



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
-----ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837-----

Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ ΠΡΩΤΕΟΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ ΠΙΘΑΝΗ
ΑΝΤΙΓΗΡΑΝΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ»

ΞΑΝΘΙΠΠΗ ΛΟΥΚΑ
ΑΜ. 1113201500052

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

ΑΘΗΝΑ 2020

Στους γονείς μου

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία με θέμα «Μελέτη του δικτύου πρωτεόστασης και φυσικών προϊόντων με πιθανή αντιγηραντική δράση» εκπονήθηκε στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ) κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκου. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους ανθρώπους που κατά τη διάρκεια αυτού του έτους με στήριξαν και συνέβαλαν στην εξέλιξη μου ως βιολόγο αλλά και ως άνθρωπο.

Αρχικά, το πρώτο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στον *Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκο* για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριό του και για όλα τα εφόδια που μου προσέφερε. Επίσης, τον ευχαριστώ για τον χρόνο, που μου αφιέρωσε, και την στήριξή του όλο αυτό το διάστημα. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για την ενθάρρυνσή του να συνεχίσω στον τομέα της έρευνας.

Το δεύτερο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην αγαπημένη μου *Postdoc Αιμιλία Σκληρού*. Το ευχαριστώ είναι λίγο για όλα αυτά που μου έχει προσφέρει από την πρώτη στιγμή μέχρι και την τελευταία. Την ευχαριστώ πολύ, αρχικά, για το χρόνο που μου έχει αφιερώσει και για την υπομονή που έχει επιδείξει όλο αυτό το διάστημα. Ιδιαίτερα την ευχαριστώ για όλα τα εφόδια και τις γνώσεις, που μου έχει δώσει και που συνέβαλαν στο να εξελιχθώ ως βιολόγος. Επίσης, την ευχαριστώ για την ευκαιρία και την ώθηση που μου έδωσε να καλλιεργήσω την επιστημονική μου σκέψη. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για τη συμπαράστασή της και τη στήριξή της σε όλους τους τομείς. Τέλος, θέλω να την ευχαριστήσω για την όμορφη σχέση που έχουμε αναπτύξει πέρα από το ερευνητικό κομμάτι, τη φιλία της και τις υπέροχες και αξέχαστες στιγμές που περάσαμε αυτό τον χρόνο μαζί.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και σε όλα τα μέλη της ερευνητικής μας ομάδας «*Μοριακής-Κυτταρικής Γήρανσης και Καρκινογένεσης*», *Gumeni Sentiljana*, *Παπανάγνου Ελδήνα*, *Μανωλά Μαριλού*, *Ευαγγελάκου Ζωή*, *Γιαννιού Δέσποινα*, *Ραφελέτου Αλεξάνδρα*, *Λάμπρου Μαρία*, *Λώλου Ιωάννα*, *Δήμου Όλγα*, *Αθανασίου Γιώργος*, *Δρακάκη Αλεξάνδρα* και *Παπαθανασίου Αιμιλία*. Τους ευχαριστώ για το όμορφο κλίμα συνεργασίας και φιλίας, για την πολύτιμη βοήθεια και τις γνώσεις τους καθώς και τις υπέροχες στιγμές που μοιραστήκαμε. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα μέλη της κυτταροκαλλιέργειας *Γιαννιού Δέσποινα* και *Λώλου Ιωάννα*, για τη βοήθεια και τη στήριξή τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως ένα από τα νεότερα μέλη της ερευνητικής μας ομάδας, που είχα την τύχη να γνωρίσω, την *Αιμιλία Παπαθανασίου*. Την ευχαριστώ για τη φιλία της και για την όμορφη σχέση που έχουμε αναπτύξει. Την ευχαριστώ για τη χαρούμενη διάθεση που έφερνε στο εργαστήριο ακόμη και τις πιο δύσκολες μέρες, για το όμορφο κλίμα που δημιουργούσε και για τα χαμόγελα που μοίραζε. Επίσης, την ευχαριστώ για τις στιγμές και τις συζητήσεις που έχουμε μοιραστεί, τη στήριξή της σε όλα και τη διαρκή εμπύχωσή της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του *Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής* για το άψογο κλίμα και τη συνεργασία τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τα αδέρφια μου για την αγάπη τους και τη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Η συνεχής ηθική και ψυχολογική τους συμπαράσταση καθώς και η πίστη τους σε εμένα με βοήθησαν να φτάσω εδώ που είμαι σήμερα.

