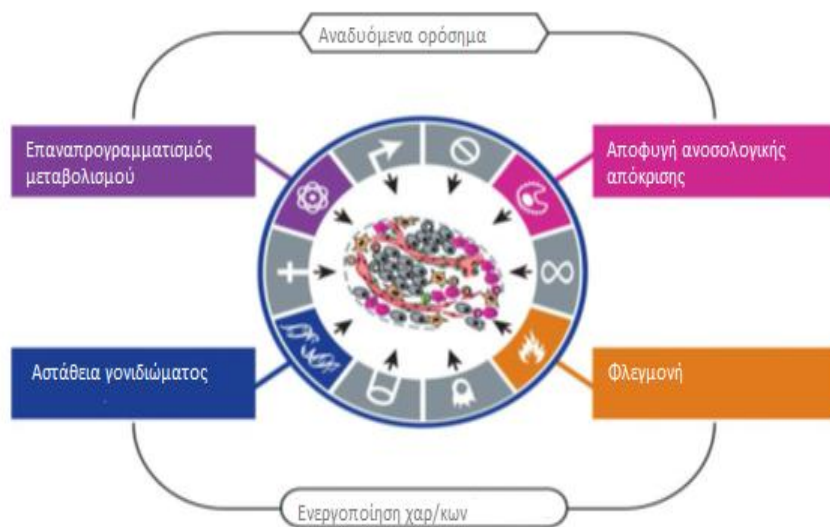
Παρατηρήσεις *in vivo* αλλά και επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η διαδικασία εξαλλαγής περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια: α) έναρξη, β) προαγωγή, γ) πρόοδο-ανάπτυξη του όγκου. Τα στάδια αυτά σχετίζονται με την εμφάνιση συγκεκριμένων μεταλλαγών-αλλοιώσεων που ωθούν το κύτταρο τελικά στην εμφάνιση του εξαλλαγμένου φαινοτύπου. Οι δύο σημαντικότεροι τύποι αλλαγών που συμβαίνουν στο γονιδίωμα κατά την κακοήγη εξαλλαγή είναι η ανάπτυξη γενετικής αστάθειας (genetic instability) και η συσσώρευση σωματικών αλλαγών (somatic mutation theory-SMT), η οποία βασίζεται στη μονοκλωνική ανάπτυξη των όγκων (Nowell, 1976).

Σύμφωνα με τους Hanahan και Weinberg (2000), όλα τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν κάποιες κοινές ιδιότητες (ορόσημα) που επιτρέπουν την ανάπτυξη όγκου και την ικανότητα μετάστασης. Αυτές περιλαμβάνουν σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο 1) τη διατήρηση των σηματοδοτικών για το διπλασιασμό τους μονοπατιών, ώστε να είναι διαρκώς ενεργά, γεγονός που τους εξασφαλίζει συνεχή πολλαπλασιασμό, 2) την καταστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων και πρωτεϊνών, 3) την άρση του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), αφού θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως φυσικός φραγμός στην ανάπτυξη του καρκίνου, 4) τη δυνατότητα να 'αθανατοποιούνται' μέσω της διατήρησης της ακεραιότητας των τελομερών στο γονιδίωμα κατά την αντιγραφή, 5) την ικανότητα αγγειογένεσης, ώστε να τροφοδοτούνται οι αναπτυσσόμενοι όγκοι, και 6) αλλαγές στη δομή τους που τους δίνουν τη δυνατότητα διήθησης και μετάστασης. Τα χαρακτηριστικά αυτά ονομάστηκαν «ορόσημα του καρκίνου» (hallmarks of cancer) (Hanahan and Weinberg, 2000).



Εικόνα 1.8 Τα ορόσημα του καρκίνου (Προσαρμογή από Hanahan and Weinberg, 2000).

Το 2011 συμπληρώθηκαν από τους ίδιους συγγραφείς δύο επιπλέον χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων (Hanahan and Weinberg, 2011). Το ένα περιλαμβάνει την ικανότητα να μεταβάλλουν ή να επαναπρογραμματίζουν το μεταβολισμό τους, έτσι ώστε να ενισχύεται πιο αποτελεσματικά ο πολλαπλασιασμός τους, ενώ το δεύτερο επιτρέπει στα κύτταρα να αποφεύγουν την ανοσολογική απόκριση, κυρίως από τα Τ και Β λεμφοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα φυσικά φονικά κύτταρα.



Εικόνα 1.9 Τα δύο αναδυόμενα ορόσημα του καρκίνου (Προσαρμογή από Hanahan and Weinberg, 2011).

Τέλος, τα τελευταία χρόνια αρχίζει να αναδεικνύεται μεταξύ άλλων και η άμεση συσχέτιση της εξέλιξης της καρκινογένεσης με τους μηχανισμούς διασφάλισης της ποιότητας του πρωτεώματος των κυττάρων ανοίγοντας νέα μονοπάτια στην προσπάθεια επιτυχούς αντιμετώπισης του καρκίνου (van Drie 2011; Trougakos et al., 2013; Voutsadakis 2017; Sklirou et al, 2018).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως προαναφέρθηκε, μία από τις σημαντικότερες ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες είναι ο καρκίνος, η εμφάνιση του οποίου προκαλείται από τον ανεξέλεγκτο και συνεχή πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, αφού αυτά δεν ανταποκρίνονται στα σήματα που ελέγχουν τους μηχανισμούς ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Η έλλειψη ελέγχου των μηχανισμών αυτών είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης βλαβών στα ρυθμιστικά συστήματα του κυττάρου. Ειδικότερα, είναι πλέον αποδεκτό ότι κατά την καρκινογένεση παρατηρείται σημαντική αύξηση του κυτταρικού οξειδωτικού φορτίου καθώς και σημαντική αύξηση της γενωμικής και πρωτεωμικής αστάθειας.

Προκειμένου να κατανοηθεί η συμμετοχή της πρωτεωμικής αστάθειας και η εμπλοκή του πρωτεοτοξικού στρες στην καρκινογένεση, στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι μηχανισμοί που επιτυγχάνουν τον έλεγχο ποιότητας-λειτουργικότητας του πρωτεώματος και είναι γνωστοί ως δίκτυο πρωτεόστασης σε ένα μοντέλο πολυσταδιακής χημικής καρκινογένεσης της επιδερμίδας του ποντικού. Επιπλέον, δεδομένου ότι το πρώτο σημείο ελέγχου για τη ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης επιτυγχάνεται μέσω των ριβοσωμάτων, μελετήθηκε η συσχέτιση της ριβοσωμικής λειτουργίας με τους μηχανισμούς κυτταρικής πρωτεόστασης μέσω της χρήσης κυτταρικών σειρών από διαγονιδιακά ποντίκια που λόγω μιας μεταλλαγής στη ριβοσωμική πρωτεΐνη RPL24 εμφανίζουν ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση. Οι μελέτες επεκτάθηκαν και σε ανάλυση σειρών από διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία φέρουν επιπλέον και απενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα P53. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στα θηλαστικά ελάχιστες ετερόζυγες μεταλλαγές των ριβοσωμικών πρωτεϊνών είναι βιώσιμες.

Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν στα κυτταρικά μοντέλα πολυσταδιακής χημικής καρκινογένεσης και ελαττωματικής/μειωμένης πρωτεϊνοσύνθεσης οι παρακάτω παράμετροι:

- Η λειτουργία των δύο κύριων κυτταρικών πρωτεολυτικών μονοπατιών, της ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και της αυτοφαγίας-λυσosώματος.
- Η αντιοξειδωτική απόκριση των κυττάρων μέσω του μονοπατιού NRF2/KEAP1.
- Η ρύθμιση του δικτύου των μοριακών συνοδών.
- Η συσσώρευση βλαβών στο DNA (γενωμική αστάθεια).

II. Υλικά και Μέθοδοι



2.1 Υλικά

2.1.1 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας

Τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM), η L-γλουταμίνη 100x, ο ορός εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS), το διάλυμα τρυψίνης/EDTA 10x, καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffered Saline, PBS) 10x, αγοράστηκαν από την Gibco (ThermoFisher Scientific).

2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρεία	Αριθμός
2-μερκαπτοαιθανόλη	Merck	15433
5x HOT FIREPol Eva green qPCR Mix Plus	Solis BioDyne	08-24-00001
APS	Research Organics	9530A
ATP	Sigma	A1852
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Biorad	5000006
BSA	Sigma	A9418
Comet SCGE assay kit	Enzo Life Sciences	ADI-900-166
CH ₃ COOH	Sigma	S2BBD1910V
C-L (Z-Leu-Leu-Glu-AMC- LLE)	Enzo Life Sciences	BML-ZW9345-0005
ClCH ₂ COONa (Χλωροξικό Νάτριο)	Fluka	24610
Coomasie Blue	Fluka	27816
CT-L (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC-LLVY)	Enzo Life Sciences	BML-P802-0005
CYTO-ID Autophagy detection kit	Enzo Life Sciences	ENZ-KIT175-0050
Developer- D19	Kodak	146 4593
DMSO	Sigma	270431
DNA damage ELISA kit	Enzo Life Sciences	ADI-EKS-350
DTT	Sigma	248531
Doxorubicin	Novartis	
EDTA	Research organics	9572E
EGTA	Sigma	3777
Fixer	Agfa	G382B
Hepes	Sigma	H-0891
MTT	Sigma	M2128
MV151	ThermoFischer Scientific	
NP-40	Sigma	74385

Onescript cDNA Synthesis Kit	ABM	G233
OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit	Chemicon	S7150
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma	P4417
Protease inhibitor cocktail	Sigma	I5763
ProteoStat Aggresome Detection Kit	Enzo Life Sciences	ENZ-51035-0025
PS-341	Millennium Pharmaceuticals	
Purelink genomic DNA kit	Invitrogen	K1280-01
RNAiso plus	Takara	9109
Ros Dye (CM-H ₂ DCFDA)	Invitrogen	C6827
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Serva	20765
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Merck	1107320100
Tris	Research Organics	9680T
Triton X-100	BDH	30632
Trypan blue Stain 0,4%	Gibco	15250
Tween 20	Sigma	P-1379
TBE electrophoresis solution 10X	Biorad	1610770
Western ECL Blotting substrates	Biorad	1705061
z-FR-AMC 9 (lysosome activity)	Enzo Life Sciences	BML-P137-0010
Αιθανόλη	Merck	
Ακρυλαμίδα	Research Organics	9502A
Γλυκερόλη	Sds	6023516
Γλυκίνη	Serva	23390
Ισοπροπανόλη	Sigma	I9516
Μεθανόλη	Merck	1,0069,2511
Μεμβράνη Νιτροκυτταρίνης	Santa Cruz Biotechnology	Sc-3724
Πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστών μοριακών βαρών	Fermentas	SM0671
Υδροχλωρικό οξύ (HCl) 37%	Merck	1,06405,1000
Φορμαλδεϋδη 16%	Polysciences	18814-20
Φωσφορικό κάλλιο	Sigma	P5629
Χλωριούχο κάλλιο	Sigma	P-9333
Χλωριούχο μαγνήσιο	Scharlau	MA00360
Χλωριούχο νάτριο	Merck	1,06405,1000

Πίνακας 2.1. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.1.3 Αντισώματα

Αντίσωμα	Εταιρεία	Κωδικός
20S proteasome α7 (GH6)	Santa Cruz	100456
20S proteasome β5 (C-19)	Santa Cruz	55009
53BP1	Cell Signaling	4937S
ACTIN	Santa Cruz	1615
ATM	NOVUS	NB110-55475
BECN1 (H-300)	Santa Cruz	sc-11427
Clusterin (C-18)	Santa Cruz	6419
donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz	2020
donkey anti-mouse IgG-HRP	Jackson	
GAPDH (FL-335)	Santa Cruz	25778 X2
goat anti-rabbit IgG-FITC	Santa Cruz aliquote	2012
HSP70/ HSC 70	Santa Cruz	sc-59570
Human p62	Enzo	BML-PW9860
Human Rpt6	Enzo	BML-PW9265
K48-linkage specific polyubiquitin antibody	Cell Signaling	4289
K63-Linkage specific polyubiquitin	Cell Signaling	5621
LC3B	Cell Signaling	2775S
Hsp70	Acris Antibodies Gmbit	AM03140PO-N
mouse anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz	2357
NQO1	Santa Cruz	16464
NRF2	Abcam	ab62352
Protein A Agarose Beads	Santa Cruz aliquote	2001
PSMD11	NOVUS	NBP1-46191
Ubiquitin	Cell Signaling	3933
γH2AX	Cell Signaling	2577

Πίνακας 2.2. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.1.4 PCR εκκινητές

Εκκινητής	Αλληλουχία
Beclin1-F	GGAAGTAGCTGAAGACCGGG
Beclin1-R	TTAGACCCCTCCATGCCTCA
Cathepsin L-F	AATGGAGGTCTGGACTCGGA
Cathepsin L-R	CAGCGAACTCGGCTCTGTAT
Cathepsin D-F	CCTGCTGGGTCCACCATAAG
Cathepsin D-R	CTCAGGTACCCAGAGAGGCT
Clusterin-F	GCAGGAGGTCTCTGACAATGA

<i>Clusterin-R</i>	GACGGCGTTCTGAATCTCCT
<i>Nqo1-F</i>	CATTGCAGTGGTTTGGGGTG
<i>Nqo1-R</i>	TCTGGAAAGGACCGTTGTCG
<i>Nrf2-F</i>	CCAGGACTACAGTCCCAGCAG
<i>Nrf2-R</i>	CTCCAAGATCTATGTCTTGCCTCC
<i>Psm7-F</i>	ATCAACAGAGCCCGGGTAGA
<i>Psm7-R</i>	GCCGAGATACCAAATGGCCT
<i>Psm1-F</i>	AGTTAGGCGCGATGCTTTCC
<i>Psm1-R</i>	ACAGTACCTCCGTTGAAGGC
<i>Psm2-F</i>	AACCTGGCTGACTGTCTTCG
<i>Psm2-R</i>	GGCCCTTCATGCTCGTCATA
<i>Psm5-F</i>	AATGCTTCACGGAACCACCA
<i>Psm5-R</i>	CTTCACCGTCTGGGAAGCAA
<i>Psm14/Rpn11-F</i>	ACACCTGAACAGCTGGCAAT
<i>Psm14/Rpn11-R</i>	ATCCAACATTGCGGCCAAAC
<i>Psm11/Rpn6-F</i>	TCCATTGATAGCCCCAAGGC
<i>Psm11/Rpn6-R</i>	CTGCATACCGAAGTGCAAGC
<i>Psm6-F</i>	GCAGGCTGGACCCTCAAGAA
<i>Psm6-R</i>	CAAGCGGATCACCCCTCCACT
<i>Psm7-F</i>	CTGTCTTGGAAGCGGATTTC
<i>Psm7-R</i>	GCAACAACCATCCCTTCAGT
<i>Psm3-F</i>	AGACATAAGAGAGGAAGCAGAGA
<i>Psm3-R</i>	TGGTGCTAGCCATATGCAACT
<i>Txnrd1-F</i>	CCATCGGTGACATCCTGGAG
<i>Txnrd1-R</i>	CTCTGAGCCAGCAATCTCCC
<i>Atg5-F</i>	TTTTGGGCCATCAACCGGA
<i>Atg5-R</i>	ACAGGCCGGAACAGCTTCTG
<i>Atg7-F</i>	GATGACCGCATGAATGAGCCT
<i>Atg7-R</i>	TATCAAATGCCAGGCTGACAGG
<i>Atm-F</i>	TAAACGAGCAGTCGGCAGAG
<i>Atm-R</i>	TGCCCATCCCGTCCACAATA
<i>Hsp90-aa1-F</i>	AGAGCTGTTGCGGTACTACAC
<i>Hsp90-aa1-R</i>	GGAGTTAGCAACCTGGTCCTT
<i>Hsp1b-70-F</i>	CTTGTCCATGTTAAGGTTTTGTGGT
<i>Hsp1b-70-R</i>	TGTACACAGGGTGGCAGTGTAG
<i>Hsp1-F</i>	AGTGAAGACCAAGGAAGGCG
<i>Hsp1-R</i>	GGTGAAGCACCGAGAGATGT
<i>Stub1-F</i>	TGAAGATGCAGCAGCCTGAA
<i>Stub1-R</i>	AAGAAGTGCGCCTTCACAGA
<i>Sqstm1/P62-F</i>	CTTCGGAAGCTGAAACATGGAC
<i>Sqstm1/P62-R</i>	TGACATTGGGATCTTCTGGTGG

Πίνακας 2.3. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.1.5 Όργανα

Όργανο	Εταιρεία
Φυγόκεντρος	Biofuge stratus
Συσκευή ηλεκτροφόρησης	Biorad
Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη	Biorad
Συσκευή PikoReal 96 Real-Time PCR System	Thermo
Φθορισμόμετρο	Biorad
Φασματοφωτόμετρο	Biorad
Επωαστήρας	ProBlot Labnet
Συσκευή σύνθεσης cDNA(Minicycler PTC-150)	MJ Research
Επωαστικοί κλίβανοι για τη διατήρηση κυτταροκαλλιιεργειών	ThermoFisher Scientific
Συσκευή ηλεκτροφόρησης DNA	MJ Research
Θάλαμος νηματικής ροή	Bioair
Συνεστιακό μικροσκόπιο confocal	Nikon
Μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης με ενσωματωμένη ψηφιακή μηχανή	Nikon
Ψυχόμενες επιτραπέζιες φυγόκεντροι	ThermoFisher scientific
Μετρητής απορρόφησης πλακών μικροτιτλοδότησης Microplate Reader	Biochrom
Countess automated cell counter	Invitrogen
Υπερκαταψύκτης -86°C	ThermoFisher Scientific
Καταψύκτης -20°C	Easytronic

Πίνακας 2.4. Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.2 Μέθοδοι

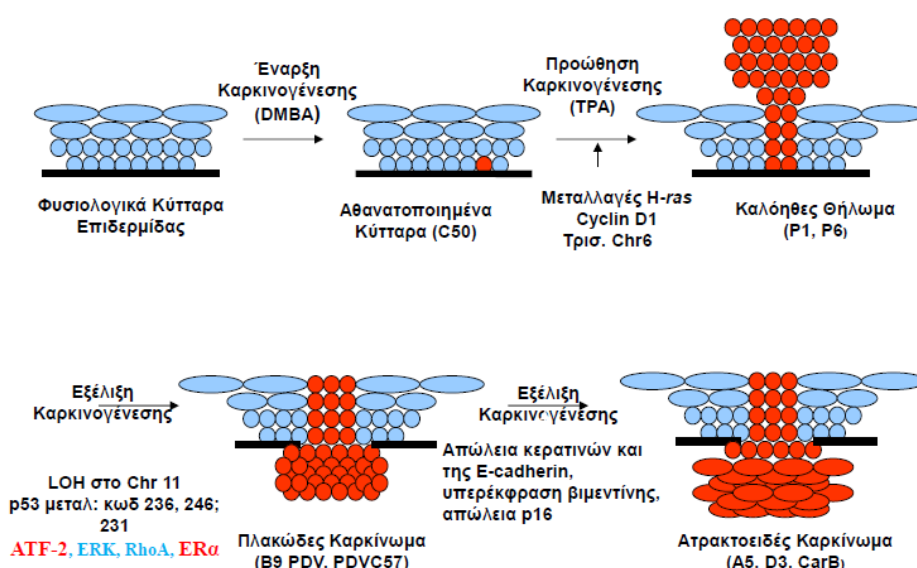
2.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

2.2.1.1 Κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν και χαρακτηριστικά τους

Για τη μελέτη των πρωτεολυτικών μηχανισμών κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές από το μοντέλο σταδιακής καρκινογένεσης της επιδερμίδας του ποντικού, το οποίο έχει προέλθει με χρήση του χημικού καρκινογόνου DMBA (polycyclic aromatic hydrocarbon 7,12-dimethylbenz[a]anthracene) και του προαγωγέα της καρκινογένεσης TPA (phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Συγκεκριμένα, η διαδικασία χημικής καρκινογένεσης έγινε σε δύο στάδια, εκ των οποίων το πρώτο περιελάμβανε τη

χορήγηση μονής δόσης DMBA (polycyclic aromatic hydrocarbon 7,12-διμεθυλο-βενζο(α)ανθρακένιο και το δεύτερο την εβδομαδιαία χορήγηση TPA (phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) (Stoler et al., 1993).

Οι κυτταρικές σειρές από το μοντέλο αυτό που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι οι C5N, P6 και A5. Η κυτταρική σειρά C5N έχει τυπική μορφολογία επιθηλιακών κυττάρων, κυβοειδές σχήμα και είναι αθανатоποιημένη. Η P6 σειρά έχει φαινότυπο θηλώματος, ενώ η A5 έχει ατρακτοειδή φαινότυπο και μεταστατικό δυναμικό. Όλες οι κυτταρικές σειρές, εκτός από τα C5N, αποκτήθηκαν από όγκους, οι οποίοι προκλήθηκαν *in vivo* με τη χορήγηση του παράγοντα DMBA, και σαν αποτέλεσμα, έχουν μεταλλαγή στο κωδικόνιο 61 του H-Ras γονιδίου. Τα A5 κύτταρα επίσης έχουν απενεργοποιημένο το μεταγραφικό παράγοντα P53 (Zoumpourlis et al., 2003).



Εικόνα 2.1 Στάδια δημιουργίας του μοντέλου σταδιακής χημικής καρκινογένεσης της επιδερμίδας του ποντικού (Zoumpourlis et al., 2003).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επίσης εμβρυικοί ινοβλάστες (mouse embryonic fibroblasts-MEFs) από ποντίκια C57BL/6 τα οποία ήταν ετερόζυγα για μια μεταλλαγή στην ριβοσωμική πρωτεΐνη RPL24 (ανήκει στη μεγάλη υπομονάδα του ριβοσώματος) με απενεργοποιημένο ή μη τον μεταγραφικό παράγοντα P53 καθώς και κύτταρα αγρίου τύπου.

Συνεπώς, στη μελέτη μας για τον παραπάνω σκοπό χρησιμοποιήσαμε τις εξής τέσσερις κυτταρικές σειρές:

- Αγρίου τύπου (wild type, WT) (p53^{+/+}, Rpl24^{+/+})
- BST (p53^{+/+}, Rpl24^{+/-})
- p53KO (p53^{-/-}, Rpl24^{+/+})
- p53KO/BST (p53^{-/-}, Rpl24^{+/-})

Τα ποντίκια με τη μεταλλαγή στη συγκεκριμένη ριβοσωμική υπομονάδα παρουσίαζαν παραμορφωμένο φαινότυπο, ο οποίος αντιστρεφόταν όταν βρισκόταν σε συνδυασμό με την αποσιώπηση του P53, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή. Οι

μητέρες θυσιάστηκαν σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα κυοφορίας και τα έμβρυα διαχωρίστηκαν από το μητρικό ιστό υπό παρατήρηση σε μικροσκόπιο (Barkic et al., 2009). Οι κυτταρικές σειρές αυτές ήταν ευγενική προσφορά από τον Καθηγητή Siniša Volarević (University of Rijeka, Croatia).



Εικόνα 2.2 Εμφάνιση των φαινοτύπων των ποντικών που φέρουν μεταλλαγή στη ριβοσωμική πρωτεΐνη RPL24 με απενεργοποιημένο ή μη τον μεταγραφικό παράγοντα P53 (Barkic et al., 2009).

2.2.1.2 Απόψυξη και ψύξη των κυτταρικών σειρών

Σύμφωνα με τους Hayflick και Moorhead (Hayflick and Moorhead, 1961), τα διάφορα κυτταρικά στελέχη μπορούν να ψυχθούν στους -196°C για μακρύ χρονικό διάστημα και αφού αποψυχθούν και επανέλθουν στους 37°C , να ανακαλλιεργηθούν και να διατηρήσουν στο ακέραιο τις ιδιότητές τους. Επίσης, έχουν τη δυνατότητα να συμπληρώσουν τον αριθμό αναδιπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού που θα συμπλήρωναν, αν δε μεσολαβούσε η ψύξη-απόψυξη.

Κατά την ψύξη των κυττάρων χρησιμοποιείται το DMSO (Dimethyl sulfoxide), το οποίο έχει κρυοπροστατευτικό ρόλο, καθώς περιορίζει τη δημιουργία κρυστάλλων, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα κατά τη διαδικασία ψύξης-απόψυξης. Η απόψυξη των κυττάρων, αντίθετα με την ψύξη που γίνεται σταδιακά, πρέπει να είναι ταχεία, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία βλαβών από τους κρυστάλλους που ενδεχομένως σχηματίζονται στα κύτταρα κατά την ψύξη.

Συνεπώς, για την απόψυξη των προσκολλώμενων κυττάρων το φιαλίδιο με τα κύτταρα τοποθετείται απευθείας από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37°C και ακολούθως, το εναιώρημα των κυττάρων προστίθεται σε φιάλη καλλιέργειας που ήδη περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό. Αφού ολοκληρωθεί η προσκόλληση των κυττάρων, την επόμενη ημέρα, το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας αντικαθίσταται με νέο, προκειμένου να απομακρυνθεί το DMSO, το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα.

Κατά την ψύξη, τα κύτταρα πρέπει να φυλαχθούν σε τέτοιες συνθήκες, ώστε να εξασφαλίζεται η μέγιστη βιωσιμότητά τους κατά την απόψυξή τους. Η συλλογή των κυττάρων γίνεται 2-3 ημέρες μετά την ανακαλλιέργειά τους, όταν δηλαδή βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και ο μεταβολισμός τους είναι πιο έντονος. Ειδικότερα, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε freezing medium (50% FBS, 40% θρεπτικό υλικό της κάθε κυτταρικής σειράς, 10% DMSO) και ακολούθως, τα κύτταρα τοποθετούνται σε αποστειρωμένα φιαλίδια πολυπροπυλενίου. Προκειμένου τα κύτταρα να προστατευτούν περαιτέρω από τις βλαβερές συνέπειες της ψύξης, πρέπει η ψύξη να είναι σταδιακή, 1h στους -20°C , η οποία ακολουθείται από 24h στους -80°C και τέλος, αποθήκευση σε δεξαμενές υγρού αζώτου στους -196°C .

2.2.1.3 Διατήρηση και ανακαλλιέργεια προσκολλώμενων κυττάρων

Οι καλλιέργειες όλων των κυτταρικών σειρών αναπτύχθηκαν σε ατμόσφαιρα CO_2 5%, υγρασία 95% και θερμοκρασία 37°C σε επωαστικό κλίβανο. Κατά την ανακαλλιέργεια, η ήδη συμπληρωμένη μονοστιβάδα κατανέμεται με κατάλληλο λόγο κατανομής (split ratio) και τα κύτταρα αναπτύσσονται, έως ότου επανασχηματίσουν νέα μονοστιβάδα και φτάσουν στο 90% κάλυψης της φλάσκας.

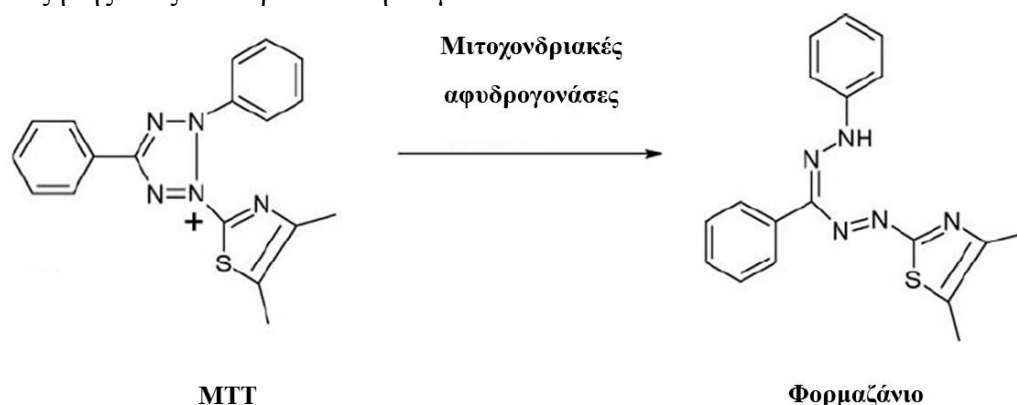
Ειδικότερα για τη διαδικασία της τρυψινοποίησης, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και τα κύτταρα εκπλένονται με διάλυμα PBS, ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ορού που περιέχουν αναστολείς της τρυψίνης. Τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα τρυψίνης/PBS 1x στους 37°C (για τις κυτταρικές σειρές C5N και P6 χρησιμοποιείται διάλυμα τρυψίνης/PBS 2x), έως ότου συρρικνωθούν και στρογγυλοποιηθούν. Το διάλυμα αυτό διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων, τόσο μεταξύ τους όσο και με το στερεό τους υπόστρωμα. Ακολούθως, η αποκόλληση των κυττάρων γίνεται με ήπια μηχανική ανατάραξη της φιάλης καλλιέργειας και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε νέο θρεπτικό υλικό παρουσία ορού με επανειλημμένες ήπιες αναρροφήσεις και μοιράζονται σε νέες φιάλες με λόγο κατανομής 1:2 όσον αναφορά στους ινοβλάστες και 1:6 όσο αναφορά στα κύτταρα του μοντέλου της σταδιακής καρκινογένεσης της επιδερμίδας ποντικού.

2.2.1.4 Επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία καλλιέργειας

Προκειμένου να επιστρωθούν τα κύτταρα σε τρυβλία καλλιέργειας, πραγματοποιείται καταμέτρησή τους σε πλάκα Neubauer. Συγκεκριμένα, αφού συλλεχθούν τα κύτταρα από τη φιάλη καλλιέργειας, λαμβάνει χώρα φυγοκέντρωση για 5' στις 1.500 rpm. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο πλήρους θρεπτικού υλικού. Η καταμέτρηση που ακολουθεί γίνεται με αραιώση μικρού όγκου του επαναιωρήματος στη χρωστική Trypan Blue, η οποία επιτρέπει το διαχωρισμό των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα, καθώς τα τελευταία προσλαμβάνουν την εν λόγω χρωστική και χρωματίζονται μπλε.

2.2.2 Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη δοκιμασία MTT

Η δοκιμασία MTT βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών και άρα μεταβολικά ενεργών κυττάρων να ανάγουν το υδατοδιαλυτό άλας του τετραζολίου MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl Blue], με αποτέλεσμα την παραγωγή ιωδών κρυστάλλων φορμαζανίου (Denizot and Lang, 1986). Η αναγωγή του τετραζολίου προς το αδιάλυτο φορμαζάνιο προκαλείται από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσεις των ζωντανών κυττάρων. Οι κρύσταλλοι φορμαζανίου είναι δυνατό να διαλυτοποιηθούν παρουσία ισοπροπανόλης, DMSO ή άλλων οργανικών διαλυτών και έτσι, προκύπτει ένα έγχρωμο προϊόν, του οποίου η απορρόφηση μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά. Η μετρούμενη απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του έγχρωμου προϊόντος και συνεπώς της μεταβολικής ενεργότητας των κυττάρων. Επομένως, όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση που καταγράφεται σε μήκος κύματος 500-600 nm, τόσο πιο έντονος είναι ο σχηματισμός των κρυστάλλων τετραζολίου και τόσο μεγαλύτερος ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων. Συνεπώς, η δοκιμασία MTT αντανακλά άμεσα τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και κατ' επέκταση, τη βιωσιμότητα και το ρυθμό αύξησης ενός κυτταρικού πληθυσμού.



Εικόνα 2.3 Αναγωγή του MTT σε φορμαζάνιο από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσεις των ζωντανών κυττάρων.

Για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας αυτής, αρχικά γίνεται η επίστρωση των κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό υλικό σε πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων. Όταν τα κύτταρα καλύψουν την επιφάνεια της θέσης, αφαιρείται το αρχικό υλικό και τα κύτταρα επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C με τον παράγοντα επίδρασης στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Με το πέρας της επώασης, αφαιρείται το υλικό από τα κύτταρα και προστίθεται σε αυτά MTT διαλυμένο σε θρεπτικό μέσο απουσία της χρωστικής ερυθρό της φαινόλης σε συγκέντρωση 1 mg/ml. Μετά από 3-4 h αφαιρείται το διάλυμα MTT και προστίθεται ισοπροπανόλη, προκειμένου να διαλυτοποιηθούν οι κρύσταλλοι φορμαζανίου που έχουν σχηματιστεί στα ζωντανά κύτταρα. Τέλος, εκτιμάται ποσοτικά η συγκέντρωση του έγχρωμου προϊόντος με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος απορρόφησης 570 nm. Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, από όλες τις τιμές που έχουν προκύψει από τη φωτομέτρηση για

κάθε θέση, αφαιρείται η τιμή από τη μέτρηση της θέσης-τυφλού που περιέχει τον οργανικό διαλύτη.

2.2.3 Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford (Bradford, 1976) αποτελεί μια φασματική αναλυτική διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης ενός πρωτεϊνικού διαλύματος. Βασίζεται στην αλλαγή του μέγιστου της απορρόφησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 από τα 465 στα 595 nm. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υπό όξινες συνθήκες η κόκκινη μορφή της χρωστικής μετατρέπεται στην μπλε μορφή συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη του προς προσδιορισμό διαλύματος. Αρχικά, λαμβάνει χώρα δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία κατασκευάζεται από γνωστές διαδοχικές συγκεντρώσεις αλβουμίνης ορού βοός (bovine serum albumin, BSA). Για κάθε δείγμα άγνωστης πρωτεΐνης απαιτείται τελικός όγκος 1 ml. Σε κάθε σωληνάριο τύπου eppendorf τοποθετούνται 200 μ l διαλύματος Bradford (5X), 800 μ l απιονισμένου ύδατος και 1 μ l αγνώστου δείγματος. Σε κάθε μέτρηση απαιτείται και η δημιουργία ενός δείγματος μάρτυρα (τυφλό). Σε αυτή την περίπτωση αντί για δείγμα, προστίθεται 1 μ l από τον διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένες οι πρωτεΐνες.

2.2.4 Καταγραφή των ενζυμικών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων

Για τη μελέτη της ενεργότητας του πρωτεασώματος καταγράφονται οι ενεργότητες της χυμοθρυψίνης (εντοπίζεται στην υπομονάδα $\beta 5$) και της κασπάσης (εντοπίζεται στην υπομονάδα $\beta 1$) με τη χρήση ειδικών φθοροπεπτιδίων (Sklirou et al., 2015). Καθένα από τα φθοροπεπτίδια αναγνωρίζεται ειδικά από μία και μόνο πρωτεασωμική υπομονάδα, πρωτεολύεται από αυτή βάσει της ενεργότητάς της και ως εκ τούτου εκπέμπεται το αντίστοιχο σήμα φθορισμού. Συγκεκριμένα, για την ενεργότητα χυμοθρυψίνης χρησιμοποιήθηκε το φθοροπεπτίδιο CT-L (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC-LLVY, για συντομία LLVY), ενώ για την ενεργότητα κασπάσης το φθοροπεπτίδιο C-L (Z-Leu-Leu-Glu-AMC-LLE, για συντομία LLE).

Το πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία. Αφού προσκολληθούν, αφαιρείται το αρχικό θρεπτικό υλικό και, εάν είναι απαραίτητο, επωάζονται για το επιθυμητό χρονικό διάστημα με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις του υπό μελέτη παράγοντα επίδρασης διαλυμένου στο πλήρες θρεπτικό υλικό της σειράς. Με το πέρας της επώασης, αναρροφάται το υλικό, εκπλένονται τα κύτταρα με PBS, τρυψινοποιούνται, συλλέγονται σε σωλήνα φυγοκέντρωσης και φυγοκεντρούνται για 5 min σε 1.500 rpm. Αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο, τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε PBS και φυγοκεντρούνται εκ νέου. Κατόπιν, αναρροφάται το υπερκείμενο, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με το διάλυμα λύσης 26S [0,2% (v/v) Nonidet P-40, 5 mM ATP, 10% (v/v) γλυκερόλη, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6] για 30 min στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση.

Με το πέρας της επώασης, πραγματοποιείται φυγοκέντρωση σε 4°C και 13.300 rpm για 15 min, προκειμένου να συλλεχθούν οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο υπερκείμενο, οι οποίες και ποσοτικοποιούνται με τη μέθοδο Bradford, όπως αυτή περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.3. Ακολούθως, 20 µg του κάθε δείγματος επωάζονται ξεχωριστά με τα φθοροπεπτίδια LLVY και LLE διαλυμένα στο διάλυμα αντίδρασης (100 mM Hepes buffer pH 7,3) με τελική συγκέντρωση αντίδρασης 50 µM έκαστο. Το κάθε φθοροπεπτίδιο έχει το δικό του τυφλό δείγμα, το οποίο περιέχει επίσης διάλυμα λύσης 26S και διάλυμα αντίδρασης απουσία πρωτεΐνης.

Η επώαση διαρκεί μισή ώρα στους 37°C σε σκοτάδι. Μετά τα 30 min επώασης, προστίθεται κρύο διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (30 mM CH₃COONa, 70 mM CH₃COOH, 100 mM ClCH₂COONa, pH 4,3) και μετράται ο φθορισμός με φίλτρο διέγερσης στα 360 nm και φίλτρο εκπομπής στα 440 nm (φθορισμόμετρο VersaFluor™ Fluorometer System, Biorad).

2.2.5 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των καθεψινών B και L του λυσοσώματος

Για την καταγραφή της ενεργότητας των καθεψινών, κύτταρα που είχαν επιστρωθεί σε τρυβλία, συλλέγονται, φυγοκεντρώνονται για 10 min σε 1.500 rpm, επαναδιαλυτοποιούνται σε 1 mL PBS και μεταφέρονται σε φιαλίδιο φυγοκέντρωσης, οπότε το διάλυμα φυγοκεντρείται για 5' σε 3.000 rpm και αφαιρείται το υπερκείμενο. Κατόπιν προστίθεται στο ίζημα η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος λύσης λυσοσωμάτων (1 mM DTT, 50 mM Tris-HCl pH 4,0). Προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη λύση, το λύμα παραμένει στον πάγο για 10 min, ανακινείται και τέλος εμβαπτίζεται σε υγρό άζωτο. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για άλλες δύο φορές και ακολούθως το λύμα φυγοκεντρείται για 15 min σε 13.300 rpm σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C). Ακολούθως, συλλέγεται το υπερκείμενο και προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του σε πρωτεΐνες με τη μέθοδο Bradford. Έπειτα, 20 µg του κάθε δείγματος επωάζονται με ειδικό φθοροπεπτίδιο σε διάλυμα ενεργότητας λυσοσώματος (50 mM CH₃COONa, 8 mM L-Cysteine Hydrochloride, 1 mM EDTA pH 4,0 για 30 min στους 37°C σε σκοτάδι. Τέλος, στο κάθε διάλυμα προστίθεται 1 mL dH₂O και γίνεται μέτρηση του φθορισμού του με φίλτρο διέγερσης στα 360 nm και φίλτρο εκπομπής στα 440 nm (φθορισμόμετρο VersaFluor™ Fluorometer System, Biorad). Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της ενεργότητας των καθεψινών του λυσοσώματος.

2.2.6 Μέτρηση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου

Για την πραγματοποίηση της μέτρησης των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), ακολουθείται η διαδικασία τρυψινοποίησης, επαναδιάλυση των κυττάρων σε PBS και φυγοκέντρωση (1.500 rpm, 5 min), ενώ στη συνέχεια, προστίθενται στα κύτταρα ο ειδικός ιχνηθέτης CM-H₂DCFDA που φθορίζει παρουσία ROS σε συγκέντρωση 10 µM σε PBS, γίνεται καλή ανάδευση και επώαση για 30 min σε σκοτάδι στους 37°C. Με το τέλος της επώασης, αφαιρείται η χρωστική και ακολουθεί επώαση για 15 min

με PBS. Τα δείγματα εκπλένονται δύο φορές με PBS και ομογενοποιούνται με διάλυμα λύσης NP-40. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (13.300 rpm, 15 min, 4°C), συλλογή υπερκείμενου και ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τέλος, προστίθεται dH₂O και καταγράφεται ο εκπεμπόμενος φθορισμός με τη χρήση ειδικού φθορισμόμετρου. Τα φίλτρα που χρησιμοποιούνται έχουν κύματος διέγερσης (Excitation) 490 nm και μήκος κύματος εκπομπής (Emission) 520 nm. Η κανονικοποίηση πραγματοποιείται ως προς την ολική ποσότητα πρωτεΐνης.