Ξανθίπη Λούκα

Οκτώβριος 2020

Περιεχόμενα

Περίληψη	1
Abstract	3
Συντομογραφίες	5
1. Εισαγωγή	9
1.1. Βιογένεση πρωτεϊνών	11
1.2. Δίκτυο πρωτεόστασης	12
1.2.1. Δίκτυο μοριακών συνοδών	14
1.2.2. Μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος	17
1.2.2.1. Μονοπάτι ουβικιτινίωσης	17
1.2.2.2. Πρωτεάσωμα	18
1.2.3. Μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος	22
1.2.4. Ρύθμιση του δικτύου πρωτεόστασης	23
1.3. Γήρανση	27
1.3.1. Ορόσημα της γήρανσης	28
1.3.2. Κυτταρική γήρανση	31
1.3.3. Χαρακτηριστικά γηρασμένων κυττάρων	32
1.3.4. Ρύθμιση της γήρανσης	34
1.3.5. Γήρανση και δίκτυο πρωτεόστασης	36
1.4. Φυσικά προϊόντα	38
1.5. Σκοπός	43
2. Υλικά και Μέθοδοι	45
2.1. Υλικά	47
2.1.1. Βιολογικό υλικό	47
2.1.1.1. Κυτταρικές σειρές	47
2.1.2. Υλικά κυτταροκαλλιέργειας	47
2.1.3. Χημικά αντιδραστήρια	47
2.1.4. Αντισώματα	49
2.1.5. PCR εκκινητές	49
2.1.6. Όργανα	50
2.2. Μέθοδοι	51
2.2.1. Κυτταροκαλλιέργειες	51
2.2.1.1. Διατήρηση και ανακαλλιέργεια κυττάρων	51
2.2.1.2. Απόψυξη και ψύξη των κυτταρικών σειρών	52
2.2.1.3. Μέτρηση αριθμού κυττάρων	52

2.2.2. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη δοκιμασία MTT	53
2.2.3. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	53
2.2.4. Μέτρηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος	54
2.2.5. Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των καθεψινών B και L του λυσοσώματος	55
2.2.6. Μέτρηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου	55
2.2.7. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης	56
2.2.7.1. Απομόνωση ολικού RNA	56
2.2.7.2. Σύνθεση cDNA	56
2.2.7.3. Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction, Q-RT-PCR)	57
2.2.8. Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης με ανοσοαποτύπωμα Western	57
2.2.8.1. Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης κυττάρων	58
2.2.8.2. Προετοιμασία των δειγμάτων και αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση	58
2.2.8.3. Μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη	59
2.2.8.4. Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών	59
2.2.8.5. Αποδέσμευση των αντισωμάτων από τη μεμβράνη	60
2.2.9. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων	60
3. Αποτελέσματα	61
3.1. Μελέτη του εκχύλισματος XTMm223-S2-BM	63
3.1.1. Το εκχύλισμα XTMm223-S2-BM δεν προκαλεί κυτταροτοξικότητα, προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες και μειώνει το οξειδωτικό φορτίο	63
3.1.2. Το εκχύλισμα XTMm223-S2-BM ενεργοποιεί τα στοιχεία του δικτύου πρωτεόστασης	67
3.2. Μελέτη του μορίου TM1-S3-LAEMB T89-100 P1	71
3.2.1. Διαφορική ευαισθησία των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών στο μόριο TM1-S3 LAEMB T89-100 P1	71
3.3. Μελέτη εκχυλισμάτων του φυτού <i>Cichorium intybus</i>	75
3.3.1. Διαφορική επίδραση των εκχυλισμάτων του φυτού <i>Cichorium intybus</i> στο οξειδωτικό φορτίο των κυττάρων και το δίκτυο πρωτεόστασης	75
4. Συζήτηση	79
5. Βιβλιογραφία	85

Περίληψη

Η διατήρηση της ομοιοδυναμικής ισορροπίας του πρωτεώματος, που ορίζεται ως πρωτεόσταση, είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία των κυττάρων και κατ' επέκταση για τη συνολική επιβίωση και υγεία του οργανισμού. Για τον λόγο αυτό, τα κύτταρα διαθέτουν ένα δίκτυο ελέγχου της πρωτεόστασης, που ονομάζεται δίκτυο πρωτεόστασης, και είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του συνόλου των πρωτεϊνών (πρωτέωμα) του κυττάρου. Βασικά συστατικά του δικτύου πρωτεόστασης αποτελούν οι μοριακές συνοδοί, τα μονοπάτια ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσοσώματος, καθώς και το μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2/KEAP1. Ένα από τα ορόσημα της γήρανσης, που συμμετέχει στον καθορισμό του γηρασμένου φαινοτύπου, είναι η απώλεια της πρωτεόστασης.

Παρά την πολύπλοκη φύση της διαδικασίας της γήρανσης, έχει προταθεί ότι τόσο η ποιότητα όσο και το προσδόκιμο ζωής των οργανισμών μπορούν να βελτιωθούν και να αυξηθούν μέσω γενετικών, διατροφικών και/ή φαρμακολογικών παρεμβάσεων. Ωστόσο, δεδομένου ότι οι γενετικές παρεμβάσεις και ο θερμιδικός περιορισμός δε μπορούν να εφαρμοστούν στον άνθρωπο, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μεγάλο ενδιαφέρον για την ανεύρεση φυσικών προϊόντων, που μπορούν να βελτιώνουν την ποιότητα ζωής και/ή να επεκτείνουν το προσδόκιμο ζωής. Τα φυσικά προϊόντα, εκχυλίσματα ή καθαρά μόρια, μπορούν να απομονωθούν από διάφορες πηγές της βιόσφαιρας, όπως φυτά, θαλάσσιους οργανισμούς ή μικροοργανισμούς. Υπάρχουν αρκετά φυσικά προϊόντα που έχουν μελετηθεί και έχουν βρεθεί να ενεργοποιούν τους παράγοντες του δικτύου πρωτεόστασης και πιθανόν να φέρουν αντι-γηραντικές ιδιότητες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Σκοπός της παρούσας εργασίας υπήρξε η μελέτη της επίδρασης επιλεγμένων φυσικών προϊόντων στα στοιχεία του δικτύου πρωτεόστασης, στα πλαίσια μιας εκτενούς μελέτης που αφορά στη σάρωση υψηλής απόδοσης (high-throughput screening) φυσικών προϊόντων με στόχο την ανίχνευση βιοδραστικών μορίων έναντι της κυτταρικής γήρανσης. Εστίασαμε τη μελέτη μας στο εκχύλισμα XTMm223-S2-BM και το μόριο TM1-S3 LAEMB T89-100 P1, τα οποία έχουν απομονωθεί από συμβιωτικούς μικροοργανισμούς θαλάσσιων ασπόνδυλων, τα οποία ζουν στη μεσοφωτική ωκεάνια ζώνη. Επίσης, μελετήσαμε τέσσερα εκχυλίσματα του φυτού *Cichorium intybus*, τα οποία έχουν απομονωθεί με διαφορετικό τρόπο εκχύλισης το καθένα.

Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι το εκχύλισμα XTMm223-S2-BM αποτελεί θετικό ρυθμιστή των μηχανισμών του δικτύου πρωτεόστασης και της αντιοξειδωτικής απόκρισης. Επίσης, βρέθηκε ότι μειώνει το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο και προστατεύει τα κύτταρα έναντι του οξειδωτικού και του γενοτοξικού στρες. Από τη μελέτη του μορίου TM1-S3 LAEMB T89-100 P1 παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ευαισθησία των καρκινικών κυτταρικών σειρών, που

υπερεκφράζουν κινάσες-στόχους του, σε σχέση με φυσιολογικά και αθανатоποιημένα κύτταρα, δεικνύοντας την πιθανή αντι-καρκινική του δράση. Συνεπώς, το συγκεκριμένο μόριο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ικρίωμα για τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη μορίων με πιθανή αντι-καρκινική δράση. Τέλος, από τη μελέτη διαφορετικών εκχυλισμάτων του φυτού *Cichorium intybus*, μόνο το εκχύλισμα που απομονώθηκε με την τεχνική επιταχυνόμενης εκχύλισης (με διαλύτη μείγμα αιθανόλης και νερού) οδήγησε σε μία τάση μείωσης του ενδοκυτταρικού οξειδωτικού φορτίου και αύξησης της κύριας πρωτεασωματικής ενεργότητας σε ανθρώπινα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα.

Συμπερασματικά, τα φυσικά προϊόντα, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο πιο εκτεταμένης έρευνας στο μέλλον, προκειμένου να γίνουν γνωστοί οι μηχανισμοί δράσης τους στα κύτταρα και οι επιπλέον ωφέλιμες ιδιότητες, που πιθανόν διαθέτουν.

Abstract

The integrity of proteome homeodynamics, which is called proteostasis, is vital for the cellular homeostasis and the organism's survival and health. Thus, cells have developed a quality control system, namely the proteostasis network, which is responsible for the maintenance of proteome functionality and stability. Key components of the proteostasis network are the molecular chaperones, the ubiquitin-proteasome and the autophagy-lysosome pathways, as well as the antioxidant responses pathway NRF2/KEAP1. Deregulation of proteostasis is one of the hallmarks of ageing and contributes to the ageing phenotype.

It is well established that both health- and life-span can be improved and prolonged by genetic, dietary and/or pharmacological interventions. However, given the fact that genetic interventions and caloric restriction cannot be applied in humans, many studies have been devoted to the identification of natural products that can improve healthspan and/or prolong lifespan. Natural products, extracts or pure compounds, can be isolated from different sources of the biosphere, like plants, marine organisms or microorganisms. Several natural products have been studied and found to activate the proteostasis network and, likely, exert anti-ageing properties both *in vitro* and *in vivo*.

Following an extensive high-throughput screening of natural products in order to identify bioactive molecules against cellular senescence, **the aim of this thesis** was the study of the effect of selected natural products on proteostatic modules. Our study was focused on the extract XTMm223-S2-BM and the pure compound TM1-S3 LAEMB T89-100 P1, which have been isolated from microbial symbionts of invertebrates that live in marine mesophotic coral ecosystems. Furthermore, we studied four extracts from the plant *Cichorium intybus*, each one isolated with a different method of extraction.

Our findings support that the extract XTMm223-S2-BM is a positive modulator of the proteostasis network and of antioxidant responses. Furthermore, we observed that the extract reduces intracellular oxidative load and protects cells from oxidative and genotoxic stress. Regarding the compound TM1-S3 LAEMB T89-100 P1, we found that cancer cell lines overexpressing key kinases-targets of the molecule are more sensitive to it than normal or immortalized cell lines, indicating its potential anti-cancer activity. Therefore, this compound could be used as a scaffold for the design and development of molecules with potential anti-cancer activity. Finally, with reference to the study of the extracts of the plant *Cichorium intybus*, only one of them, the extract which was isolated with the accelerated solvent extraction method, tended to reduce the oxidative load and increase the main proteasome enzymic activity in human immortalized keratinocytes.

In conclusion, the natural products presented in the current work could be investigated more extensively in the future, in order to find out the mechanisms of their action in cells and the beneficial properties that they may possess.