2.2.7 Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης

2.2.7.1 Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση ολικού RNA τα κύτταρα της εκάστοτε κυτταρικής σειράς επιστρώνονται σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm. Κατόπιν, τρυψινοποιούνται και φυγοκεντρούνται για 5 min σε 1.500 rpm. Έπειτα, αναρροφάται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml RNAiso Plus, το οποίο λύει τα κύτταρα. Το λύμα παραμένει για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου, αναμιγνύεται με 0,2 mL χλωροφορμίου και μετά διατηρείται για άλλα 5 min σε θερμοκρασία δωματίου, προτού φυγοκεντρηθεί για 15 min στους 4°C και σε 12.000 g. Αποτέλεσμα της φυγοκέντρωσης είναι ο διαχωρισμός των συστατικών του φιαλιδίου φυγοκέντρωσης σε τρία στρώματα. Το πάνω στρώμα, που αποτελείται από το ολικό RNA, συλλέγεται σε νέο φιαλίδιο φυγοκέντρωσης, αναμιγνύεται με 0,5 mL ισοπροπανόλης και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Ακολούθως, φυγοκεντρείται για 10 min στους 4°C και σε 12.000 g, οπότε το RNA καθιζάνει ως ίζημα. Κατόπιν αφαιρείται το υπερκείμενο, το RNA επαναδιαλυτοποιείται σε 1 mL αιθανόλης 75% και φυγοκεντρείται ακόμα μία φορά για 5 min στους 4°C και σε 7.500 g προκειμένου να καθαριστεί. Ως τελευταίο βήμα της απομόνωσης, και αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλυτοποιείται σε όγκο dH₂O ανάλογο της ποσότητας του RNA. Το διαλυμένο στο dH₂O RNA φυλάσσεται στους -80°C. Όσον αφορά στην ποσοτικοποίηση του RNA, λαμβάνει χώρα φωτομέτρησή του σε μήκος κύματος 260 και 280 nm, έτσι ώστε να προσδιορισθεί τόσο η συγκέντρωσή του όσο και η καθαρότητά του, η οποία εκφράζεται από το λόγο της οπτικής του πυκνότητας στα 260 nm προς την οπτική του πυκνότητα στα 280 nm.

2.2.7.2 Σύνθεση cDNA

Για τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιήθηκε 1 μg RNA από το κάθε δείγμα. Συγκεκριμένα για μια αντίδραση σύνθεσης τελικού όγκου 10 μl αναμειγνύονται σε φιαλίδιο των 0,2 μL:

- 2 μl του μίγματος αντίδρασης 5x (cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR, ABM).
- 1 μl ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης
- όγκος RNA που αντιστοιχεί σε 1 μg RNA και
- dH₂O.

Τα βήματα της σύνθεσης έχουν ως ακολούθως: 5 min στους 25°C, 30 min στους 42°C, 5 min στους 85°C, συντήρηση στους 4°C. Εν τέλει, το cDNA αραιώνεται σε dH₂O σε αναλογία 1:4 και φυλάσσεται στους -20°C.

2.2.7.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Για μια αντίδραση σύνθεσης τελικού όγκου 10 µl αναμειγνύονται:

- 5 µl μίγματος αντίδρασης (2x) (Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix)
- Forward εκκινητής (τελική συγκέντρωση 0,3 µM)
- Reverse εκκινητής (τελική συγκέντρωση 0,3 µM)
- dH₂O
- 1 µl cDNA.

Για τη διεξαγωγή της αντίδρασης, το 96-well-plate εισάγεται στο μηχάνημα Piko Real Time (ThermoFisher Scientific), και τα στάδια του προγράμματος που χρησιμοποιούνται είναι τα ακόλουθα: 1) θερμοκρασία προθέρμανσης 95°C για 10 min, 2) θερμοκρασία ξεδιπλώματος των δύο κλώνων 95°C για 15 sec, 3) θερμοκρασία σύνδεσης εναρκτηρίων τμημάτων σε κάθε αλυσίδα των δύο κλώνων 60°C για 30 sec, 4) θερμοκρασία επιμήκυνσης 72°C για 30 sec, 5) καμπύλη τήξεως 58-95°C και 6) λήξη αντίδρασης 20°C για 10 sec. Τα βήματα 2-5 γίνονται σε 40 κύκλους.

2.2.8 SDS-PAGE-Ανοσοαποτύπωμα Western

Το ανοσοαποτύπωμα Western χρησιμοποιείται προκειμένου να επιτευχθεί η ανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Μετά το διαχωρισμό των πρωτεϊνών του δείγματος με ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η οποία επωάζεται με ειδικά αντισώματα. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι ειδικό για την υπό μελέτη πρωτεΐνη, ενώ το δευτερογενές είναι ειδικό για το είδος ξενιστή του πρωτογενούς αντισώματος. Συχνά, το δευτερογενές αντίσωμα σημαίνεται με τη χρήση χημειοφωταύγειας ή ραδιενέργειας. Στην περίπτωση της χημειοφωταύγειας, το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με ένζυμο που καταλύει ένα χρωμογόνο υπόστρωμα. Το φως που παράγεται ως παραπροϊόν της κατάλυσης καταγράφεται σε φωτοευαίσθητο φιλμ.

2.2.8.1 Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης κυττάρων

Το πρώτο βήμα για τη διεξαγωγή του ανοσοαποτυπώματος Western είναι η απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης των κυττάρων. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία και την επόμενη μέρα μπορούν να επωαστούν με τον επιθυμητό παράγοντα επίδρασης. Μετά την επώαση, τα κύτταρα τρυψινοποιούνται, συλλέγονται και φυγοκεντρούνται για 5 min σε 1.500 rpm και το ίζημα τους επαναιωρείται σε 1 mL PBS. Ακολούθως, γίνεται φυγοκέντρωση για 5 min σε 1.500 rpm και στο ίζημα των

κυττάρων προστίθεται διάλυμα λύσης NP-40, στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών. Για να επιτευχθεί καλύτερη λύση των κυττάρων αφήνονται για 30 min στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση και ακολούθως φυγοκεντρώνται (4°C, 15 min, 13.300 rpm). Έτσι, διαχωρίζονται οι πρωτεΐνες από τα υπόλοιπα κυτταρικά υπολείμματα και συστατικά, παραμένοντας στο υπερκείμενο, το οποίο συλλέγεται. Τέλος, λαμβάνει χώρα ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου του υπερκειμένου με τη μέθοδο Bradford και φυλάσσεται στους -80°C.

2.2.8.2 Προετοιμασία των δειγμάτων και αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS

Το επόμενο βήμα της διαδικασίας είναι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε ομοιογενές πήκτωμα ακρυλαμίδης (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Η βασική αρχή της ηλεκτροφόρησης βασίζεται στο γεγονός ότι φορτισμένα μόρια, όπως οι πρωτεΐνες, μπορούν να διαχωριστούν με βάση το μέγεθός τους, εάν εξαιτίας ενός ηλεκτρικού πεδίου αναγκασθούν να κινηθούν διαμέσου ενός πηκτώματος. Για να είναι εφικτό κάτι τέτοιο, οι πρωτεΐνες των δειγμάτων αναμειγνύονται σε αναλογία 1:1 με διάλυμα Laemmli (2x) (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% (v/v) 10% SDS, 20% (v/v) γλυκερόλη, 10% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,597 mM μπλέ της βρωμοφαινόλης).

Παρουσία του ισχυρού απορρυπαντικού δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (SDS) και της αναγωγικής β-μερκαπτοαιθανόλης, η οποία ανάγει δισουλφιδικούς δεσμούς, οι πρωτεΐνες ως επί το πλείστον χάνουν όλες τις ανώτερες δομές τους παραμένοντας μόνο με την πρωτοταγή. Μάλιστα, προκειμένου να επαχθεί περαιτέρω η αποδιάταξη των πρωτεϊνών, τα δείγματα αφού αναμειχθούν με το διάλυμα Laemmli, θερμαίνονται στους 95°C για 4-5 min. Τέλος, το SDS καλύπτει ομοιόμορφα τις πρωτεΐνες προσδίδοντάς τους αρνητικό φορτίο. Συνεπώς, μόλις οι πρωτεΐνες «φορτωθούν» στο πήκτωμα και βρεθούν εντός του ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται διαμέσου του πηκτώματος από τον αρνητικό (κάθοδος) προς το θετικό πόλο (άνοδος).

Αφού παρασκευαστούν τα πηκτώματα επιστοίβαξης και διαχωρισμού, τα δείγματα τοποθετούνται σε εσοχές/πηγαδάκια του πηκτώματος επιστοίβαξης, έτσι ώστε σε κάθε πηγαδάκι να υπάρχουν 30 μg πρωτεΐνης. Επίσης, σε μια από τις θέσεις αυτές προστίθενται πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστών μοριακών βαρών. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή τάση 120 Volt για περίπου 2 h σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (25 mM Tris-HCl, 192 mM γλυκίνη) παρουσία 0,1% (w/v) SDS.

2.2.8.3 Μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα ακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Αφού ολοκληρωθεί η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS, οι πρωτεΐνες που ηλεκτροφορήθηκαν μεταφέρονται από το πήκτωμα ακρυλαμίδης σε μεμβράνη

νιτροκυτταρίνης με μέγεθος πόρου 0,45 μm σε κατάλληλη συσκευή με διάλυμα μεταφοράς (50 mM Tris-HCl, 40 mM γλυκίνη, 20% (v/v) μεθανόλη).

Η μεταφορά γίνεται με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο αναγκάζει τις αρνητικά φορτισμένες λόγω του SDS πρωτεΐνες να κινηθούν από τον αρνητικό (μαύρο) προς το θετικό (κόκκινο) πόλο. Έτσι, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που βρίσκεται σε επαφή με αυτό, ενώ η κίνησή τους εκτός της μεμβράνης εμποδίζεται από τα χαρτιά Whatman και τα σφουγγάρια της κατασκευής.

2.2.8.4 Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών

Μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ακολουθεί ανοσοεντοπισμός των υπό μελέτη πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

Αρχικά, η μεμβράνη εμβαπτίζεται για 1 h υπό συνεχή ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα κάλυψης (5% γάλα σε TBS-T), προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων. Η σύσταση του TBS-T είναι 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20.

Κατόπιν, η μεμβράνη επώάζεται με το πρωτογενές αντίσωμα για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα είναι διαλυμένο στο διάλυμα κάλυψης στη συγκέντρωση που προτείνεται από τον κατασκευαστή. Με το πέρας της επώασης, γίνονται τρεις εκπλύσεις των 10 min της μεμβράνης με διάλυμα TBS-T, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος. Έπειτα, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανιού. Ακολουθούν άλλες τρεις εκπλύσεις με διάλυμα TBS-T όπως και προηγουμένως.

Σε επόμενο βήμα της διαδικασίας προστίθεται στη μεμβράνη το διάλυμα Clarity™ Western ECL Substrate, το οποίο περιέχει δύο αντιδραστήρια: το A και το B. Συγκεκριμένα, το A αντιδραστήριο περιέχει υπεροξείδιο του υδρογόνου (υπόστρωμα για το ένζυμο υπεροξειδάση του ραπανιού) και το B περιέχει λουμινόλη και έναν ενισχυτή χημειοφωταύγειας. Τα δύο αντιδραστήρια αναμειγνύονται σε ίσους όγκους και απλώνονται στην επιφάνεια της μεμβράνης για 5 min. Η μεμβράνη στεγνώνεται ελαφρώς από το ECL και τοποθετείται σε ειδική κασετίνα καλυμμένη με μια λεπτή διαφανή μεμβράνη. Τέλος, λαμβάνει χώρα άμεση έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ ακτίνων X σε σκοτεινό θάλαμο.

Η εμφάνιση του φιλμ γίνεται με μεταφορά του σε διάλυμα εμφάνισης (Developer), ξέπλυμα σε H_2O βρύσης και μονιμοποίηση σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer). Τέλος, το φιλμ ξεπλένεται πολύ καλά με H_2O βρύσης. Ως πρωτεΐνη αναφοράς στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GAPDH.

2.2.8.5 Αποδέσμευση των αντισωμάτων από τη μεμβράνη

Για τη διαδικασία της απομάκρυνσης των αντισωμάτων, η μεμβράνη αρχικά εκπλένεται με TBS-T και στη συνέχεια, επώάζεται με το διάλυμα απομάκρυνσης των

αντισωμάτων (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% (v/v) 10% SDS, 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη) επί 40 min στους 56°C υπό συνεχή ήπια ανάδευση. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις με TBS-T συνολικής διάρκειας 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να απομακρυνθούν το απορρυπαντικό SDS και το ισχυρό αναγωγικό μέσο β-μερκαπτοαιθανόλη. Έπειτα, μπορεί να πραγματοποιηθεί νέα διαδικασία ανοσοεντοπισμού ξεκινώντας από το στάδιο επώασης με άπαχο γάλα 5% (w/v) σε TBS-T για 1 h.

2.2.8.6 Απομόνωση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων

Για την απομόνωση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Moriya et al., 2014) και την μετέπειτα ανάλυσή τους πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με ειδικό διάλυμα (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2% Triton X-100, pH 7,8 συμπεριλαμβανομένων των αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών). Το λύμα φυγοκεντρήθηκε στα 12.000 g για 30 min στους 4°C. Το υπερκείμενο το οποίο προέκυψε συλλέχθηκε ως το διαλυτό τμήμα και το ίζημα το οποίο περιείχε τις αδιάλυτες πρωτεΐνες διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα λύσης (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2% SDS, pH 7,8) και μεταφέρθηκε σε συσκευή υπερήχων για 30 sec. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση και ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρθηκε προηγουμένως.

2.2.8.7 Ανίχνευση οξειδωμένων πρωτεϊνών

Η ανίχνευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με το OxyBlot® Kit. Το kit αυτό ανιχνεύει καρβονυλικές ομάδες που αποκτούν οι πρωτεΐνες μετά την οξείδωσή τους. Πιο αναλυτικά, οι καρβονυλομάδες στις πλευρικές αλυσίδες των οξειδωμένων πρωτεϊνών αντιδρούν με το 2,4-δινιτροφαινυλοϋδραζίνη (DNPH) δίνοντας το προϊόν 2,4-δινιτροφαινυλοϋδραζόνη (DNP). Οι τροποποιημένες αυτές πρωτεΐνες ανιχνεύονται μέσω ειδικού αντισώματος (anti-DNP) με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωματος Western. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένη ποσότητα πρωτεΐνης, έστω σε X όγκο και προστέθηκε ίσος όγκος (X) SDS 12%, για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Έπειτα προστέθηκε 2 X όγκος 10x 2,4 δινιτροφαινυλοϋδραζίνης (DNPH). Πραγματοποιήθηκε επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την επώαση προκύπτουν τα παράγωγα των πρωτεϊνών, τα οποία θα ανιχνευτούν αργότερα από το ειδικό αντίσωμα. Προστέθηκε 1,5 X όγκος διαλύματος εξουδετέρωσης για τη διακοπή της αντίδρασης και τέλος, προστέθηκε 5% β-μερκαπτοαιθανόλη για την εκτεταμένη αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Τα υπόλοιπα στάδια ανάλυσης των πρωτεϊνών είναι ίδια με τα αντίστοιχα της ανάλυσης με ανοσοαποτύπωμα Western.

2.2.8.8 Ποσοτικοποίηση των ζωνών εντόπισης των πρωτεϊνών

Για την ποσοτικοποίηση των ζωνών εντόπισης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ανοικτού κώδικα ImageJ.

2.2.9 Ανοσοφθορισμός

Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας αυτής, αρχικά γίνεται η επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία τα οποία περιείχαν αποστειρωμένες καλυπτρίδες. Όταν τα κύτταρα κάλυψαν την επιφάνεια θέσης μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα φορμαλδεΰδης (4%) σε θερμοκρασία δωματίου και αφού πλύθηκαν με διάλυμα πλύσης PBS, υπέστησαν επεξεργασία με 0,2% Triton X-100, ώστε να γίνουν διαπερατά. Για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων τα κύτταρα προστέθηκαν σε διάλυμα blocking (3% BSA σε PBS) για 30 min και στη συνέχεια επωάστηκαν με το πρωτογενές αντίσωμα για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, τα δείγματα εκπλύθηκαν πάλι με PBS και επωάστηκαν με το δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα για 1 h σε σκοτεινό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου. Για τον εντοπισμό των ορίων των κυττάρων χρησιμοποιείται η χρωστική DAPI που προσδένεται στο DNA και σημαίνει τους πυρήνες. Τα δείγματα ξεπλύθηκαν και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες παρατήρησης με τη χρήση διαλύματος τοποθέτησης Mowiol 40-88. Τα δείγματα τέλος παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης [Digital Eclipse C1 (Nikon, Melville, NY), Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)] και οι εικόνες που λήφθηκαν αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Fiji ImageJ.

2.2.10 Ανίχνευση βλαβών στο DNA

2.2.10.1 Comet assay (single cell gel electrophoresis, SCGE)

Για την ανίχνευση βλαβών στο γενετικό υλικό χρησιμοποιήθηκε το Comet SCGE (single cell gel electrophoresis) assay kit σύμφωνα με της οδηγίες του κατασκευαστή. Το Comet assay αποτελεί τεχνική μικροηλεκτροφόρησης για την ανίχνευση του κερματισμένου DNA σε απομονωμένα κύτταρα. Ονομάζεται έτσι λόγω του χαρακτηριστικού σχήματος που παρατηρείται, σε περίπτωση μεγάλης έκτασης βλάβης, κατά την έξοδο του κερματισμένου DNA από τον πυρήνα και το κύτταρο και τη μετακίνησή του προς την άνοδο. Ο κομήτης που παρατηρείται κατά την ανάλυση της εικόνας αποτελείται από κεφαλή και ουρά. Η περιοχή της κεφαλής αντιπροσωπεύει το DNA που δε μεταναστεύει έξω από τον πυρήνα, ενώ στην ουρά βρίσκονται θραύσματα του DNA που εξέρχονται από τον πυρήνα και το κυτταρικό σώμα. Στο comet assay τα απομονωμένα κύτταρα ενσωματώνονται σε λεπτή στρώση αгарόζης πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και ακολουθεί η λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια, γίνεται η ηλεκτροφόρηση σε υψηλό pH που οδηγεί σε δομές που μοιάζουν με κομήτες και τέλος, η χρώση με φθορίζουσα χρωστική και η παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού. Τα κύτταρα με αυξημένη βλάβη DNA επιδεικνύουν μια αυξημένη μετακίνηση του γενετικού υλικού στη διεύθυνση της ηλεκτροφόρησης και η μορφή τους μοιάζει με κομήτες. Η έκταση της βλάβης του DNA 'ποσοτικοποιείται' μετρώντας τη μετατόπιση του γενετικού υλικού ανάμεσα στον πυρήνα του κυττάρου και την «ουρά» που προκύπτει.

2.2.10.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της 8-υδροξυ-2'δεογυγουανოსίνης (8-OHdG)

Για την ανίχνευση της βλάβης στο γενετικό υλικό μελετήθηκε επιπλέον η συγκέντρωση της 8-υδροξυ-2'-δεογυγουανოსίνης (8-OHdG) στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές με τη χρήση του εμπορικού κιτ DNA Damage ELISA. Η 8-OHdG είναι μια τροποποιημένη αζωτούχος βάση, η οποία αποτελεί την πιο μελετημένη βάση σε περιπτώσεις βλάβης στο γενετικό υλικό και έναν από τους πιο αξιόπιστους δείκτες οξειδωτικού στρες κατά την καρκινογένεση (Valavanidis et al., 2009). Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης διαδικασίας αρχικά απομονώθηκε ολικό DNA από τα κύτταρα χρησιμοποιώντας το ειδικό εμπορικό κιτ απομόνωσης Purelink genomic DNA και ακολούθως έγινε ανίχνευση της συγκέντρωσης της 8-OHdG, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

III. Αποτελέσματα



3.1 Μελέτη των πρωτεοστατικών μηχανισμών κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης

Στο πρώτο τμήμα της παρούσας εργασίας ερευνήθηκε η εμπλοκή των πρωτεοστατικών μηχανισμών στην εξέλιξη της καρκινογένεσης στο κυτταρικό μοντέλο χημικής πολυσταδιακής καρκινογένεσης της επιδερμίδας ποντικού.

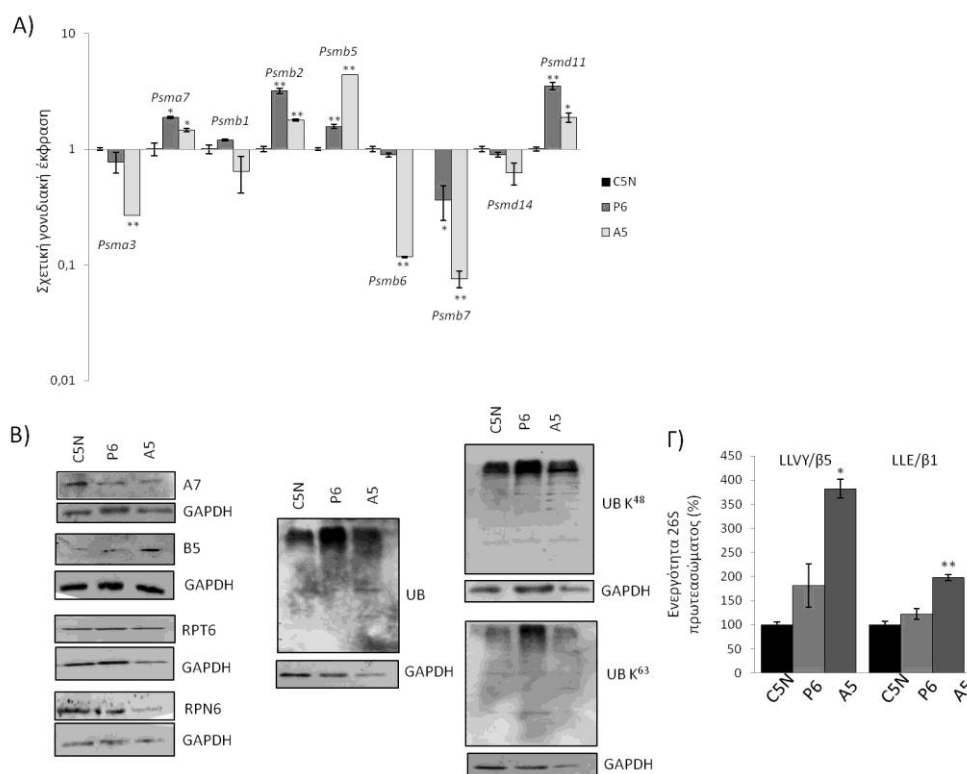
3.1.1 Επαγωγή του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος στο κυτταρικό μοντέλο χημικής καρκινογένεσης επιδερμίδας ποντικού

Αρχικά, μελετήσαμε τα βασικά επίπεδα γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων καθώς και τα επίπεδα έκφρασης των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών στις κυτταρικές σειρές C5N, P6 και A5. Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στην έκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων ανάμεσα στις κυτταρικές σειρές του μοντέλου πολυσταδιακής χημικής καρκινογένεσης. Όσον αφορά στο γονίδιο *Psmd11* που κωδικοποιεί μια υπομονάδα του πρωτεασώματος με ενεργότητα απο-ουβικιτινιλώσης, παρατηρήθηκε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης και στις δύο κυτταρικές σειρές σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες με τη μεγαλύτερη έκφραση να παρατηρείται στην κυτταρική σειρά P6. Το ίδιο πρότυπο έκφρασης παρατηρήθηκε και για τα πρωτεασωμικά γονίδια *Psmb2* και *Psma7*. Για το γονίδιο *Psmb5* διαπιστώθηκε στατιστικά μεγαλύτερη επαγωγή της έκφρασής του στην κυτταρική σειρά A5 με τον κακοήγη φαινότυπο σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, ενώ τέλος αναφορικά με τα υπόλοιπα γονίδια που εξετάστηκαν (*Psma3*, *Psmb6*, *Psmb7*) παρατηρήθηκε βαθμιαία μείωση της γονιδιακής έκφρασης με τα κύτταρα A5 να εμφανίζουν τη στατιστικά σημαντική μικρότερη έκφραση (Εικ. 3.1Α).

Ομοίως με τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων, παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές και στην πρωτεϊνική έκφραση μεταξύ των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών. Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων B5 και RPT6 στα κακοήγη κύτταρα A5 σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές. Αντίθετα, όσον αναφορά στην υπομονάδα A7 διαπιστώθηκε μεγαλύτερη έκφραση στα κύτταρα μάρτυρες C5N. Αναφορικά με το σύνολο των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών καθώς και με τις ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες όπου τα μόρια ουβικιτίνης έχουν συνδεθεί μεταξύ τους στο κατάλοιπο λυσίνη-48 (K-48), τροποποίηση που αφορά στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μέσω του πρωτεασώματος, βρέθηκε ότι τα κύτταρα A5 με τον κακοήγη φαινότυπο παρουσιάζουν τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης. Σχετικά με τις ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες όπου τα μόρια ουβικιτίνης έχουν συνδεθεί μεταξύ τους στο κατάλοιπο λυσίνη-63 (K-63) και η τροποποίηση αυτή αφορά στην ανεξάρτητη του πρωτεασώματος αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μέσω αυτοφαγίας διαπιστώθηκε ότι μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης παρουσιάζει η σειρά P6 (Εικ. 3.1Β).

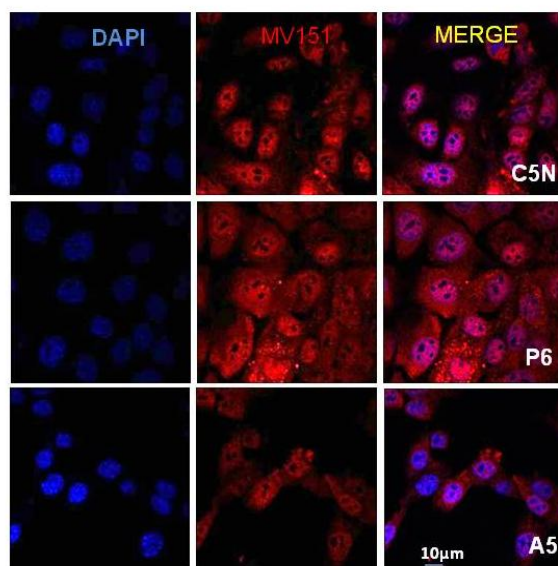
Παράλληλα, εξετάστηκε εάν μεταβάλλεται η ενεργότητα του πρωτεασώματος στα διάφορα στάδια της χημικής καρκινογένεσης στο κυτταρικό μοντέλο ποντικού και

βρέθηκε μια σταδιακή τάση για αύξηση των δύο ενζυμικών ενεργοτήτων χυμοθρυψίνης και κασπάσης κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης στο υπό μελέτη κυτταρικό μοντέλο. Πιο συγκεκριμένα, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση και για τις δύο ενζυμικές ενεργότητες του πρωτεασώματος για την κυτταρική σειρά A5, η οποία προέρχεται από ατρακτοειδές καρκίνωμα, σε σχέση με τα αθανатоποιημένα κύτταρα, τα οποία χρησιμοποιούνται ως κύτταρα μάρτυρες (Εικ. 3.1Γ).



Εικόνα 3.1. Α) Σχετική γονιδιακή έκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων στις κυτταρικές σειρές C5N, P6 και A5. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *Actin*. Β) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων και των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Γ) Μέτρηση των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων χυμοθρυψίνης (LLVY) και κασπάσης (LLE). Οι μπάρες των σφαλμάτων $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$. Η στατιστική ανάλυση και σύγκριση έγινε ως προς τα C5N κύτταρα.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μελέτη ολόκληρων των πρωτεασωμάτων με τη σήμανση ζωντανών κυττάρων του μοντέλου της πολυσταδιακής χημικής καρκινογένεσης ποντικού με τον φθορίζοντα πρωτεασωμικό ιχνηθέτη MV151, ο οποίος στοχεύει όλες τις ενεργές υπομονάδες του πρωτεασώματος. Όπως διακρίνεται στην (Εικ. 3.2), στη σειρά P6 με τον καλοήγη φαινότυπο παρουσιάζεται ο εντονότερος εντοπισμός των πρωτεασωμικών υπομονάδων.



Εικόνα 3.2 Αντιπροσωπευτικές εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου ζωντανά κύτταρα επωάστηκαν με τον φθορίζοντα πρωτεασωμικό ιχνηθέτη MVI51 (κόκκινο), μονιμοποιήθηκαν και ακολούθως πραγματοποιήθηκε διαφορική χρώση με DAPI (μπλε).

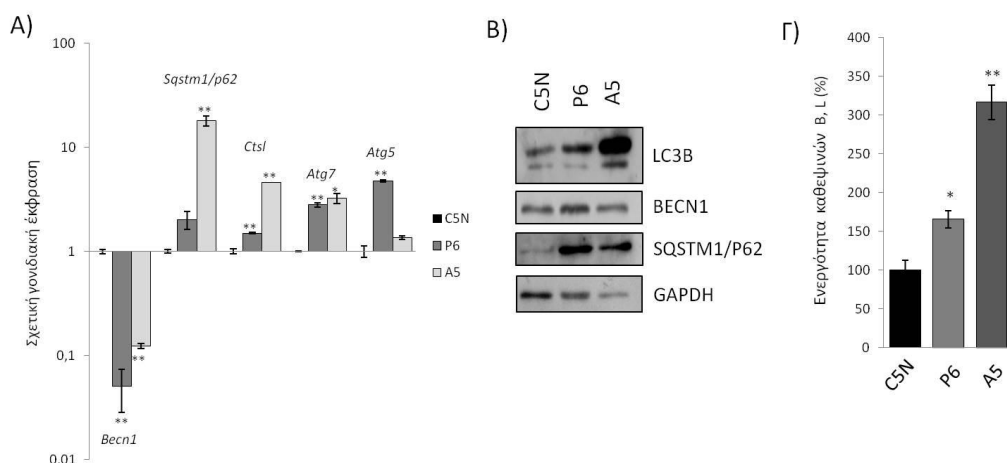
3.1.2 Επαγωγή του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσοσώματος στο κυτταρικό μοντέλο χημικής καρκινογένεσης επιδερμίδας ποντικού

Ακολούθως, μελετήθηκε ο δεύτερος κύριος πρωτεολυτικός μηχανισμός του κυττάρου, το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος. Από τη σύγκριση των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι αυτό διαπιστώθηκε ότι για όλα τα υπό μελέτη γονίδια παρατηρείται στατιστικά σημαντική αύξηση στις κυτταρικές σειρές P6 και A5 συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες με εξαίρεση το γονίδιο *Becn1*, που εμφανίζει στατιστικά σημαντική μείωση και στις δύο κυτταρικές σειρές. Ενδιαφέρον εμφανίζουν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Sqstm1/p62*, όπου στην κυτταρική σειρά A5 με τον κακοήγη φαινότυπο, είναι σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τα αθανатоποιημένα κύτταρα μάρτυρες (**Εικ. 3.3A**).

Έπειτα, προχωρήσαμε σε ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεϊνών P62 και BECN1 αλλά και της μεμβρανικής πρωτεΐνης του αυτοφαγοσώματος LC3B. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι υπάρχει μια γενικότερη επαγωγή της αυτοφαγίας κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης στο υπό μελέτη κυτταρικό μοντέλο. Πιο συγκεκριμένα, όσον αναφορά στην πρωτεΐνη P62, τα αποτελέσματά μας βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά της γονιδιακής έκφρασης, με τη σειρά A5 να εμφανίζει ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, σύμφωνα με το ανασοαποτύπωμα Western (**Εικ. 3.3B**). Αντίστοιχα αποτελέσματα για την πρωτεΐνη P62 παρατηρήσαμε και μέσω ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης (**Εικ. 3.4B**). Σε αντίθεση με τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, για την πρωτεΐνη BECN1, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασής της στις κυτταρικές σειρές P6 και A5 συγκριτικά με τα κύτταρα μάρτυρες (**Εικ. 3.3B**). Τέλος, σχετικά με την πρωτεΐνη LC3B, η οποία εμφανίζεται σε δύο ισόμορφες,

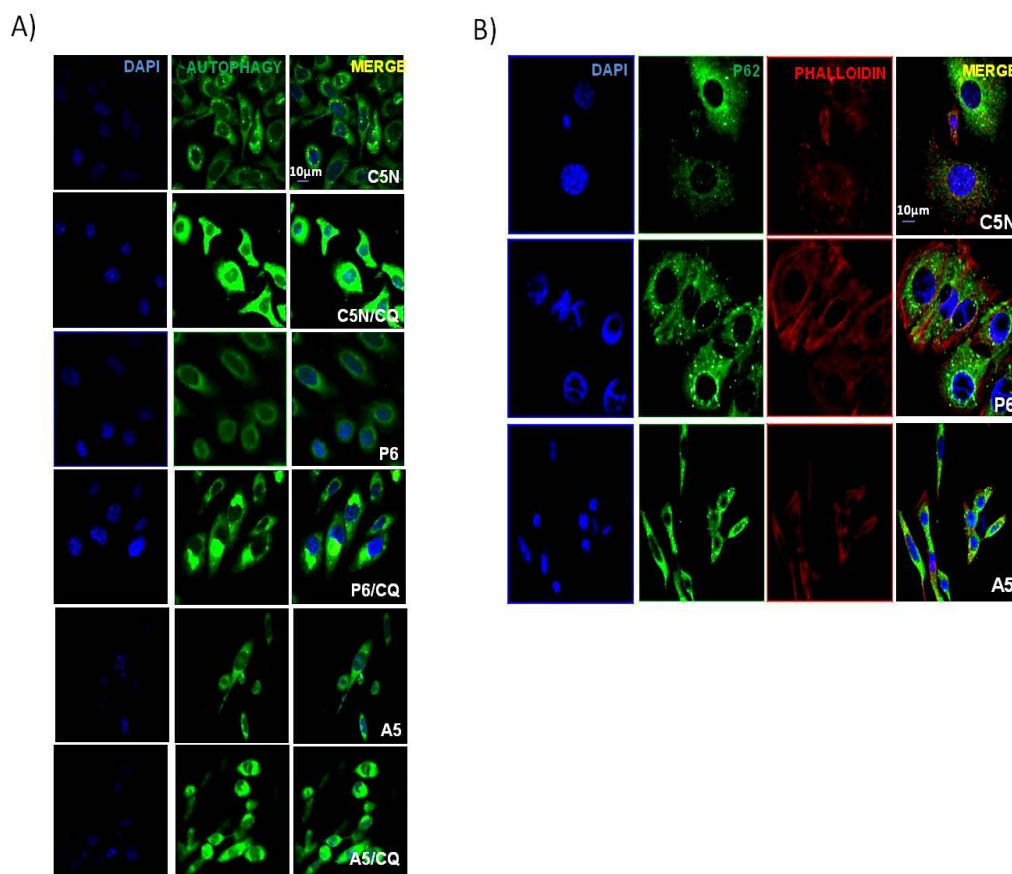
παρατηρούμε αυξημένη έκφρασή της στην κυτταρική σειρά A5. Πιο ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι παρατηρούμε μεγάλη αύξηση της έκφρασης της κάτω ισομορφής της LC3B II, η οποία αποτελεί δείκτη αυτοφαγίας, καθώς σε αυτή μετατρέπεται η LC3B I, όταν ξεκινάει ο σχηματισμός του αυτοφαγοσώματος (**Εικ. 3.3B**).

Παράλληλα, η μελέτη της ενεργότητας των καθεψινών B και L του λυσοσώματος κατέδειξε στατιστικά σημαντική αύξησή της κατά της εξέλιξη της καρκινογένεσης στο υπό μελέτη μοντέλο (**Εικ. 3.3Γ**).



Εικόνα 3.3 Α) Σχετική γονιδιακή έκφραση αυτοφαγικών γονιδίων στις κυτταρικές σειρές C5N, P6 και A5. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *Actin*. Β) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι της αυτοφαγίας. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Γ) Μέτρηση της ενεργότητας καθεψινών B και L. Οι μπάρες των σφαλμάτων: $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$. Η στατιστική ανάλυση και σύγκριση έγινε ως προς C5N κύτταρα.

Τέλος, για τη μελέτη της αυτοφαγίας χρησιμοποιήθηκε επίσης ειδικό εμπορικά διαθέσιμο κιτ και παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης. Για την ακρίβεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον δείγματα από κάθε κυτταρική σειρά, τα οποία είχαν επωαστεί με τον αναστολέα αυτοφαγίας chloroquine (20 μ M) για 16 h, ως θετικοί μάρτυρες. Η συγκεκριμένη χρωστική στοχεύει επιλεκτικά τα αυτοφαγικά κυστίδια, τα οποία εντοπίστηκαν να είναι εντονότερα στην κυτταρική σειρά C5N (**Εικ. 3.4A**).

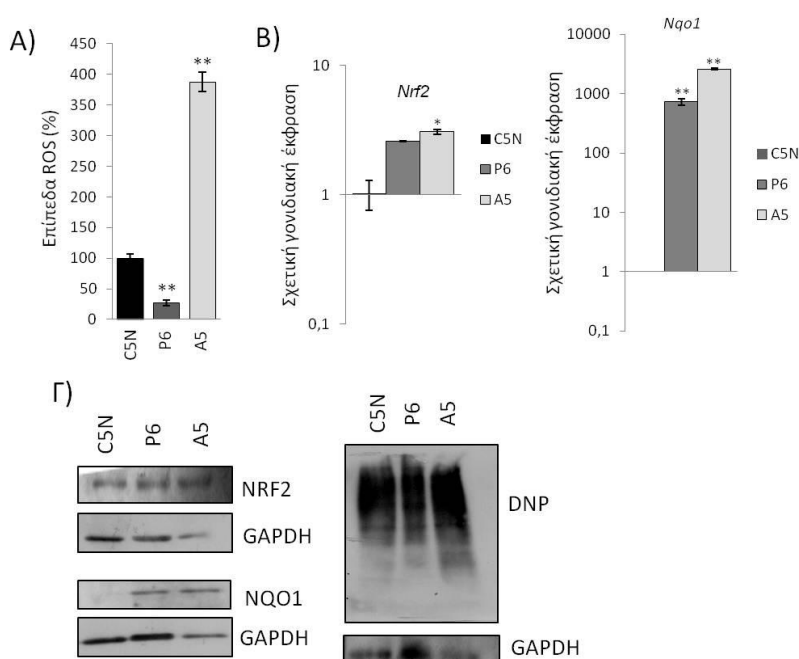


Εικόνα 3.4 Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου παρατηρούνται μονιμοποιημένα κύτταρα C5N, P6 και A5 και των τριών θετικών μαρτύρων τους, τα οποία έχουν σημειωθεί με DAPI (μπλε) και πράσινη φθορίζουσα χρωστική για τη σήμανση των αυτοφαγικών κυστιδίων. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες είχαν υποστεί επεξεργασία με chloroquinone 20 μ M για 16 h. Β) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου παρατηρούνται κύτταρα C5N, P6 και A5, τα οποία έχουν σημειωθεί με DAPI (μπλε), Phalloidin (κόκκινο) και αντίσωμα για την πρωτεΐνη P62 σημειασμένο με δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα.

3.1.3 Ενεργοποίηση του μονοπατιού αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2/KEAP1 στο κυτταρικό μοντέλο χημικής καρκινογένεσης επιδερμίδας ποντικού

Στη συνέχεια, εξετάστηκε εάν το αντιοξειδωτικό μονοπάτι NRF2/KEAP1 επηρεάζεται κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης στο υπό μελέτη κυτταρικό μοντέλο. Αρχικά αναλύθηκαν τα ενδογενή επίπεδα ROS, τα οποία προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια της ειδικής χρωστικής CM-H₂DCFDA και με τη χρήση φθορισμομέτρου. Από τη μέτρηση των επιπέδων του φθορισμού μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών προέκυψε ότι τα υψηλότερα ενδογενή επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου παρουσιάζουν τα κύτταρα A5 με τον κακοήγη φαινότυπο (**Εικ. 3.5Α**). Στηριζόμενοι σε αυτό το εύρημα στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση επιλεγμένων γονιδίων του συστήματος αντιοξειδωτικής απόκρισης.

Η ανάλυση της έκφρασης του γονιδίου *Nrf2* αλλά και του γονιδίου στόχου του *Nqo1*, βασικών ρυθμιστών του μονοπατιού αντιοξειδωτικής απόκρισης του κυττάρου κατέδειξε ότι υπάρχει μια στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων τους και για τις δύο κυτταρικές σειρές σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, με τη σειρά A5 να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη έκφραση (Εικ. 3.5B). Παρόμοια εικόνα με τα παραπάνω αποτελέσματα εξάχθηκε και από τη σύγκριση της πρωτεϊνικής έκφρασης μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών με τα κύτταρα A5 να εμφανίζουν τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης για τις πρωτεΐνες NRF2 και NQO1, καθώς και για τις οξειδωμένες πρωτεΐνες (Εικ. 3.5Γ).