Συντομογραφίες

AGEs	Advanced glycation end products (τελικά προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης)
AMPK	AMP-activated kinase (κινάση ενεργοποιούμενη από το AMP)
AREs	Antioxidant response elements (στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης)
ATF6	Activating transcription factor-6
ATG	Autophagy-related
ATP	Adenosine triphosphate (τριφωσφορική αδενοσίνη)
BSA	Bovine serum albumin (αλβουμίνη ορού βοός)
CDKs	Cyclin-dependent kinases (κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες)
CHIP	Carboxyl terminus of HSP70 interacting protein
CO ₂	Carbon dioxide (διοξείδιο του άνθρακα)
CUL3	Cullin 3-dependent E3 ligase
DDR	DNA damage response (απόκριση σε βλάβες του γονιδιώματος)
dH ₂ O	Distilled water (απεσταγμένο νερό)
DMSO	Dimethyl sulfoxide (διμεθυλοσουλφοξείδιο)
DUBs	Deubiquitinating enzymes (ένζυμα απο-ουβικιτινίωσης)
EPMs	Enzymatic protein modifications (ενζυμικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών)
EpREs	Electrophile response elements (στοιχεία απόκρισης σε ηλεκτρόφιλο στρες)
ERAD	ER-associated degradation (αποικοδόμηση που σχετίζεται με το ενδοπλασματικό δίκτυο)
FBS	Fetal bovine serum (ορός εμβρύου βοός)
FOXO	Forkhead box O
GSK3	Glycogen synthase kinase 3 (κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου 3)
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide (υπεροξείδιο του υδρογόνου)
HDAC6	Microtubule-associated histone deacetylase 6
HECT	Homologous to E6-AP terminus
HSE	Heat shock elements (στοιχεία θερμικού σοκ)
HSF1	Heat shock factor 1
HSPs	Heat shock proteins (πρωτεΐνες θερμικού σοκ)

HSR	Heat shock response (απόκριση σε θερμικό σοκ)
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IIS	Insulin/insulin-like growth factor signaling
IRE1	Inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
MAF	Musculoaponeurotic fibrosarcoma
mTOR	Mechanistic target of rapamycin (στόχος της ραπαμυκίνης)
NEPMs	Non-enzymatic protein modifications (μη ενζυμικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών)
NPs	Natural products (φυσικά προϊόντα)
NRF2	Nuclear factor-erythroid 2 like 2, NFE2L2
OMMAD	Outer mitochondrial membrane-associated degradation (αποικοδόμηση που σχετίζεται με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη)
OxR	Oxidative stress response (απόκριση σε οξειδωτικό στρες)
PBS	Phosphate-Buffered Saline (διάλυμα φωσφορικών αλάτων)
PDR	Proteome damage response (απόκριση στο πρωτεοτοξικό στρες)
PERK	PKR-activated protein kinase-like eukaryotic initiation factor 2 kinase
PN	Proteostasis network (δίκτυο πρωτεόστασης)
Q-RT-PCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης παγματικού χρόνου)
RAC	Ribosome-associated complex (σύμπλοκο που σχετίζεται με το ριβόσωμα)
RING	Really interesting new gene
RNS	Reactive Nitrogen Species (δραστικές μορφές αζώτου)
ROS	Reactive Oxygen Species (δραστικές μορφές οξυγόνου)
SAHFs	Senescence-associated heterochromatin foci (εστίες ετεροχρωματίνης σχετιζόμενες με τη γήρανση)
SASP	Senescence-associated secretory phenotype (εκκριτικός φαινότυπος που σχετίζεται με τη γήρανση)
SA-β-gal	Senescence-Associated β-galactosidase assay (ειδική για τη γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης)
SDFs	Senescence-associated DNA-damage foci (εστίες βλάβης του DNA σχετιζόμενες με τη γήρανση)

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου)
SQSTM1/p62	Sequestosome 1
TBS-T	Tris-Buffered Saline - Tween-20
Ub	Ubiquitin (ουβικιτίνη)
UPP	Ubiquitin-proteasome pathway (μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος)
UPR	Unfolded protein response (απόκριση σε μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες)
v/v	Volume per volume (όγκος κατ' όγκο)
w/v	Weight per volume (βάρος κατ' όγκο)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εισαγωγή

1.1. Βιογένεση πρωτεϊνών

Τα ανθρώπινα κύτταρα περιέχουν περισσότερα από 10.000 πρωτεϊνικά μόρια. Το σύνολο των πρωτεϊνών ενός κυττάρου ορίζεται ως πρωτέωμα και η σύσταση του πρωτεώματος διαφέρει ανάμεσα στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων και ιστών (Hipp, Kasturi, and Hartl 2019). Οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια ως προς το μέγεθος, το σχήμα, τη σταθερότητα και τη διάρκεια ζωής τους. Η σύνθεση των πρωτεϊνών είναι μια πολύ αποτελεσματική διαδικασία, που απαιτεί την κατανάλωση αρκετών μορίων ATP, γεγονός που την καθιστά την πιο ενεργειακά ακριβή διαδικασία στο κύτταρο. Η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης εξασφαλίζεται από τον μηχανισμό ελέγχου ποιότητας του ριβοσώματος, ο οποίος ελέγχει ένα σύνολο παραμέτρων, όπως τη σύνθεση και την ακεραιότητα του ριβοσώματος, την ποιότητα του mRNA, τη διαλογή και χρήση των κατάλληλων tRNA, το ρυθμό της μετάφρασης, την πρόσδεση των μοριακών συνοδών στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα, καθώς και τη συ-μεταφραστική αναδίπλωση/αποικοδόμηση κάποιων πρωτεϊνών (Wolff, Weissman, and Dillin 2014).