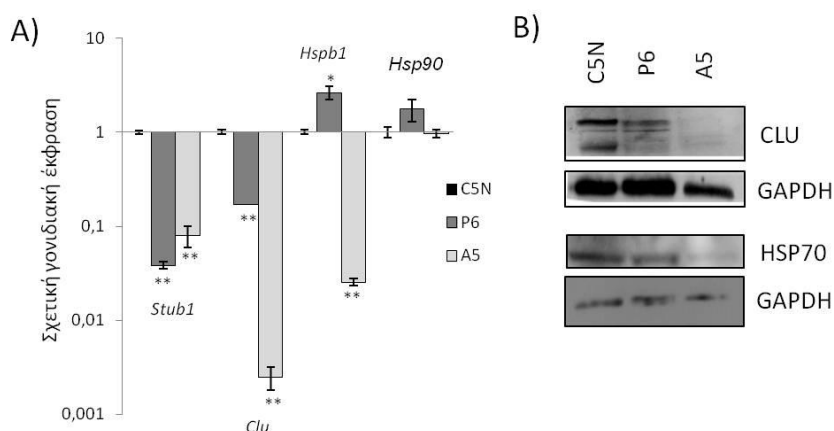


Εικόνα 3.5 Α) Μέτρηση επιπέδων ROS σε κύτταρα C5N, P6 και A5. Β) Σχετική έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική απόκριση του κυττάρου. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *Actin*. Οι μπάρες των σφαλμάτων: $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$. Η στατιστική ανάλυση και σύγκριση έγινε ως προς C5N κύτταρα. Γ) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών NRF2 και NQO1 καθώς και των καρβονυλιωμένων (οξειδωμένων) πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορώματος.

3.1.4 Μειορρύθμιση των μοριακών συνοδών στο κυτταρικό μοντέλο χημικής καρκινογένεσης επιδερμίδας ποντικού

Ένα ακόμα σύστημα του δικτύου πρωτεόστασης που διερευνήθηκε στην παρούσα εργασία είναι αυτό των μοριακών συνοδών. Για το σκοπό αυτό μετρήθηκαν τα επίπεδα γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης επιλεγμένων μοριακών συνοδών. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μια γενικευμένη μειορρύθμιση της γονιδιακής και/ή της πρωτεϊνικής έκφρασης των μοριακών συνοδών στις κυτταρικές σειρές P6 και A5, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Ωστόσο, όσον αφορά στο γονίδιο *Hspb1*, εντοπίστηκε επαγωγή της έκφρασής του στην κυτταρική σειρά P6, όπως και στο

γονίδιο *Hsp90*, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικ. 3.6Α). Αξιοσημείωτη είναι η μεγάλη μείωση της έκφρασης της CLUSTERIN στα A5 κύτταρα σε σχέση με τα αθανатоποιημένα κύτταρα C5N (Εικ. 3.6Α και Εικ. 3.6Β).

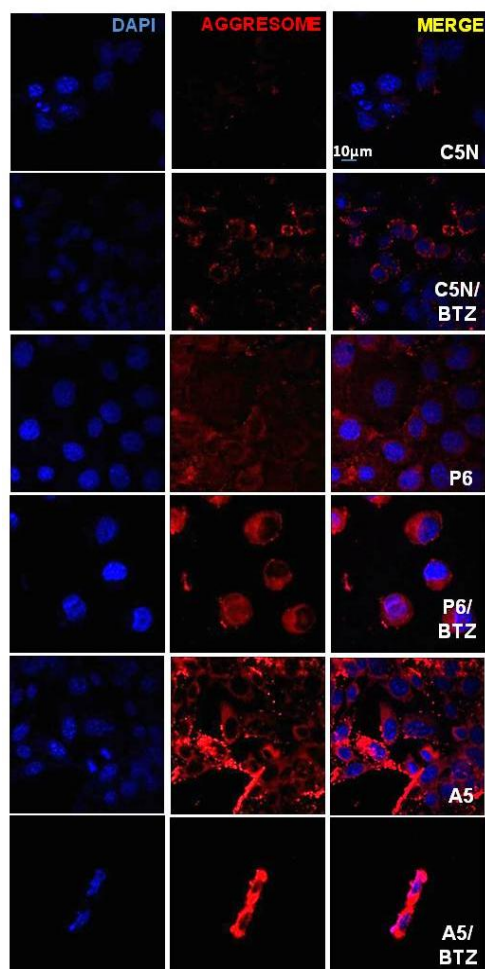


Εικόνα 3.6 Α) Σχετική έκφραση των γονιδίων μοριακών συνοδών σε κύτταρα C5N, P6 και A5. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *Actin*. Οι μπάρες των σφαλμάτων: $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$. Η στατιστική ανάλυση και σύγκριση έγινε ως προς C5N κύτταρα. Β) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών CLUSTERIN και HSP70. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

3.1.5 Αύξηση των συσσωματωμένων πρωτεϊνών (δείκτης εκτεταμένης πρωτεωμικής αστάθειας) κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης

Τέλος, αφού διαπιστώθηκε μια γενικότερη διατάραξη των πρωτεοστατικών μηχανισμών, παρατηρήθηκαν τα συσσωματώματα πρωτεϊνών, τα οποία αδυνατούν να επιδιορθωθούν από τους πρωτεοστατικούς μηχανισμούς. Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε ειδικό κιτ εμπορικά διαθέσιμο και τα σημασμένα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης. Η συγκεκριμένη χρωστική επιλεκτικά σημαίνει πρωτεϊνικό φορτίο, το οποίο βρίσκεται αδιάλυτο συνήθως σε αυτές τις δομές όπως οι HDAC6, PARKIN και ATAXIN-3. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που είχαν επωαστεί με τον αναστολέα του πρωτεασώματος bortezomib (PS-341), ο οποίος αφού αναστέλλει την λειτουργία του πρωτεασώματος, προκαλεί αύξηση του συσσωματωμένου πρωτεϊνικού φορτίου.

Από την παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης προέκυψε ότι οι σειρές P6 και A5 παρουσιάζουν αρκετά μεγαλύτερο φορτίο συσσωματωμένων πρωτεϊνών σε σχέση με τα αθανатоποιημένα κύτταρα C5N, με τη σειρά A5, με τον κακοήγη φαινότυπο να φέρει το μεγαλύτερο φορτίο (Εικ. 3.7).



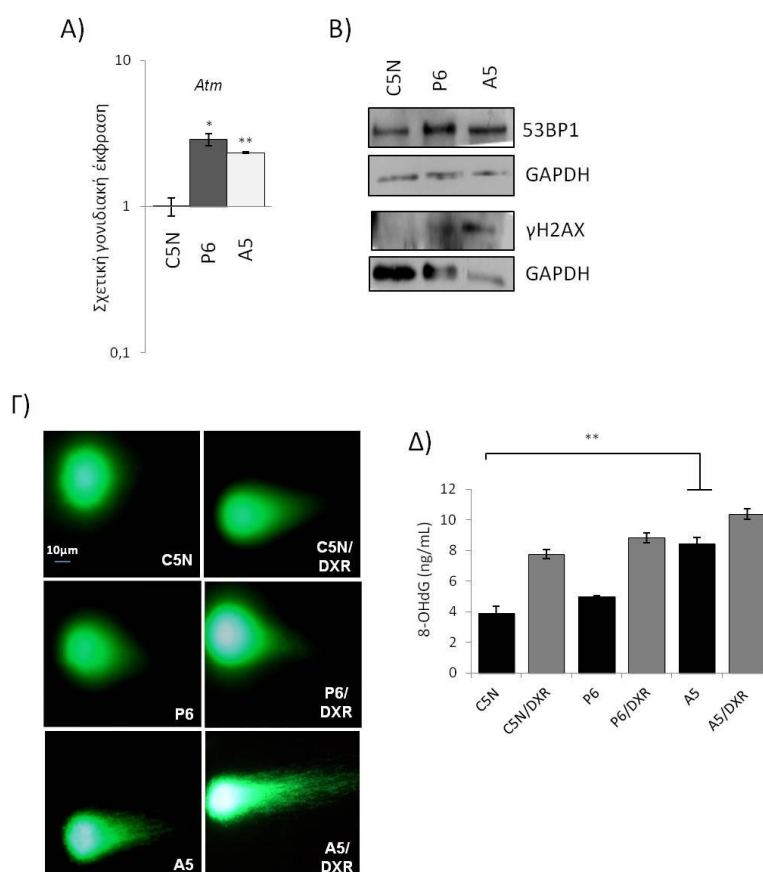
Εικόνα 3.7 Αντιπροσωπευτικές εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου παρατηρούνται κύτταρα C5N, P6 και A5 παρουσία ή απουσία του αναστολέα bortezomib (BTZ), τα οποία έχουν σημειωθεί με DAPI (μπλε) και ειδική χρωστική για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (κόκκινο).

3.1.6 Αύξηση της γενωμικής αστάθειας κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης

Ακολουθώντας, δεδομένου ότι η γενωμική αστάθεια αποτελεί ορόσημο της καρκινογένεσης, μελετήθηκαν παράγοντες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του γενετικού υλικού ύστερα από θραύσεις DNA και αποτελούν βιοδείκτες για την ανίχνευση των βλαβών αυτών. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Atm* στις κυτταρικές σειρές C5N, P6 και A5 και βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένα στις σειρές P6 και A5 σε σχέση με τα αθανатоποιημένα κύτταρα μάρτυρες (**Εικ. 3.8A**). Επιπρόσθετα, αναλύθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών 53BP1 και γH2AX και τα επίπεδα έκφρασής τους βρέθηκαν να είναι αυξημένα στις σειρές P6 και A5 σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, όπως έδειξαν τα πειράματα ανοσοαποτυπώματος Western (**Εικ. 3.8B**) και ανοσοφθορισμού (**Εικ. 3.9A** και **Εικ. 3.9B**). Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα έπειτα

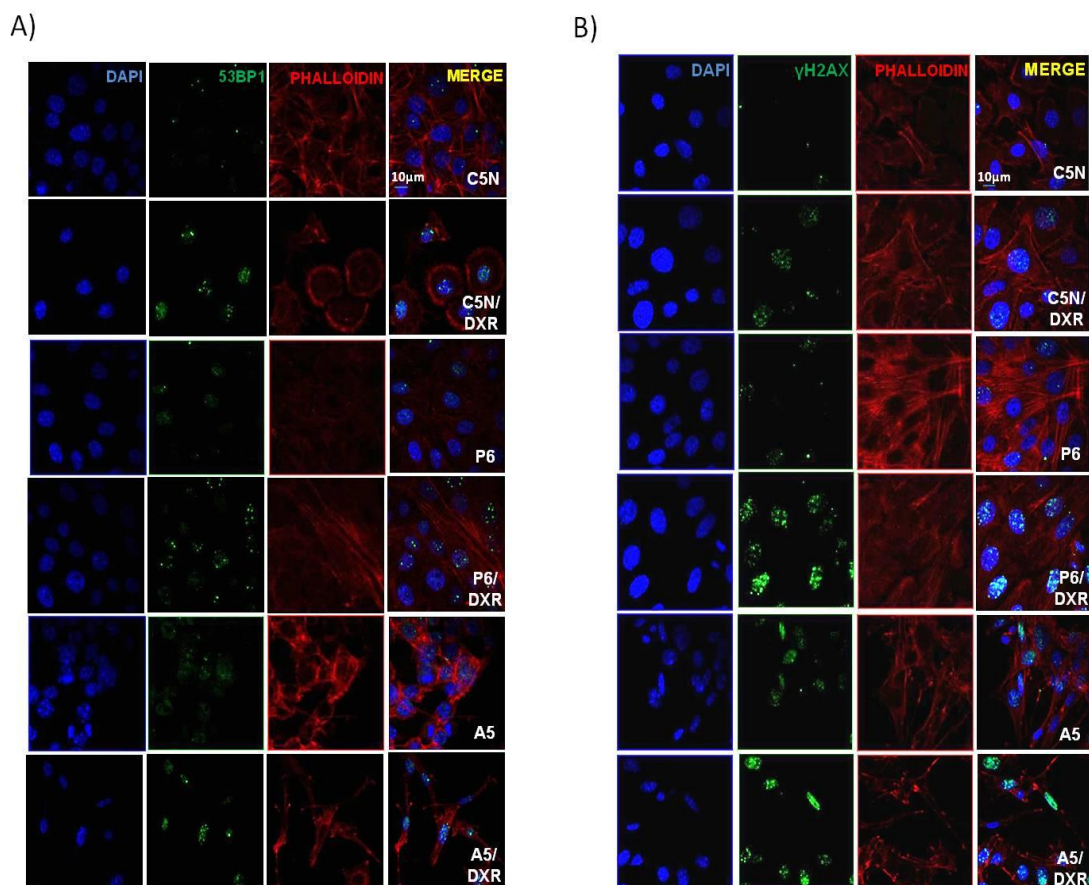
από επώαση με doxorubicin (DXR) 2μM για 24 h, που προκαλεί μεταξύ άλλων γενετοξικό στρες στα κύτταρα.

Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε το comet assay kit για την ανίχνευση του κερματισμένου DNA σε απομονωμένα υπό μελέτη κύτταρα. Για την πραγματοποίηση αυτής της τεχνικής ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που είχαν επωαστεί με doxorubicin (DXR) 2μM για 24 h για κάθε κυτταρική σειρά. Όπως φαίνεται στην **Εικ. 3.8Γ**, η κυτταρική σειρά A5 με τον κακοήγη φαινότυπο φέρει έντονα κατακερματισμένο DNA, καθώς εμφανίζει τη μεγαλύτερη ουρά σε σχέση με τις υπόλοιπες κυτταρικές σειρές. Τέλος, μετρήθηκε η συγκέντρωση της 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανωσίνης (8-OHdG), η οποία αποτελεί δείκτη οξειδωτικού στρες. Όπως και προηγουμένως, για την πραγματοποίηση αυτής της τεχνικής ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ύστερα από επώαση με doxorubicin (DXR) 2 μM για 24 h για κάθε κυτταρική σειρά. Οι μετρήσεις που προέκυψαν ποσοτικοποιήθηκαν με βάση ειδική καμπύλη αναφοράς. Όπως παρουσιάζεται στην **Εικ. 3.8Δ**, η κυτταρική σειρά A5 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση 8-OHdG και κατ' επέκταση το μεγαλύτερο ποσοστό γενετικής βλάβης σε σχέση με τα προηγούμενα στάδια καρκινογένεσης στο υπό μελέτη κυτταρικό μοντέλο.



Εικόνα 3.8 Α) Σχετική έκφραση του γονιδίου *Atm* σε κύτταρα C5N, P6 και A5. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *Actin*. Β) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών 53BP1 και γH2AX, βιοδεικτών βλάβης στο γενετικό υλικό. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Γ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού, όπου παρατηρούνται κύτταρα των

τριών κυτταρικών σειρών και των θετικών μαρτύρων έπειτα από επώαση με DXR. Δ) Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της βάσης 8-OHdG στις τρεις κυτταρικές σειρές και στους θετικούς μάρτυρες έπειτα από επώαση με DXR 2 μ M. Οι μπάρες των σφαλμάτων: $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$. Η στατιστική ανάλυση και σύγκριση έγινε ως προς C5N κύτταρα.



Εικόνα 3.9 Αντιπροσωπευτικές εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου παρατηρούνται κύτταρα C5N, P6 και A5 παρουσία ή απουσία DXR, τα οποία έχουν σημειωθεί με DAPI (μπλε), Phalloidin (κόκκινο) και αντίσωμα έναντι 53BP1 (πράσινο) (A) ή γH2AX (πράσινο) (B).

3.2 Συσχέτιση της ριβοσωμικής δυσλειτουργίας με τους μηχανισμούς κυτταρικής πρωτεόστασης

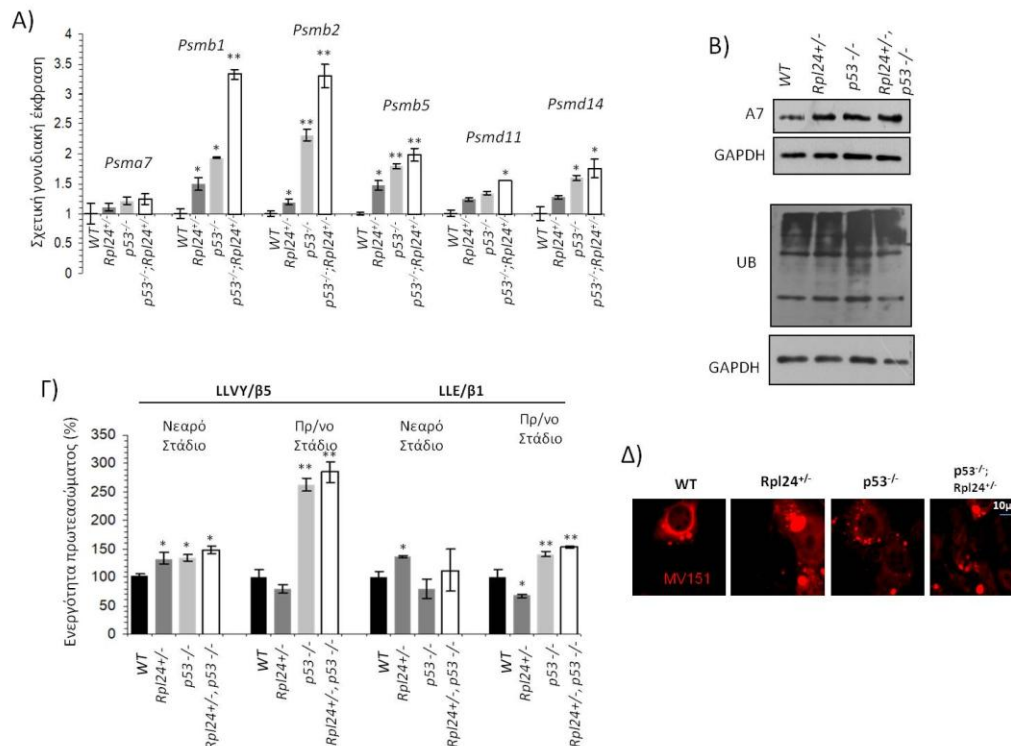
Δεδομένου ότι τμήμα του δικτύου πρωτεόστασης αποτελεί και η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης, στη συνέχεια μελετήθηκαν οι μηχανισμοί διατήρησης της ομοιοδυναμικής ισορροπίας του πρωτεώματος σε κύτταρα που παρουσιάζουν ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση. Όπως αναφέρθηκε η βιογένεση των ριβοσωμάτων είναι πολύ σημαντική στα κύτταρα, καθώς σχετίζεται με το αυξημένο πολλαπλασιαστικό δυναμικό, το οποίο είναι απαραίτητο κατά την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση.

3.2.1 Επαγωγή του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος ύστερα από καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα P53

Αρχικά διερευνήσαμε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος σε κύτταρα νεαρού σταδίου. Με ενδιαφέρον διαπιστώσαμε επαγωγή της έκφρασης των *Psmb5*, *Psmb1*, *Psmb2*, *Psmc11* και *Psmc14* πρωτεασωμικών γονιδίων στις κυτταρικές σειρές Bst, p53KO και p53 KO/Bst, ενώ η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στην κυτταρική σειρά με τις δύο μεταλλάξεις (p53 KO/Bst) (Εικ. 3.10Α). Παρομοίως, παρατηρήθηκε αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της πρωτεασωμικής υπομονάδας A7 αλλά και των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών στις δύο κυτταρικές σειρές με την ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση (Bst, p53 KO/Bst) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (Εικ. 3.10Β).

Ακολούθως μελετήθηκαν τα ενδογενή επίπεδα πρωτεασωμικής ενεργότητας στις κυτταρικές σειρές του υπό μελέτη μοντέλου. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, συλλέχθηκαν κύτταρα σε διαφορετικά στάδια και ειδικότερα σε κύτταρα νεαρού (early passage) (P4-P5) και κύτταρα προχωρημένου σταδίου (late passage) (P6-P9). Όσον αφορά στα κύτταρα νεαρού σταδίου διαπιστώθηκε αύξηση των ενεργοτήτων χυμοθρυψίνης και κασπάσης και για τις δύο κυτταρικές σειρές με την ελλιπή πρωτεϊνοσύνθεση (Bst, p53 KO/Bst) σε σχέση με τους φυσιολογικούς ινοβλάστες. Αντίθετα, σχετικά με τα κύτταρα σε προχωρημένο στάδιο παρατηρήθηκε μείωση και των δυο πρωτεασωμικών ενεργοτήτων στην κυτταρική σειρά προερχόμενη από ποντίκια με το φαινότυπο Bst. Αντίθετα, η ενεργότητα και των δυο πρωτεασωμικών υπομονάδων αυξήθηκε στην κυτταρική σειρά με τη μετάλλαξη που απενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα P53 (p53KO) και στην κυτταρική σειρά και με τις δυο μεταλλάξεις (p53 KO/Bst), το οποίο πιθανόν δείχνει ότι η ενεργοποίηση του πρωτεασώματος καταστέλλεται από το μεταγραφικό παράγοντα P53, το οποίο είχε παρατηρηθεί και παραπάνω με τη μελέτη των κυττάρων της πολυσταδιακής χημικής καρκινογένεσης (Εικ. 3.10Γ).