Μια νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη βρίσκεται σε μια ευαίσθητη κατάσταση, καθώς είναι επιρρεπής σε ακατάλληλες αλληλεπιδράσεις, μη σωστή αναδίπλωση και συσσωμάτωση. Γι' αυτό οι αναδυόμενες αλυσίδες οδηγούνται στην ωρίμανσή τους μέσω της δράσης μοριακών συνοδών, τροποποιητικών ενζύμων, παραγόντων στόχευσης και βοηθητικών παραγόντων (Morimoto et al. 2011). Σε αντίθεση με τη μετάφραση, η αναδίπλωση και η διατήρηση της τρισδιάστατης, λειτουργικής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών είναι λιγότερο αποτελεσματικές διαδικασίες και πραγματοποιούνται με τη δράση των μοριακών συνοδών (Wolff et al. 2014).

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες ανάλογα με τον λειτουργικό ρόλο τους υφίστανται διαμορφωτικές αλλαγές, όπως αναδίπλωση, συναρμολόγηση, αποσυναρμολόγηση, καθώς και μετακίνηση σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Όλες αυτές οι διαδικασίες απαιτούν περιορισμένες ή ολοκληρωτικές δομικές επαναδιευθετήσεις στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, που συχνά έχουν ως αποτέλεσμα την προσωρινή έκθεση υδρόφοβων πρωτεϊνικών επικρατειών, οι οποίες συνήθως βρίσκονται μέσα στον πυρήνα της πρωτεΐνης και έχουν την τάση για συσσωμάτωση. Επίσης, ενδοκυττάριοι και εξωκυττάριοι στρεσογόνοι παράγοντες επηρεάζουν τη σταθερότητα της πρωτεϊνικής διαμόρφωσης, οδηγώντας την πρωτεΐνη σε βλάβη, ξεδίπλωμα, εναλλακτικές διαμορφώσεις ή/και συσσωμάτωση. Αυτές οι καταστάσεις έχουν συσχετιστεί με μια ποικιλία ασθενειών, που είναι γνωστές ως ασθένειες πρωτεϊνικής διαμόρφωσης, και περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τον καρκίνο, νευροεκφυλιστικά νοσήματα καθώς και ανοσολογικές και

μεταβολικές ασθένειες. Ένα κοινό χαρακτηριστικό αυτών των ασθενειών είναι το υψηλό ποσοστό εμφάνισης στις μεγαλύτερες ηλικίες, καθώς και το γεγονός ότι η γήρανση θεωρείται ένας κύριος παράγοντας κινδύνου. Για να αποφευχθούν, λοιπόν, τέτοιες ανεπιθύμητες καταστάσεις είναι αναγκαία η ύπαρξη ενός δικτύου ελέγχου της πρωτεωμικής σταθερότητας στο κύτταρο (Morimoto and Cuervo, 2014).

1.2 Δίκτυο πρωτεόστασης

Η ομοιοδυναμική ισορροπία του πρωτεώματος, που ονομάζεται πρωτεόσταση, αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη λειτουργικότητα του κυττάρου και συνεπώς για τη συνολική διάρκεια υγιούς ζωής του οργανισμού (Tsakiri and Trougakos, 2015; Hipp et al., 2019). Προκειμένου να διατηρηθεί η πρωτεόσταση και να αποφευχθούν οι καταστροφικές συνέπειες ενός ασταθούς πρωτεώματος, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα σύνολο αλληλοεξαρτώμενων συστημάτων, που αποτελούν το δίκτυο πρωτεόστασης (Proteostasis network, PN). Το δίκτυο πρωτεόστασης περιλαμβάνει διάφορες πρωτεϊνικές μηχανές, όπως ο μηχανισμός της μετάφρασης, τα ένζυμα διπλώματος των πρωτεϊνών, στοιχεία υπεύθυνα για την ενδοκυτταρική μετακίνηση μορίων, τις μοριακές συνοδούς και τα μονοπάτια πρωτεόλυσης (Tsakiri and Trougakos, 2015). Όλα αυτά τα στοιχεία συνδυάζουν τη σύνθεση πρωτεϊνών με το δίπλωμα των πολυπεπτιδίων, τη συντήρηση της πρωτεϊνικής διαμόρφωσης και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (Hipp et al. 2019). Επικουρικά στοιχεία του δικτύου πρωτεόστασης θεωρούνται ένα σύνολο μεταγραφικών παραγόντων μικρής διάρκειας ζωής (HSF1, FOXO, NRF2), τα μόρια τροποποίησης της χρωματίνης, ένα σύνολο σηματοδοτικών μονοπατιών, παράγοντες μεταβολισμού καθώς και ρυθμιστές των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Labbadia and Morimoto, 2015) (Εικ. 1).

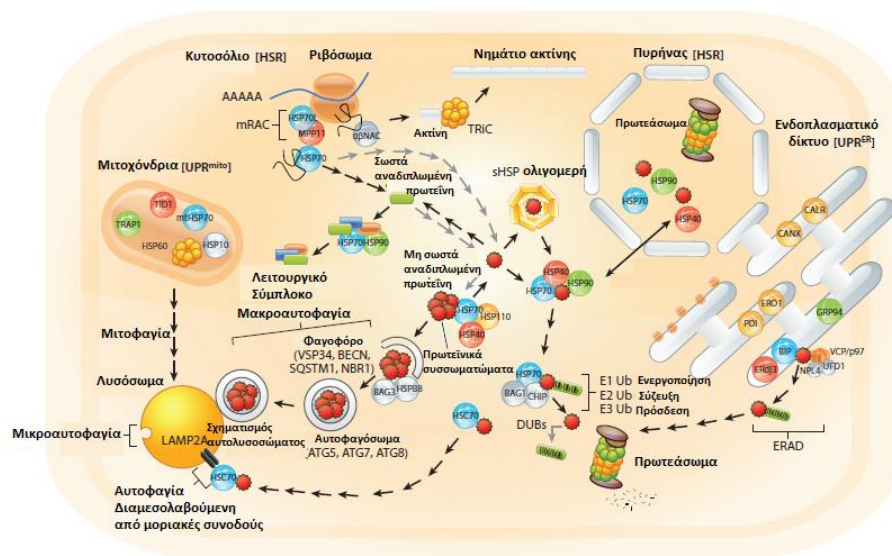
Μέσα στο κύτταρο, υπάρχουν διαμερισματοποιημένα στοιχεία του δικτύου πρωτεόστασης, τα οποία είναι προσαρμοσμένα τόσο στις ειδικές βιοχημικές και λειτουργικές ιδιότητες του πρωτεώματος κάθε υποκυτταρικού διαμερίσματος, όσο και στο εκάστοτε υποκυτταρικό περιβάλλον. Αυτά εντοπίζονται στο κυτοσόλιο, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα και συνεργάζονται μεταξύ τους, προκειμένου να επιβλέπουν και να διατηρούν συνολικά την πρωτεόσταση του κυττάρου (Labbadia and Morimoto, 2015). Τα συστατικά του δικτύου πρωτεόστασης έχουν διευρυνθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης παράλληλα με την αύξηση της πολυπλοκότητας και της ποικιλομορφίας του πρωτεώματος (Sala, Bott, and Morimoto 2017). Δεδομένης της ύπαρξης διακριτών ιστοειδικών πρωτεωμάτων, έχει αποδειχθεί η ύπαρξη διακριτών δικτύων πρωτεόστασης στους διάφορους ιστούς (Klaips, Jayaraj, and Hartl 2018). Πράγματι, μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η έκφραση των γονιδίων του δικτύου πρωτεόστασης είναι αρκετά ετερογενής ανάμεσα στους διάφορους ιστούς (Labbadia and Morimoto, 2015). Αυτό είναι λογικό, αφού η σύνθεση και η

λειτουργικότητα του δικτύου πρωτεόστασης πρέπει να προσαρμόζεται στις ανάγκες του κάθε τύπου κυττάρου και ιστού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ενήλικης ζωής και πιθανόν εγκαθιδρύεται νωρίς κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης (Sala et al. 2017).

Το δίκτυο πρωτεόστασης είναι υπεύθυνο για τον έλεγχο ποιότητας του πρωτεώματος, καθώς και για τις αποκρίσεις σε καταστάσεις πρωτεοτοξικού στρες. Οι παραπάνω διεργασίες επιτυγχάνονται μέσω ελέγχου της πρωτεωμικής σύνθεσης, αναδίπλωσης, διατήρησης της διαμόρφωσης και ανακύκλωσης, καθώς και μέσω ενεργοποίησης των αποκρίσεων πρωτεωμικής βλάβης (Tsakiri and Trougakos, 2015; Klaips et al., 2018). Έτσι, το δίκτυο πρωτεόστασης διαιρείται λειτουργικά σε τέσσερα τμήματα, που αποτελούνται από παράγοντες που συμμετέχουν στις εξής κύριες διαδικασίες: α) την πρωτεϊνική σύνθεση, που ελέγχεται από το ριβόσωμα και τους σχετικούς παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν τη σύνθεση της νεοσυντιθέμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας, β) την αναδίπλωση και τη διατήρηση της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών, στις οποίες συμμετέχουν συ-μεταφραστικά και μετα-μεταφραστικά οι μοριακές συνοδοί, γ) τη μετακίνηση των πρωτεϊνών στο κυτοσόλιο, κατά μήκος βιολογικών μεμβρανών και τα υποκυτταρικά διαμερίσματα και δ) την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών από τα μονοπάτια ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσosώματος καθώς και από τις κυτταρικές πρωτεάσες. Οι μοριακές συνοδοί και οι ρυθμιστικοί συμπαραγόντες τους δρουν σαν σύνδεσμοι για όλες αυτές τις διαδικασίες (Sala et al., 2017; Klaips et al., 2018). Η πρωτεϊνική σύνθεση πρέπει να προσαρμόζεται στην ικανότητα του κυττάρου για πρωτεϊνική αναδίπλωση, έτσι ώστε να αποφεύγεται η συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (Klaips et al. 2018).