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε σήμανση των ενεργών υπομονάδων των πρωτεασωμάτων με τη χρήση του πρωτεασωμικού ιχνηθέτη MV151 μέσω ανοσοφθορισμού. Με τη βοήθεια του συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης παρατηρήθηκε ότι τα πρωτεασώματα τείνουν να συσσωματώνονται και στις δύο σειρές με την ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση, με το φαινόμενο να είναι αρκετά πιο έντονο στην κυτταρική σειρά Bst (Εικ. 3.10Δ).



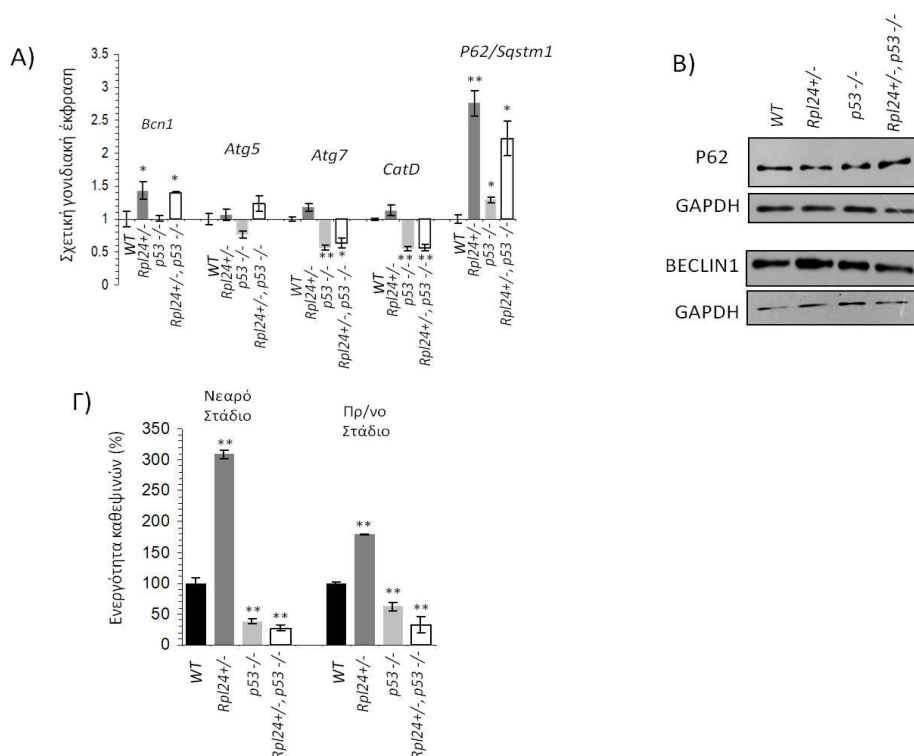
Εικόνα 3.10 Α) Σχετική γονιδιακή έκφραση πρωτεασωμικών γονιδίων στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *Actin*. Β) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεασωμικής υπομονάδας A7 και των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές πρώιμου σταδίου. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Γ) Μέτρηση των πρωτεασωμικών ενεργιοτήτων χυμοθρυψίνης (LLVY) και κασπάσης (LLE) σε κύτταρα πρώιμου (P4-P5) και προχωρημένου σταδίου (P6-P8). Οι μπάρες των σφαλμάτων: $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$. Η στατιστική ανάλυση και σύγκριση έγινε ως προς WT κύτταρα. Δ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου παρατηρείται η εικόνα των πρωτεασωμάτων, τα οποία έχουν σημανθεί με MV151 (κόκκινο).

3.2.2 Επαγωγή του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος σε κύτταρα με ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση

Καθώς το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος βρέθηκε να υφίσταται σημαντικές αλλαγές στις κυτταρικές σειρές με ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση και με απενεργοποιημένο ή μη τον μεταγραφικό παράγοντα P53, ακολούθως μελετήσαμε το δεύτερο κύριο πρωτεολυτικό σύστημα του κυττάρου, το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος. Ειδικότερα, στην κυτταρική σειρά Bst παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *Becn1* και *P62*. Στην κυτταρική σειρά p53KO παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων σχετικής γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων *Atg5*, *Atg7* και *CatD*, ενώ στην κυτταρική σειρά p53 KO/Bst παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα σχετικής γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων *Becn1* και *P62* και αντίστοιχη μείωση των γονιδίων *Atg5* και *CatD* (Εικ. 3.11Α).

Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης P62, που αποτελεί δείκτη οξειδωτικού στρες και επιπλέον συμμετέχει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, στις κυτταρικές σειρές με την ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση (Bst, p53 KO/Bst), καθώς και αύξηση της πρωτεΐνης BECLIN1 στην κυτταρική σειρά Bst (Εικ. 3.11B).

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η ενεργότητα των καθεψινών B και L του λυσοσώματος στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές. Η μελέτη έγινε σε κύτταρα πρώιμου και προχωρημένου σταδίου, όπου και στα δύο στάδια ανάπτυξης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας των καθεψινών B και L στην κυτταρική σειρά προερχόμενη από ποντίκια με φαινότυπο Bst. Αντίθετα, στις δύο κυτταρικές σειρές που φέρουν τη μετάλλαξη που απενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα p53 (p53KO και p53 KO/Bst) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση με την κυτταρική σειρά p53 KO/Bst να εμφανίζει τη μεγαλύτερη μείωση (Εικ. 3.11Γ). Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος πιθανόν είναι εξαρτώμενο από τον μεταγραφικό παράγοντα P53.



Εικόνα 3.11 Α) Σχετική επίπεδα έκφρασης αυτοφαγικών γονιδίων στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *Actin*. Β) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των αυτοφαγικών πρωτεϊνών P62 και BECLIN1. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Γ) Μέτρηση της ενεργότητας καθεψινών B και L σε κύτταρα πρώιμου (P4-P5) και προχωρημένου σταδίου (P6-P9) στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές. Οι μπάρες των σφαλμάτων: $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$. Η στατιστική ανάλυση και σύγκριση έγινε ως προς WT κύτταρα.

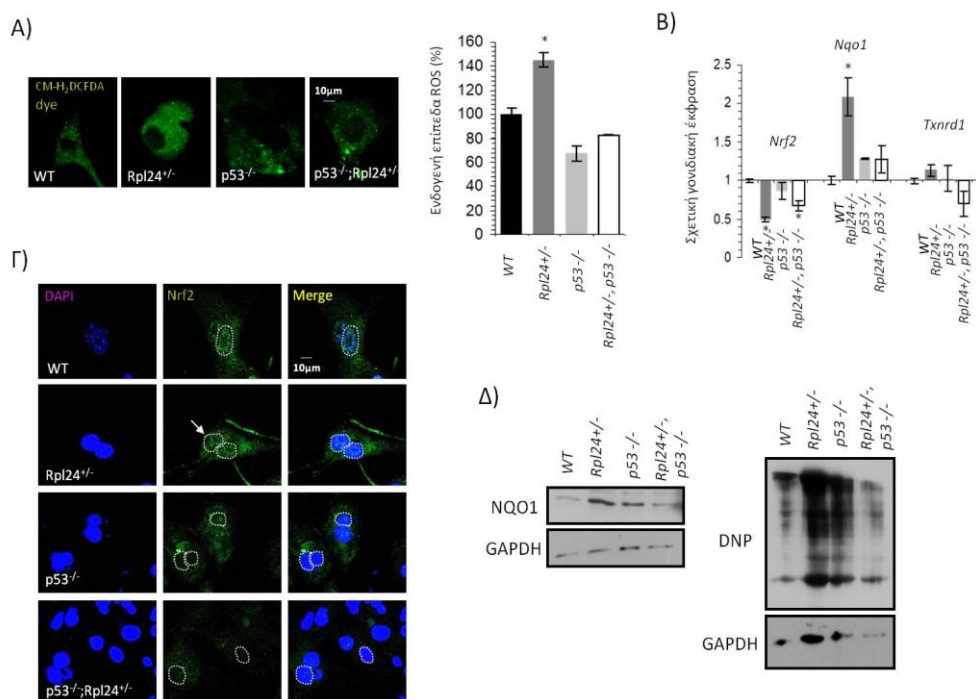
3.2.3 Συσσώρευση οξειδωτικού στρες σε κύτταρα με ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση

Δεδομένου ότι τα παραπάνω ευρήματά μας έδειξαν ότι στις κυτταρικές σειρές με ελαττωματική πρωτεϊνοσύνθεση υπάρχουν διαταραχές στη λειτουργία των δύο κύριων πρωτεολυτικών συστημάτων, ακολούθως ελέγξαμε εάν επηρεάζεται και το μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2/ στο υπό μελέτη κυτταρικό μοντέλο.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση των ενδογενών επιπέδων ROS με τη χρήση της χρωστικής CM-H₂DCFDA και φθορισμόμετρου ή συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης και παρατηρήσαμε αυξημένη παραγωγή ROS σε κύτταρα Bst σε σχέση με τα φυσιολογικά. Η μελέτη μας έδειξε επίσης ότι τα κύτταρα p53KO και p53KO/Bst εμφανίζουν μειωμένη παραγωγή ROS, με την κυτταρική σειρά p53KO να εμφανίζει τα χαμηλότερα ποσοστά (**Εικ 3.12Α**).

Ακολούθως, μελετήθηκαν τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *Nrf2* και των στόχων του *Nqo1* και *Txnrd1*. Όσον αφορά στην κυτταρική σειρά BST παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της έκφρασης του γονιδίου *Nrf2* και αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *Nqo1*. Στην κυτταρική σειρά p53KO δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, ενώ στην κυτταρική σειρά p53 KO/Bst παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του *Nrf2* σε σχέση με τους φυσιολογικούς ινοβλάστες (**Εικ 3.12Β**). Επίσης, τα πειράματα ανοσοφθορισμού για τη μελέτη του εντοπισμού του NRF2 έδειξαν ότι τα κύτταρα με φαινότυπο BST εμφανίζουν ενεργοποίηση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα (**Εικ 3.12Γ**) σε σχέση με τις άλλες τρεις κυτταρικές σειρές.

Τέλος, προχωρήσαμε στην ανάλυση των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης της πρωτεΐνης NQO1 καθώς και των καρβονυλιωμένων (οξειδωμένων) πρωτεϊνών. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης NQO1 αυξάνονται στην κυτταρική σειρά Bst, ενώ μειώνονται στις κυτταρικές σειρές p53 KO και p53 KO/Bst (**Εικ 3.12Δ**). Από την ανάλυση των οξειδωμένων πρωτεϊνών διαπιστώθηκε ότι η κυτταρική σειρά με φαινότυπο BST εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης. Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, παρατηρούμε ότι η κυτταρική σειρά Bst παρουσιάζει συσσώρευση οξειδωτικού στρες.

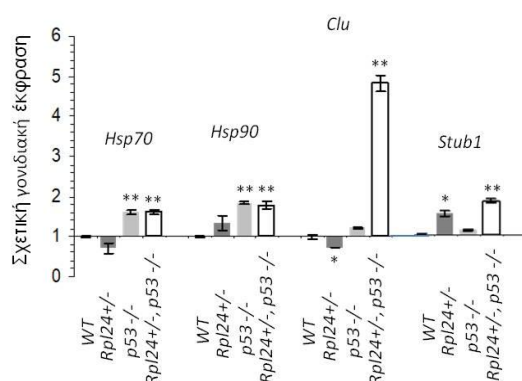


Εικόνα 3.12 Α) Εκτίμηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS στις υπό μελέτη κυτταρικές σειρές με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης ή φθορισμόμετρο χρησιμοποιώντας τη χρωστική CM-H₂DCFDA. Β) Σχετική έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική απόκριση σε κύτταρα νεαρού σταδίου. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *Actin*. Γ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου παρατηρούνται κύτταρα και των τεσσάρων κυτταρικών σειρών, τα οποία έχουν σημειωθεί με DAPI (μπλε) και αντίσωμα έναντι του NRF2 (πράσινο). Δ) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης NQO1 και των καρβονυλιωμένων (οξειδωμένων) πρωτεϊνών. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Οι μπάρες των σφαλμάτων: $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$. Η στατιστική ανάλυση και σύγκριση έγινε ως προς WT κύτταρα.

3.2.4 Επαγωγή της έκφρασης των μοριακών συνοδών ύστερα από καταστολή του μεταγραφικού παράγοντα P53

Όπως προαναφέρθηκε, μέρος του δικτύου πρωτεόστασης αποτελούν και οι μοριακοί συνοδοί. Έτσι, στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των *Hsp70*, *Hsp90* και *Clusterin* καθώς και της λιγάσης *Stub1* που εμπλέκεται στο μηχανισμό καταστροφής των υποστρωμάτων των μοριακών συνοδών. Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Clusterin* στην κυτταρική σειρά Bst και αυξημένα επίπεδα έκφρασης του *Stub1* σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Στην κυτταρική σειρά p53KO διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης των μοριακών συνοδών *Hsp70* και *Hsp90*, ενώ στην κυτταρική σειρά p53 KO/Bst παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης όλων των προαναφερθέντων γονιδίων σε σχέση με τους φυσιολογικούς ινοβλάστες (Εικ 3.13). Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως στην κυτταρική σειρά p53 KO/Bst που φέρει και

τις δύο μεταλλαγές πραγματοποιείται ισχυρότερη ενεργοποίηση των μοριακών συνοδών σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι με την απουσία του μεταγραφικού παράγοντα P53, αυξάνεται η έκφραση των γονιδίων των μοριακών συνοδών, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι το P53 άμεσα ή έμμεσα αναστέλλει αυτές τις αποκρίσεις.

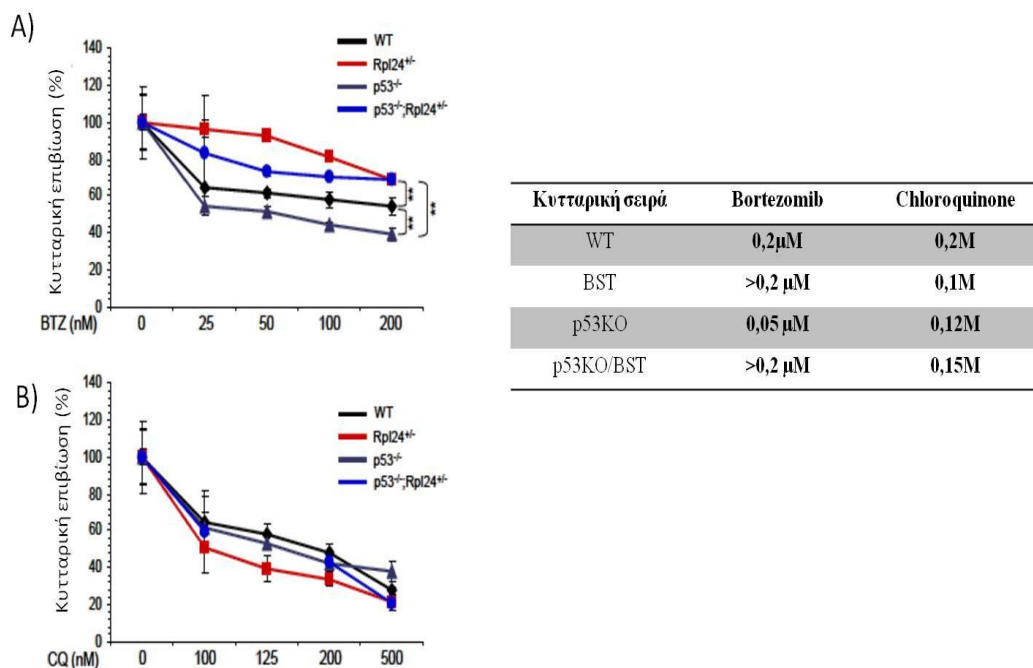


Εικόνα 3.13 Σχετική έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν σημαντικές μοριακές συνοδούς. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *Actin*. Οι μπάρες των σφαλμάτων: $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$. Η στατιστική ανάλυση και σύγκριση έγινε ως προς WT κύτταρα.

3.2.5 Διαφορική ανθεκτικότητα των κυτταρικών σειρών με ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση σε παράγοντες διατάραξης της πρωτεόστασης

Καθώς μελετήσαμε τους διάφορους πρωτεοστατικούς μηχανισμούς στις κυτταρικές σειρές με ελαττωματική πρωτεϊνοσύνθεση, διαπιστώσαμε σημαντικές αλλαγές στη λειτουργία τους. Για το σκοπό αυτό, συγκρίναμε την επίδραση παραγόντων που διαταράσσουν την πρωτεόσταση στη βιωσιμότητα των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών με τον προσδιορισμό του IC_{50} με τη δοκιμασία MTT. Ως IC_{50} ορίζεται η μέση ανασταλτική συγκέντρωση της ουσίας, δηλαδή η συγκέντρωση στην οποία μειώνεται η κυτταρική επιβίωση στο 50%.

Συγκεκριμένα, μελετήσαμε την επίδραση του bortezomib που αποτελεί πρωτεασωμικό αναστολέα και της chloroquinone που αναστέλλει τη λειτουργία του λυσοσώματος. Στη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν προέκυψαν από τη βιβλιογραφία. Από τον **Πίνακα 3.1** παρατηρούμε ότι τα κύτταρα Bst και p53KO/Bst εμφανίζουν κάποια ανθεκτικότητα στο bortezomib σε σχέση με τους φυσιολογικούς ινοβλάστες. Αντίθετα, τα κύτταρα p53KO εμφανίζονται πιο ευαίσθητα σε σχέση με τους κύτταρα μάρτυρες (**Εικ 3.14A**). Όσον αφορά στη chloroquinone, προκαλεί μείωση της βιωσιμότητας των κυτταρικών σειρών Bst, p53KO και p53KO/Bst σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα (**Εικ 3.14B**).



Εικόνα 3.14 Εκτίμηση της (%) κυτταρικής επιβίωσης ως προς τα κύτταρα μάρτυρες μετά από επώαση με A) bortezomib και B) chloroquinone για 24 h σε διάφορες συγκεντρώσεις. Οι μπάρες των σφαλμάτων: $\pm$ SD, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$. Η στατιστική ανάλυση και σύγκριση έγινε ως προς WT κύτταρα καθώς και μεταξύ των σειρών Rpl24^{+/-} και p53^{-/-};Rpl24^{+/-}.

Πίνακας 3.1 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων για το IC₅₀.

3.2.6 Αύξηση του συσσωματωμένου πρωτεϊνικού φορτίου στις σειρές με ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση

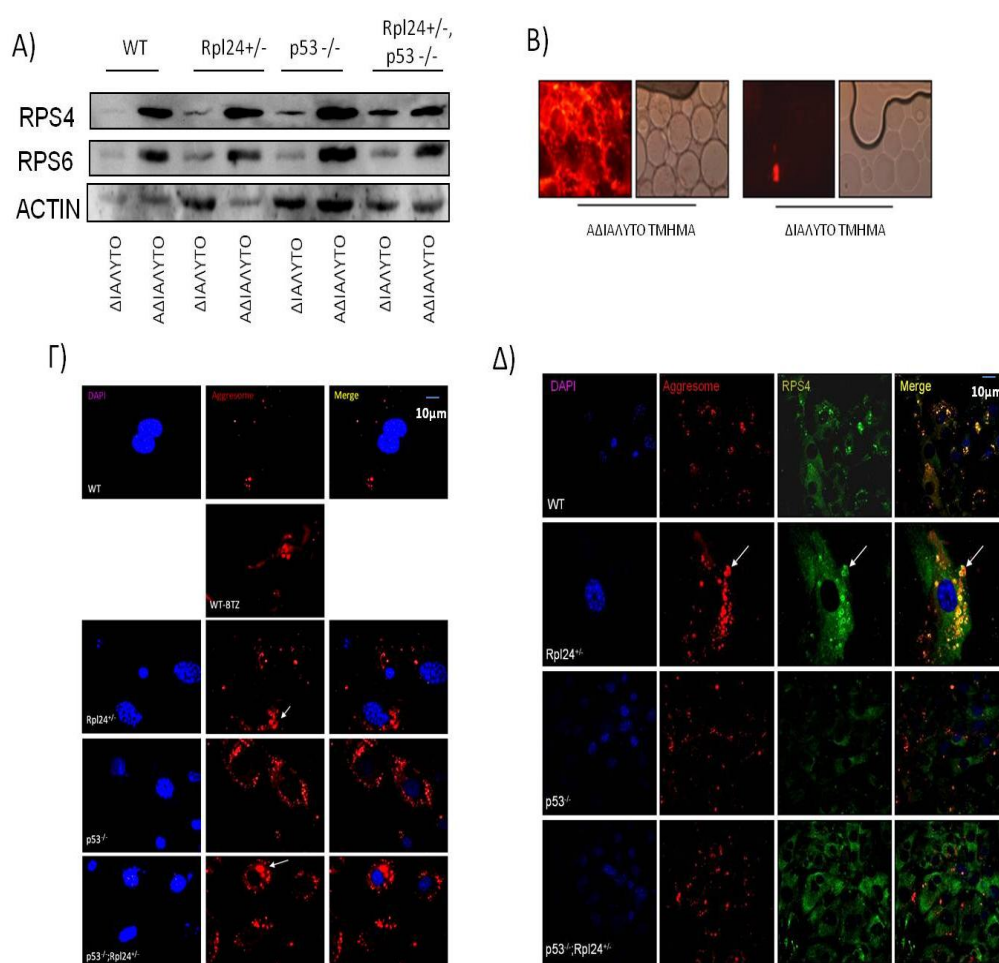
Αφού οι κυτταρικές σειρές του υπό μελέτη μοντέλου με ελλειπή πρωτεϊνοσύνθεση παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές στη λειτουργία των πρωτεοστατικών μηχανισμών, στη συνέχεια διερευνήθηκε το συσσωματωμένο πρωτεϊνικό φορτίο που περιέχουν στο κυτταρόπλασμά τους.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του αδιάλυτου τμήματος των συσσωματωμένων πρωτεϊνών και ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, ώστε να πραγματοποιηθεί ανοσοεντόπιση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στις αδιάλυτες αυτές δομές. Για την επαλήθευση της διαδικασίας ότι όντως είχαν απομονωθεί τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα, διενεργήθηκε σε κύτταρα αγρίου τύπου ανοσοκατακρήμνιση με τη χρήση σφαιριδίων και σήμανση του αδιάλυτου και διαλυτού τμήματος των πρωτεϊνών ξεχωριστά με ειδική χρωστική για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού (**Εικ 3.15B**). Αφού η απομόνωση ολοκληρώθηκε με επιτυχία, έγινε ανοσοεντόπιση δύο ριβοσωμικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη συγκρότηση της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος της RPS4 και RPS6, τόσο στο διαλυτό όσο και στο αδιάλυτο τμήμα. Το αποτέλεσμα το οποίο προέκυψε ήταν η αύξηση των

επιπέδων έκφρασης των δύο αυτών ριβοσωμικών πρωτεϊνών στις συσσωματωμένες δομές στις δύο κυτταρικές σειρές με την ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα (**Εικ 3.15Α**).

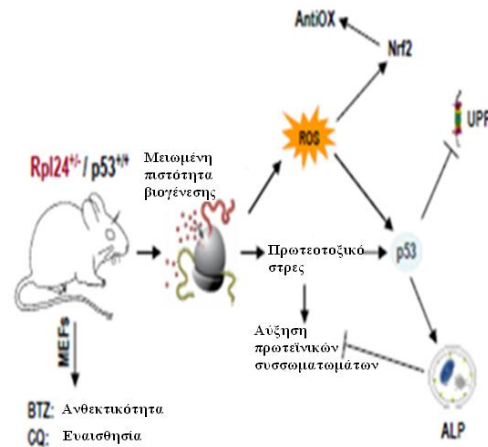
Έπειτα, χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμο κιτ για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων που υπήρχαν στα κύτταρα και από την παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης προέκυψε ότι οι δύο σειρές με την ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση παρουσιάζουν αρκετά μεγαλύτερο φορτίο συσσωματωμένων πρωτεϊνών σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα (**Εικ 3.15Γ**).

Επιπλέον, μελετήθηκε η συνεντόπιση αυτών των πρωτεϊνών στα πρωτεϊνικά συσσωματώματα με τη χρήση της χρωστικής που αναφέρθηκε προηγουμένως σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης και παρατηρήθηκε μια αυξημένη συνεντόπιση στα κύτταρα των δύο κυτταρικών σειρών με την ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση (**Εικ 3.15Δ**) όπως είχε διαπιστωθεί και από το ανοσοαποτύπωμα Western (**Εικ 3.15Α**).



Εικόνα 3.15 Α) Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των ριβοσωμικών πρωτεϊνών σε λύμα πρωτεΐνης καθώς και στο τμήμα που περιείχε τις συσσωματωμένες πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη ACTIN χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Β) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού, όπου παρατηρούνται αριστερά το αδιάλυτο κομμάτι των πρωτεϊνών και δεξιά το διαλυτό κομμάτι τους. Γ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου παρατηρούνται κύτταρα και των τεσσάρων κυτταρικών σειρών, τα οποία έχουν σημειωθεί με DAPI (μπλε) και

ειδική χρωστική για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (κόκκινο). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα αγρίου τύπου έπειτα από επώαση με bortezomib, ο οποίος αφού αναστέλλει την λειτουργία του πρωτεασώματος, προκαλεί αύξηση του συσσωματωμένου πρωτεϊνικού φορτίου. Δ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου παρατηρούνται κύτταρα και των τεσσάρων κυτταρικών σειρών, τα οποία έχουν σημειωθεί με DAPI (μπλε), ειδική χρωστική για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (κόκκινο) και αντίσωμα για τη ριβοσωμική πρωτεΐνη RPS4 (πράσινο).



Εικόνα 3.16 Γενικευμένη παρουσίαση της ρύθμισης του δικτύου πρωτεόστασης στα κύτταρα με ανεπαρκή πρωτεϊνική σύνθεση.

IV. Συζήτηση–Συμπεράσματα



Ο καρκίνος είναι μια πολυπαραγοντική-πολυσταδιακή ασθένεια άμεσα σχετιζόμενη με τη λειτουργικότητα του κυτταρικού πρωτεώματος, ενώ φαίνεται ότι η συσσώρευση μη λειτουργικών πρωτεϊνών αποτελεί βασικό παράγοντα εμφάνισης της καρκινογένεσης. Στα διάφορα στάδια εξέλιξης του νόσου φαίνεται πως συμμετέχουν διακριτοί παράγοντες του δικτύου διατήρησης της πρωτεωμικής σταθερότητας και του συστήματος αντιοξειδωτικής απόκρισης. Πιο συγκεκριμένα, ο μεταγραφικός παράγοντας αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2 σχετίζεται άμεσα με την καρκινογόνο δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου (Shen and Kong, 2009), ενώ παράλληλα οι μοριακοί συνοδοί που συντηρούν τη φυσιολογική πτύχωση των πρωτεϊνών έχει βρεθεί πως εμπλέκονται άμεσα στην εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνου (Trouwakos et al., 2013). Επιπρόσθετα, η υπερενεργοποίηση των μονοπατιών της αυτοφαγίας και ουβικιτίνης-πρωτεασώματος όχι μόνο προφυλάσσουν τα κύτταρα του όγκου από συνθήκες πρωτεωμικής αστάθειας, αλλά παράλληλα συμμετέχουν ενεργά στην προώθηση του κακοήθους χαρακτήρα του (Kirkegaard and Jäättelä, 2009).

Προκειμένου να γίνει ένα περαιτέρω βήμα στην αντιμετώπιση του καρκίνου, έχουν γίνει κατά καιρούς προτάσεις και προσπάθειες στόχευσης παραγόντων των παραπάνω συστημάτων. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι μηχανισμοί πρωτεόστασης σε ένα μοντέλο πολυσταδιακής χημικής καρκινογένεσης της επιδερμίδας του ποντικού, ώστε να κατανοηθεί η συμμετοχή της πρωτεωμικής αστάθειας στα διάφορα στάδια της διαδικασίας αυτής. Παράλληλα, γνωρίζοντας ότι εκτός από τους μηχανισμούς που εξασφαλίζουν την ομαλή λειτουργία και δομή των πρωτεϊνών, πρώτο σημείο ελέγχου αποτελεί η ίδια η πρωτεϊνοσύνθεση (Tavernarakis, 2007), ερευνήθηκε η επίδραση της ελαττωματικής πρωτεϊνοσύνθεσης στους μηχανισμούς κυτταρικής πρωτεόστασης.

Αρχικά, μελετήθηκε το δίκτυο των πρωτεολυτικών μηχανισμών στο μοντέλο πολυσταδιακής χημικής καρκινογένεσης της επιδερμίδας του ποντικού. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε επαγωγή του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος κατά την εξέλιξη της καρκινογένεσης στο υπό μελέτη κυτταρικό μοντέλο. Τα δεδομένα μας αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, όπου έχει παρατηρηθεί αυξημένη έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του παχέος εντέρου (Arlt et al., 2009), τον μεταστατικό καρκίνο του ήπατος (Li et al., 2017), τις νεοπλασίες του θυροειδούς (Okamura et al., 2003) και διάφορους τύπους μελανώματος (Ren et al., 2000). Το φαινόμενο αυτό πιθανότατα υποδηλώνει προσαρμογή των καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες έντονης οξειδωτικής και πρωτεοτοξικής καταπόνησης.

Το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος, που αποτελεί το δεύτερο σημαντικό μηχανισμό πρωτεόλυσης του κυττάρου αποτέλεσε επίσης αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας. Σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη που δείχνει ότι ο μηχανισμός της αυτοφαγίας αυξάνεται σημαντικά στα καρκινικά κύτταρα λόγω μεταβολικού στρες (Mathew et al., 2017), παρατηρήσαμε επαγωγή του μονοπατιού αυτού στις κυτταρικές σειρές P6 και A5 σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες με τη μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα A5. Τα ευρήματα αυτά προέκυψαν από μελέτη της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης δεικτών του μονοπατιού αυτού, καθώς και της ενεργότητας των λυσοσωμικών καθεσφινών.

Επιπλέον, όσον αναφορά στον ειδικό διαμεσολαβητή της αυτοφαγίας P62, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασής του στην καρκινική σειρά A5. Έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής στο καρκινικό μικροπεριβάλλον είναι ιδιαίτερα αυξημένη (Moscat et al., 2016) και εγείρει ερωτήματα σχετικά με τη συμμετοχή της στην εξέλιξη της καρκινογένεσης που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη P62 ενεργοποιεί την αντιοξειδωτική απόκριση μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη KEAP1 (Moscat et al., 2016), στη συνέχεια ερευνήθηκαν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες στις διάφορες κυτταρικές σειρές. Ειδικότερα, τα μεταστατικά κύτταρα A5 βρέθηκαν να εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ROS σε σχέση με τα αθανатоποιημένα C5N κύτταρα, καθώς αντίστοιχη ήταν και η γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση μορίων του μονοπατιού της αντιοξειδωτικής απόκρισης.

Παρόλα αυτά, η εικόνα φαίνεται να αλλάζει όσον αφορά στις μοριακούς συνοδούς, καθώς η σειρά A5 βρέθηκε να έχει τα μικρότερα επίπεδα έκφρασης των περισσότερων μοριακών συνοδών που ερευνήθηκαν τόσο σε γονιδιακό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία, όπου σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, οι μοριακοί συνοδοί φαίνεται να υπερεκφράζονται σε μια πληθώρα καρκινικών τύπων (Ciocca and Calderwood, 2005; Trougakos et al., 2013), χωρίς όμως να έχουν μελετηθεί στον συγκεκριμένο τύπο καρκινικής εξαλλαγής. Αξίζει να τονιστούν τα πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης CLUSTERIN στα κύτταρα με τον κακοήγη φαινότυπο. Η πρωτεΐνη αυτή λειτουργεί ως εξωκυττάρια μοριακή συνοδός και βιοδείκτης οξειδωτικού στρες και έχει βρεθεί να συμβάλλει τόσο στην ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση όσο και στην προστασία από την καρκινογένεση (Trougakos et al., 2009). Θα ήταν ενδιαφέρον να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες, ώστε να διευκρινιστεί η εμπλοκή της στην καρκινογένεση καθώς επίσης και η πιθανή αλληλεπίδρασή της με τα άλλα συστήματα του δικτύου πρωτεόστασης.

Τέλος, δεδομένου ότι η γενωμική αστάθεια αποτελεί σημαντικό ορόσημο της καρκινογένεσης σύμφωνα με τους Hanahan και Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011), πραγματοποιήθηκε ανίχνευση βιοδεικτών για βλάβες DNA (π.χ. της φωσφορυλιωμένης μορφής της ιστόνης H₂A.X, του οξειδωμένου παράγωγου της δεοξυγουανωσίνης, το οποίο είναι κύριο προϊόν της οξείδωσης του DNA κ.α.) για την άμεση απεικόνιση της βλάβης του DNA. Παρατηρήσαμε ότι ενώ ήδη από την κυτταρική σειρά P6 με τον καλοήγη φαινότυπο εντοπίζονται σημαντικές αλλαγές στην έκφραση πρωτεοστατικών μορίων, η εμφάνιση γενετικών βλαβών έπεται. Η κυτταρική σειρά A5 με τον κακοήγη φαινότυπο εμφάνισε το μεγαλύτερο ποσοστό συσσώρευσης βλάβης γενετικού υλικού, γεγονός που υποδεικνύει την αυξημένη γενωμική αστάθεια των καρκινικών κυττάρων.

Στη συνέχεια, στην παρούσα εργασία συσχετίστηκαν οι πρωτεοστατικοί μηχανισμοί με τη ριβοσωμική δυσλειτουργία, δεδομένου ότι η πρωτεϊνοσύνθεση αποτελεί ζωτικής σημασίας μηχανισμό για τα κύτταρα και κατέχει βασικό ρόλο στη διαδικασία ρύθμισης της κυτταρικής πρωτεόστασης. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως ότι παρόλες

τις συστηματικές μελέτες, δεν έχει ποτέ διερευνηθεί εάν η ελαττωματική πρωτεϊνοσύνθεση επηρεάζει τους μηχανισμούς πρωτεόστασης στα κύτταρα.

Αρχικά, όσον αφορά στη ρύθμιση του πρωτεασώματος, τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης και ενδογενούς ενεργότητας του πρωτεασώματος στα πρώιμου σταδίου κύτταρα με ελαττωματική πρωτεϊνοσύνθεση φαίνεται να αυξάνονται, ένα γεγονός που πιθανόν συμβολίζει την επαγωγή του συγκεκριμένου μονοπατιού στα κύτταρα αυτά. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί ότι έντονη αύξηση της πρωτεασωματικής ενεργότητας παρατηρήθηκε σε κύτταρα, στα οποία απουσιάζει ο μεταγραφικός παράγοντας P53 σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες. Ανάλογα αποτελέσματα βρέθηκαν και στα A5 κακοήγη κύτταρα του μοντέλου χημικής καρκινογένεσης, στα οποία το P53 είναι απενεργοποιημένο. Οι παρατηρήσεις αυτές πιθανότητα υποδηλώνουν την αρνητική ρύθμιση του πρωτεασώματος από τον μεταγραφικό παράγοντα P53.

Σχετικά με το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος, στην κυτταρική σειρά Bst με την ελλειπή πρωτεϊνοσύνθεση παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας των καθεψινών B και L του λυσοσώματος σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα. Στις κυτταρικές σειρές p53KO και p53KO/Bst παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας των καθεψινών B και L του λυσοσώματος σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, με τα χαμηλότερα ποσοστά να εμφανίζονται στην κυτταρική σειρά p53KO/Bst. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι στα κύτταρα Bst με ελλειπή πρωτεϊνοσύνθεση, τα οποία εμφανίζουν χαμηλό πολλαπλασιαστικό δυναμικό, υπάρχει ενεργοποίηση της πρωτεολυτικής λειτουργίας του λυσοσώματος.

Η μελέτη των σχετικών επιπέδων γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης ανέδειξε την επαγωγή της πρωτεΐνης P62 στις κυτταρικές σειρές με ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση και η ρύθμισή της φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από το παράγοντα P53. Στο παρελθόν έχει δειχθεί πως ο παράγοντας P53 μπορεί να έχει διπλό ρόλο, είτε καταστέλλοντας είτε ενεργοποιώντας το μηχανισμό της αυτοφαγίας, ιδίως κατά την καρκινογένεση (Tasdemir et al., 2008). Ειδικότερα, ο P53 φαίνεται να ενεργοποιεί την αυτοφαγία μέσω P62-εξαρτώμενης καταστολής του μονοπατιού της γλυκόλυσης (Duan et al., 2015). Κατά συνέπεια, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες για τον κυτταρικό μεταβολισμό, καθώς συνδέεται άμεσα με τη ρύθμιση της αυτοφαγίας, αλλά και της πρωτεϊνοσύνθεσης και κατ' επέκταση της λειτουργίας του δικτύου πρωτεόστασης.

Στη συνέχεια, εξετάζοντας εάν το υπό μελέτη κυτταρικό μοντέλο εμφανίζει πρωτεϊνικά συσσωματώματα, διαπιστώσαμε αύξηση των δομών αυτών στις δύο κυτταρικές σειρές με ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες RPS4 και RPS6 βρέθηκε να συνεντοπίζονται στις δομές αυτές, γεγονός που καταδεικνύει τη μεγάλη σημασία της στοιχειομετρικής ισορροπίας των ριβοσωμικών πρωτεϊνών στο κύτταρο, όπου πτώση στα επίπεδα έστω και μιας, μπορεί να μειώσει την ικανότητα ή ακόμα και να καταστήσει τη μεταφραστική μηχανή μη λειτουργική (Naora and Naora, 1999).

Παράλληλα, εξετάσαμε την επίδραση της ανεπαρκούς πρωτεϊνοσύνθεσης στο οξειδωτικό φορτίο των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών και είδαμε ότι στην κυτταρική σειρά Bst φαίνεται να αυξάνονται σημαντικά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS. Το

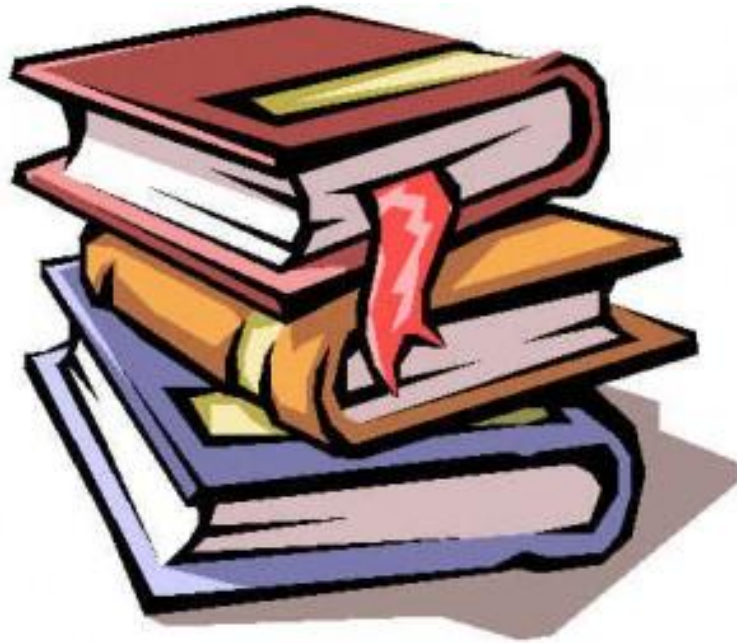
εύρημα αυτό ενισχύει το γεγονός ότι η ελλειπής πρωτεϊνοσύνθεση οδηγεί στην παραγωγή ROS στο κύτταρο, κάτι το οποίο έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία και επιπλέον έχει δειχθεί ότι ενεργοποιεί το μηχανισμό της αυτοφαγίας σε καρκινικά κύτταρα (Xie et al., 2012). Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να είναι P53-εξαρτώμενο, καθώς απαλοιφή του P53 οδηγεί σε μείωση των επιπέδων ROS.