Το δίκτυο πρωτεόστασης εξασφαλίζει ότι οι σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες παράγονται τη σωστή χρονική στιγμή και στο σωστό κυτταρικό σημείο και σε ποσότητες, που επιτρέπουν τη στοιχειομετρική συναρμολόγηση στην περίπτωση ολιγομερών πρωτεϊνικών συμπλόκων. Επίσης, αποτρέπει το μη σωστό δίπλωμα των πρωτεϊνών, καθώς και τη συσσωμάτωσή τους, ενώ εξασφαλίζει ότι οι περιττές και οι μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες απομακρύνονται είτε μέσω αυτοφαγίας είτε μέσω αποικοδόμησης στο πρωτεάσωμα (Hipp et al. 2019). Για τη λειτουργικότητα του δικτύου πρωτεόστασης σημαντικό ρόλο παίζουν οι μοριακές συνοδοί και τα δύο κύρια πρωτεολυτικά μονοπάτια, το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος (Tsakiri and Trougakos, 2015). Αυτά τα στοιχεία καθορίζουν την «τύχη» των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, δηλαδή αν θα επαναδιπλωθούν στη φυσιολογική σταθερή τους διαμόρφωση είτε θα απομακρυνθούν από το κύτταρο μέσω πρωτεόλυσης (Kaushik and Cuervo, 2015). Τα δύο πρωτεολυτικά μονοπάτια μοιράζονται υποστρώματα, παράγοντες και ρυθμιστές και συντονίζονται λειτουργικά από διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης, τα οποία

αντιλαμβάνονται και αντιδρούν σε ανισορροπίες της πρωτεόστασης (Kaushik and Cuervo, 2015; Klaipts et al., 2018).



Εικόνα 1. Επισκόπηση του δικτύου πρωτεόστασης. Το δίκτυο πρωτεόστασης πρέπει να εξασφαλίζει τη σταθερότητα του πρωτεώματος σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα. Μοριακές συνοδοί, όπως οι HSP70 και HSP90, βρίσκονται σε όλα τα κύρια κυτταρικά διαμερίσματα και συνεργάζονται με συνμοριακές συνοδούς για να προάγουν την αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων, τη συναρμολόγηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων, την αναδίπλωση των λανθασμένα αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, ή την αποικοδόμηση των μη σωστά αναδιπλωμένων υποστρωμάτων από το πρωτεάσωμα. Ορισμένες μοριακές συνοδοί και συνμοριακές συνοδοί εκτελούν εξειδικευμένες λειτουργίες σε κάθε κυτταρικό διαμέρισμα. Παρουσία λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών, μονοπάτια απόκρισης στο στρες, όπως η απόκριση σε θερμικό σοκ (Heat Shock Response, HSR) και οι αποκρίσεις σε μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Unfolded Protein Response of ER, UPR^{ER}) και τα μιτοχόνδρια (Unfolded Protein Response of mitochondria, UPR^{mito}), μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα των μοριακών συνοδών. Περιστασιακά, οι λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες μπορούν να σχηματίσουν συσσωματώματα, τα οποία μπορεί να είναι επιβλαβή για τα κύτταρα. Τα γκρι βέλη υποδεικνύουν μονοπάτια που πρέπει να εμφανίζονται μόνο σε χαμηλά επίπεδα στα υγιή κύτταρα (Προσαρμογή από Labbadia and Morimoto, 2015).

1.2.1 Δίκτυο μοριακών συνοδών

Ως μοριακή συνοδός ορίζεται η πρωτεΐνη, η οποία αλληλεπιδρά και βοηθάει στην αναδίπλωση, συναρμολόγηση και διατήρηση της διαμόρφωσης μιας άλλης πρωτεΐνης χωρίς να αποτελεί η ίδια τμήμα της τελικής δομής της (Klaipts et al., 2018). Η οικογένεια των

μοριακών συνοδών διαχωρίζεται στις μικρές πρωτεΐνες θερμικού σοκ (small Heat Shock Proteins, sHSPs), οι οποίες είναι ATP-ανεξάρτητες, και στις μοριακές συνοδούς που εξαρτώνται από κατανάλωση ενέργειας, όπως οι HSP60, HSP70, HSP90 και HSP40. Οι μοριακές συνοδοί αναγνωρίζουν εκτεθειμένα υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα και άμορφους πολυπεπτιδικούς σκελετούς στις πρωτεΐνες-στόχους τους, τα οποία χαρακτηρίζουν τις μη-φυσιολογικές διαμορφώσεις (Niforou et al., 2014). Η έκθεση υδρόφοβων αμινοξικών καταλοίπων ή μη συζευγμένων β-κλώνων έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση πεπτιδίων με μη φυσιολογική διαμόρφωση. Η συσσώρευση αυτή, πέρα από το ότι μπορεί να αποβεί τοξική για το κύτταρο, απομακρύνει τις πρωτεΐνες από τη δεξαμενή των λειτουργικών μορίων και οδηγεί στη μείωση της λειτουργίας των συσσωρευμένων πρωτεϊνών.

Για να αποφευχθεί ο σχηματισμός πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, τα οποία είναι υπεύθυνα για πολλές ασθένειες, το δίκτυο πρωτεόστασης διαθέτει τις μοριακές συνοδούς, οι οποίες εξασφαλίζουν τη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, τη συντήρηση της διαμόρφωσής τους και συνεργάζονται με τα πρωτεολυτικά μονοπάτια στην αναγνώριση των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και στη στόχευσή τους για αποικοδόμηση (Hipp et al. 2019). Οι μοριακές συνοδοί δρουν είτε μόνες τους είτε σε διάφορους συνδυασμούς με διαφορετικές συνμοριακές συνοδούς (Labbadia and Morimoto, 2015) και εντοπίζονται σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα, όπως τον πυρήνα, το κυτοσόλιο, τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο, καθώς επίσης και στην εξωκυττάρια μήτρα (Niforou, Cheimonidou, and Trougakos 2014).