Όπως προαναφέρθηκε, μέρος του δικτύου πρωτεόστασης αποτελούν και οι μοριακοί συνοδοί. Ειδικότερα, στην κυτταρική σειρά p53 KO/Bst παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπό μελέτη μοριακούς συνοδούς σε σχέση με τους φυσιολογικούς ινοβλάστες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι και μόνο η απενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα P53 επάγει την έκφραση των γονιδίων των μοριακών συνοδών, το οποίο πιθανότατα σημαίνει ότι το P53 άμεσα ή έμμεσα αναστέλλει αυτές τις αποκρίσεις.

Τέλος, ελέγχθηκε η βιωσιμότητα των κυτταρικών αυτών σειρών παρουσία αναστολέων του πρωτεασώματος και της αυτοφαγίας. Τα κύτταρα με την ανεπαρκή πρωτεϊνοσύνθεση φαίνεται να εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στον πρωτεασωμικό αναστολέα bortezomib σε σχέση με τα φυσιολογικά. Όσον αφορά στον αναστολέα αυτοφαγίας chloroquine παρατηρήθηκε πτώση της βιωσιμότητας των κυτταρικών σειρών με ελαττωματική πρωτεϊνοσύνθεση, με την κυτταρική σειρά Bst να εμφανίζει τη μεγαλύτερη μείωση, ένα αναμενόμενο ίσως αποτέλεσμα, καθώς φαίνεται ότι η συγκεκριμένη σειρά είναι σημαντικά εξαρτώμενη από το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος για την αποικοδόμηση ελαττωματικών πρωτεϊνών.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα μας τόσο στο κυτταρικό μοντέλο σταδιακής χημικής καρκινογένεσης όσο και στο κυτταρικό μοντέλο ελαττωματικής πρωτεϊνοσύνθεσης, δεικνύουν διαφορική έκφραση των πρωτεοστατικών μορίων, γεγονός που επισημαίνει τη σημασία του δικτύου πρωτεόστασης στη βιολογία και την εξέλιξη του καρκίνου. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες πρέπει να διεξαχθούν όσον αφορά στους συγκεκριμένους μηχανισμούς, προκειμένου να αποσαφηνιστούν πλήρως οι μηχανισμοί μέσω των οποίων το δίκτυο πρωτεόστασης εμπλέκεται στη διαδικασία της καρκινογένεσης.

V. Βιβλιογραφία



- 1) Adams, J., Palombella, V. J., Sausville, E. A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D. D., Elliott, P. J. (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Research*, 59(11), 2615–2622.
- 2) Arlt, A., Bauer, I., Schafmayer, C., Tepel, J., Mürköster, S. S., Brosch, M., Schäfer, H. (2009). Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene*, 28(45), 3983–3996.
- 3) Baird, T., Wek, R. (2012). Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 3(3), 307–321.
- 4) Barkic, M., Crnomarkovic, S., Grabusic, K., Bogetic, I., Panic, L., Tamarut, S., Volarevic, S. (2009). The p53 Tumor Suppressor Causes Congenital Malformations in Rpl24-Deficient Mice and Promotes Their Survival. *Molecular and Cellular Biology*, 29(10), 2489–2504.
- 5) Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, 78(2), 547–581.
- 6) Berkers, C. R., Verdoes, M., Lichtman, E., Fiebigler, E., Kessler, B. M., Anderson, K. C., Galardy, P. J. (2005). Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nature Methods*, 2(5), 357–362.
- 7) Boya, P., Reggiori, F., & Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology*, 15(7), 713–720.
- 8) Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- 9) Bragoszewski, P., Turek, M., & Chacinska, A. (2017). Control of mitochondrial biogenesis and function by the ubiquitin–proteasome system. *Open Biology*, 7(4).
- 10) Breusing, N., Arndt, J., Voss, P., Bresgen, N., Wiswedel, I., Gardemann, A., ... Grune, T. (2009). Inverse correlation of protein oxidation and proteasome activity in liver and lung. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(11–12), 748–753.
- 11) Bruyninckx, W. J., Mason, H. S., & Morse, S. A. (1978). Are physiological oxygen concentrations mutagenic? *Nature*. (27).
- 12) Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2010). Oxidative stress. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 25(3), 287–299.
- 13) Bywater, M. J., Poortinga, G., Sanij, E., Hein, N., Peck, A., Cullinane, C., Hannan, R. D. (2012). Inhibition of RNA Polymerase I as a Therapeutic Strategy to Promote Cancer-Specific Activation of p53. *Cancer Cell*, 22(1), 51–65.
- 14) Campisi, J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends in Cell Biology*, 11(11), 27–31.
- 15) Chen, Y., Podlevsky, J. D., Logeswaran, D., & Chen, J. J. (2018). A single nucleotide incorporation step limits human telomerase repeat addition activity. *The EMBO Journal*, 37(6).

- 16) Chondrogianni, N., & Gonos, E. S. (2005). Proteasome dysfunction in mammalian aging: Steps and factors involved. *Experimental Gerontology*, 40(12), 931–938.
- 17) Ciechanover, A. (2013). Intracellular protein degradation: From a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(12), 3400–3410.
- 18) Ciocca, D. R., & Calderwood, S. K. (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones*, 10(2), 86–103.
- 19) Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: Many paths to the same end. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263(1), 55–72.
- 20) D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813–824.
- 21) Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271–277.
- 22) Feng, J., Bussière, F., & Hekimi, S. (2001). Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Cell*, 1(5), 633–644.
- 23) Finch, C. E., & Tanzi, R. E. (1997). Genetics of aging. *Science*, 278(5337), 407–411.
- 24) Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending healthy life span - From yeast to humans. *Science*, 328(5976), 321–326.
- 25) Furukawa, M., & Xiong, Y. (2005). BTB Protein Keap1 Targets Antioxidant Transcription Factor Nrf2 for Ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 Ligase. *Molecular and Cellular Biology*, 25(1), 162–171.
- 26) Gerich, J. E. (2000). Physiology of glucose homeostasis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2(6), 345–350.
- 27) Glaumann, H. (1989). Crinophagy as a means for degrading excess secretory proteins in rat liver. *Revis Biol Celular*, 20, 97–110.
- 28) Glickman, M. H., & Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews*, 82(2), 373–428.
- 29) Godin, J. D., Creppe, C., Laguesse, S., & Nguyen, L. (2016). Emerging Roles for the Unfolded Protein Response in the Developing Nervous System. *Trends in Neurosciences*, 39(6), 394–404.
- 30) Gomes, A. V. (2013). Genetics of Proteasome Diseases. *Scientifica*, 2013, 637629.
- 31) Grune, T., Merker, K., Jung, T., Sitte, N., & Davies, K. J. A. (2005). Protein oxidation and degradation during postmitotic senescence. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(9), 1208–1215.
- 32) Gumeni, S., & Trougakos, I. P. (2016). Cross Talk of Proteostasis and Mitostasis in Cellular Homeodynamics, Ageing, and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–24.

- 33) Hanahan, Douglas, Robert a Weinberg, and San Francisco. 2000. "The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco" 100: 57–70.
- 34) Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5). Elsevier Inc.: 646–74.
- 35) Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Mizushima, N. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*, 441(7095), 885–889.
- 36) Harman, D. (1981). The aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(11), 7124–7128.
- 37) Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621.
- 38) Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J., & Sedivy, J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Molecular Cell*, 14(4), 501–513.
- 39) Holland, R., & Fishbein, J. C. (2010). Chemistry of the Cysteine Sensors in Kelch-Like ECH-Associated Protein 1. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(11), 1749–1761.
- 40) Iyer, L. M., Burroughs, A. M., & Aravind, L. (2006). The prokaryotic antecedents of the ubiquitin-signaling system and the early evolution of ubiquitin-like beta-grasp domains. *Genome Biology*, 7(7), R60.
- 41) Jacobson, J., Lambert, A. J., Portero-Otín, M., Pamplona, R., Magwere, T., Miwa, S., Partridge, L. (2010). Biomarkers of aging in Drosophila. *Aging Cell*, 9(4), 466–477.
- 42) Jain, A. K., & Jaiswal, A. K. (2007). GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *Journal of Biological Chemistry*, 282(22), 16502–16510.
- 43) Jeon, H. B., Choi, E. S., Yoon, J. H., Hwang, J. H., Chang, J. W., Lee, E. K., ... Yoo, Y. J. (2007). A proteomics approach to identify the ubiquitinated proteins in mouse heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(3), 731–736.
- 44) Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M. F., Quelle, D. E., Downing, J. R., Ashmun, R. A., Sherr, C. J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19(ARF). *Cell*, 91(5), 649–659.
- 45) Kaspar, J. W., Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2012). Retraction: Antioxidant-induced INrf2 (Keap1) tyrosine 85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the INrf2–Cul3–Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression. *Journal of Cell Science*, 125(4), 814–814.
- 46) Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2015). Proteostasis and aging. *Nature Medicine*, 21(12), 1406–1415.
- 47) Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 464(7288), 504–512.
- 48) Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., & Cuervo, A. (2004). Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell*, 11, 4829–4840.

- 49) Kimura, Y., & Tanaka, K. (2010). Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *Journal of Biochemistry*, 147(6), 793–798.
- 50) Kirkegaard, T., & Jäättelä, M. (2009). Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(4), 746–754.
- 51) Kirkin, V., McEwan, D. G., Novak, I., & Dikic, I. (2009). A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Molecular Cell*, 34(3), 259–269.
- 52) Knecht, E., Aguado, C., Cárcel, J., Esteban, I., Esteve, J. M., Ghislat, G., Sáez, R. (2009). Intracellular protein degradation in mammalian cells: Recent developments. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(15), 2427–2443.
- 53) Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., & Peter, M. (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nature Cell Biology*, 10(5), 602–610.
- 54) Kubiczкова, L., Pour, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., & Sevcikova, S. (2014). Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(6), 947–961.
- 55) Lee, J. W., Beebe, K., Nangle, L. A., Jang, J., Longo-Guess, C. M., Cook, S. A., Ackerman, S. L. (2006). Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature*, 443(7107), 50–55.
- 56) Lee, S. J., Silverman, E., & Bargman, J. M. (2011). The role of antimalarial agents in the treatment of SLE and lupus nephritis. *Nature Reviews Nephrology*, 7(12), 718–729.
- 57) Li, C., Chen, S., Yue, P., Deng, X., Lonial, S., Khuri, F. R., & Sun, S. Y. (2010). Proteasome inhibitor PS-341 (Bortezomib) induces calpain-dependent I κ B α degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(21), 16096–16104.
- 58) Livnat-Levanon, N., & Glickman, M. H. (2011). Ubiquitin-Proteasome System and mitochondria - Reciprocity. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(2), 80–87.
- 59) López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6).
- 60) Luzio, J. P., Pryor, P. R., & Bright, N. A. (2007). Lysosomes: Fusion and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), 622–632. Mair, W., & Dillin, A. (2008). Aging and Survival: The Genetics of Life Span Extension by Dietary Restriction. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 727–754.
- 61) Majeski, A. E., & Fred Dice, J. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(12), 2435–2444.
- 62) Margineantu, D. H., Emerson, C. B., Diaz, D., & Hockenbery, D. M. (2007). Hsp90 inhibition decreases mitochondrial protein turnover. *PLoS ONE*, 2(10).
- 63) Miron, K., Golan-Lev, T., Dvir, R., Ben-David, E., & Kerem, B. (2015). Oncogenes create a unique landscape of fragile sites. *Nature Communications*, 6(May), 1–7.
- 64) Moosmann, B., & Behl, C. (2008). Mitochondrially encoded cysteine predicts animal lifespan. *Aging Cell*, 7(1), 32–46.

- 65) Moriya, S., Komatsu, S., Yamasaki, K., Kawai, Y., Kokuba, H., Hirota, A., Miyazawa, K. (2015). Targeting the integrated networks of aggresome formation, proteasome, and autophagy potentiates ER stress-mediated cell death in multiple myeloma cells. *International Journal of Oncology*, 46(2), 474–486.
- 66) Nakka, V. P., Prakash-babu, P., & Vemuganti, R. (2016). Crosstalk Between Endoplasmic Reticulum Stress, Oxidative Stress, and Autophagy: Potential Therapeutic Targets for Acute CNS Injuries. *Molecular Neurobiology*, 53(1), 532–544.
- 67) Naora, H., & Naora, H. (1999). Involvement of ribosomal proteins in regulating cell growth and apoptosis: Translational modulation or recruitment for extraribosomal activity? *Immunology and Cell Biology*, 77(3), 197–205.
- 68) Nijman, S. M. B., Huang, T. T., Dirac, A. M. G., Brummelkamp, T. R., Kerkhoven, R. M., D'Andrea, A. D., & Bernards, R. (2005). The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the fanconi anemia pathway. *Molecular Cell*, 17(3), 331–339.
- 69) Niture, S. K., Jain, A. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Retraction: Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC- δ -mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *Journal of Cell Science*, 122(24), 4452–4464.
- 70) Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260), 23–28.
- 71) Odunuga, O. O., Hornby, J. A., Bies, C., Zimmermann, R., Pugh, D. J., & Blatch, G. L. (2003). Tetratricopeptide repeat motif-mediated Hsc70-mSTI1 interaction. Molecular characterization of the critical contacts for successful binding and specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(9), 6896–6904.
- 72) Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*, 41(1), 181–190.
- 73) Pelletier, J., Thomas, G., & Volarevi, S. (2017). Ribosome biogenesis in cancer: New players and therapeutic avenues. *Nature Reviews Cancer*, 18(1), 51–63.
- 74) Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Gygi, S. P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nature Biotechnology*, 21(8), 921–926.
- 75) Perls, T., Kunkel, L., & Puca, A. (2002). The genetics of Aging. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12, 362–369.
- 76) Pickart, C. M., & Eddins, M. J. (2004). Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.
- 77) R., D. D., & Wattiaux, C. (1966). FUNCTIONS OF LYSOSOMES. *Annual Review of Physiology*, 28(September), 435–492.
- 78) Ramirez, R. D., Morales, C. P., Herbert, B. S., Rohde, J. M., Passons, C., Shay, J. W., & Wright, W. E. (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes and Development*, 15(4), 398–403.

- 79) Reece, Jane B., Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, and Robert B. Jackson. 2011. *Campbell Biology, 9th Edition*. Edited by Beth Wilbur, Brady Golden, Logan Triglia, and Erin Gregg. 9th ed.
- 80) Riera, C. E., Merkwirth, C., De Magalhaes Filho, C. D., & Dillin, A. (2016). Signaling Networks Determining Life Span. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 35–64.
- 81) Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799–806.
- 82) Schmidt, M., & Finley, D. (2014). Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1843(1), 13–25.
- 83) Selman, C., & Withers, D. J. (2011). Mammalian models of extended healthy lifespan. *Royal Society Publishing*, 366(1561), 99–107.
- 84) Shalgi, R., Hurt, J. A., Krykbaeva, I., Taipale, M., Lindquist, S., & Burge, C. B. (2013). Widespread Regulation of Translation by Elongation Pausing in Heat Shock. *Molecular Cell*, 49(3), 439–452. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.028>
- 85) Shay, J., & Wright, W. (2000). Hayflick , his limit , and cellular ageing. *Nature*, 1, 72–76.
- 86) Shen, Guoxiang, and Ah Ng Kong. (2009). “Nrf2 Plays an Important Role in Coordinated Regulation of Phase II Drug Metabolism Enzymes and Phase III Drug Transporters.” *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 30 (7): 345–55.
- 87) Shibata, Y., & Morimoto, R. I. (2014). How the nucleus copes with proteotoxic stress. *Current Biology*, 24(10), 463–474.
- 88) Sklirou, A. D., Ralli, M., Dominguez, M., Papassideri, I., Skaltsounis, A. L., & Trougakos, I. P. (2015). Hexapeptide-11 is a novel modulator of the proteostasis network in human diploid fibroblasts. *Redox Biology*, 5, 205–215.
- 89) Sklirou, A., Papanagnou, E., Fokialakis, N., & Trougakos, I. (2018). Cancer chemoprevention via activation of proteostatic modules. *Cancer Lett*, 28(413), 110–121.
- 90) Smith, J. R., & Pereira-Smith, O. M. (1996). Replicative senescence: Implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science*, 273(5271), 63–67.
- 91) Sohal, S., & Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 273(5271), 59–63.
- 92) Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257(5074), 1220–1224.
- 93) Stern, S. T., Adiseshaiah, P. P., & Crist, R. M. (2012). Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and Fibre Toxicology*, 9(20), 1–15.
- 94) Stoler, A. B., Stenback, F., & Balmain, A. (1993). The conversion of mouse skin squamous cell carcinomas to spindle cell carcinomas is a recessive event. *Journal of Cell Biology*, 122(5), 1103–1117.
- 95) Sykiotis, G., & Bohmann, D. (2010). Stress-Activated Cap'n'collar Transcription Factors in Aging and Human Disease. *Science Signalling*, 3(112), 1–45.

- 96) Tanaka, K. (2013). The proteasome: From basic mechanisms to emerging roles. *Keio Journal of Medicine*.
- 97) Tavernarakis, N. (2007). Protein synthesis and aging: eIF4E and the soma vs. germline distinction. *Cell Cycle*, 6(10), 1168–1171.
- 98) Taylor, E. B., & Rutter, J. (2011). Mitochondrial quality control by the ubiquitin–proteasome system: Figure 1. *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1509–1513.
- 99) Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., & Miura, M. (2009). Genetic Evidence Linking Age-Dependent Attenuation of the 26S Proteasome with the Aging Process. *Molecular and Cellular Biology*, 29(4), 1095–1106.
- 100) Toussaint, O., Medrano, E. E., & Von Zglinicki, T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology*, 35(8), 927–945.
- 101) Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350–4354.
- 102) Tower, J. (2009). Hsps and aging. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(5), 216–222.
- 103) Troen, B. (2003). The biology of aging. *Mt Sinai J Med*, 70(1), 3–22.
- 104) Trougakos, I., Djeu, J., Gonos, E., & Boothman, D. (2009). Advances and challenges in basic and translational research on clusterin. *Cancer Res.*, 69(2), 403–406.
- 105) Trougakos, I. P., Sesti, F., Tsakiri, E., & Gorgoulis, V. G. (2013). Non-enzymatic post-translational protein modifications and proteostasis network deregulation in carcinogenesis. *Journal of Proteomics*, 92, 274–298.
- 106) Tsakiri, E. N., Gaboriaud-Kolar, N., Iliaki, K. K., Tchoumtchoua, J., Papanagnou, E.-D., Chatzigeorgiou, S., Trougakos, I. P. (2017). The Indirubin Derivative 6-Bromindirubin-3'-Oxime Activates Proteostatic Modules, Reprograms Cellular Bioenergetic Pathways, and Exerts Antiaging Effects. *Antioxidants & Redox Signaling*, 27(14), 1027–1047.
- 107) Tsakiri, E. N., Sykiotis, G. P., Papassideri, I. S., Terpos, E., Dimopoulos, M. A., Gorgoulis, V. G., Trougakos, I. P. (2013). Proteasome dysfunction in Drosophila signals to an Nrf2-dependent regulatory circuit aiming to restore proteostasis and prevent premature aging. *Aging Cell*, 12(5), 802–813.
- 108) Tsolou, A., Passos, J. F., Nelson, G., Arai, Y., & Zglinicki, T. von. (2008). ssDNA fragments induce cell senescence by telomere uncapping. *Experimental Gerontology*, 43(10), 892–899.
- 109) van Drie, John H. 2011. “Protein Folding, Protein Homeostasis, and Cancer.” *Chinese Journal of Cancer* 30 (2): 124–37.
- 110) Villeneuve, N. F., Lau, A., & Zhang, D. D. (2010). Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(11), 1699–1712.

- 111) Voutsadakis, I. A. (2017). Proteasome expression and activity in cancer and cancer stem cells. *Tumor Biology*, 39(3), 1–17.
- 112) Wolff, S., Weissman, J. S., & Dillin, A. (2014). Differential scales of protein quality control. *Cell*, 157(1), 52–64.
- 113) Wool, I. G., Chan, Y.-L., & Glück, A. (1995). Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochemistry and Cell Biology*, 73(11–12), 933–947.
- 114) Yorimitsu, T., & Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: Molecular machinery for self-eating. *Cell Death and Differentiation*, 12, 1542–1552.
- 115) Zoumpourlis, V., Solakidi, S., Papathoma, A., & Papaevangeliou, D. (2003). Alterations in signal transduction pathways implicated in tumour progression during multistage mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 24(7), 1159–1165.
- 116) Μαργαρίτης, Α. Χ., Β. Κ. Γαλανόπουλος, Κ. Ε. Κεραμάρης, Ε. Σ. Μαρίνος, Ι. Σ. Παπασιδέρη, Δ. Ι. Στραβοπόδης, and Ι. Π. Τρουγκάκος. 2008. *Βιολογία Κυττάρου*. 4η ed. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.