Πολλές πρωτεΐνες, και ιδιαίτερα εκείνες με πιο πολύπλοκη δομή ή εκείνες με πολλαπλές επικράτειες, απαιτούν τη συμβολή των μοριακών συνοδών, προκειμένου να αναδιπλωθούν αποτελεσματικά και στο σωστό βιολογικά χρόνο (Labbadia and Morimoto, 2015). Οι μοριακές συνοδοί εξασφαλίζουν τη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης-στόχου σε ένα πολυπληθές κυτταρικό περιβάλλον και διατηρούν τις πρωτεΐνες σε μια διαλυτή, μη συναθροιστική κατάσταση. Η αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών με τη συμβολή των μοριακών συνοδών μπορεί να γίνει με ή χωρίς την κατανάλωση ATP και πραγματοποιείται είτε συ-μεταφραστικά είτε μετα-μεταφραστικά (Klaips et al. 2018).

Συνεπώς, υπάρχουν μοριακές συνοδοί που δρουν στο ριβόσωμα, προκειμένου να αποτρέψουν την πρόωμη ή τη μη σωστή αναδίπλωση των αναδυόμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων και να συμβάλλουν στη συ-μεταφραστική αναδίπλωση τους (Klaips et al., 2018; Hipp et al., 2019). Για παράδειγμα, η μοριακή συνοδός HSP70 στρατολογείται στα νεοσυντιθέμενα πολυπεπίδια από το σύμπλοκο που σχετίζεται με το ριβόσωμα (Ribosome-Associated Complex, RAC). Το σύμπλοκο αυτό προσδένεται κοντά στο σημείο εξόδου του ριβοσώματος και ενεργοποιεί την πρόσδεση της HSP70 στο αναδυόμενο πολυπεπίδιο, προκειμένου να αποτραπεί η μη σωστή αναδίπλωση και να διατηρηθεί το πολυπεπίδιο σε

μια μη αναδιπλωμένη κατάσταση μέχρι να είναι διαθέσιμα τα απαραίτητα στοιχεία για μία αποτελεσματική αναδίπλωση (Klaips et al., 2018). Η συνμοριακή συνοδός HSP40 βοηθάει στη στρατολόγηση της HSP70 στο ριβόσωμα (Sala et al. 2017).

Η συμβολή των μοριακών συνοδών είναι, επίσης, απαραίτητη για τη διατήρηση της λειτουργικής διαμόρφωσης μιας πρωτεΐνης, καθώς και για τη συναρμολόγηση ολιγομερών πρωτεϊνικών συμπλόκων (Klaips et al. 2018). Για τις πρωτεΐνες, οι οποίες πρέπει να μεταφερθούν από τη θέση σύνθεσής τους σε κάποιο συγκεκριμένο υποκυτταρικό διαμέρισμα, με εξαίρεση εκείνες που προορίζονται για τον πυρήνα και τα υπεροξυσώματα, οι μοριακές συνοδοί συμβάλλουν στην αποτροπή της πρόωγης αναδίπλωσής τους πριν μεταφερθούν στο διαμέρισμα-στόχο (οργανίδιο ή μεμβράνη) (Hipp et al. 2019).

Ορισμένες μοριακές συνοδοί, όπως οι HSP70 και HSP90 που είναι αρκετά άφθονες πρωτεΐνες στα κύτταρα, εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των μη αναδιπλωμένων, λανθασμένα αναδιπλωμένων και συσσωματωμένων πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα (Tsakiri and Trougakos, 2015; Labbadia and Morimoto, 2015). Η μοριακή συνοδός HSP70 αποτελείται από μια καρβοξυτελική επικράτεια, η οποία αναγνωρίζει και προσδένει μικρές υδρόφοβες αλληλουχίες περίπου επτά αμινοξικών καταλοίπων της αναδύμενης πρωτεΐνης-στόχου, και μια αμινοτελική επικράτεια με ενεργότητα ATPάσης. Η συγγένεια της καρβοξυτελικής επικράτειας για την πρωτεΐνη-στόχο ρυθμίζεται από την πρόσδεση και υδρόλυση του ATP στην αμινοτελική επικράτεια. Η πρόσδεση και η υδρόλυση του ATP προκαλούν αλλαγές στη διαμόρφωση της μοριακής συνοδού με αποτέλεσμα την πρόσδεση του υποστρώματός της σε αυτή. Μερικές φορές, αρκετοί κύκλοι πρόσδεσης και απελευθέρωσης της πρωτεΐνης-υποστρώματος από την HSP70 απαιτούνται για την ολοκλήρωση της αναδίπλωσης/επαναδίπλωσής της (Niforou et al., 2014; Klaips et al., 2018).

Στην περίπτωση που η αναδίπλωση/επαναδίπλωση του υποστρώματος δεν είναι εφικτή, η συν-μοριακή συνοδός CHIP (Carboxyl terminus of HSP70-Interacting Protein), που είναι μια E3 λιγάση ουβικιτίνης, αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο της HSP70 και προωθεί την ουβικιτινίωση τόσο του υποστρώματος όσο και της αντίστοιχης μοριακής συνοδού, και έτσι τα ανακατευθύνει προς το πρωτεάσωμα για αποικοδόμηση (Niforou et al., 2014). Η αποικοδόμηση αυτή μπορεί να συμβεί και στα λυσοσώματα μέσω αποικοδόμησης που μεσολαβείται από μοριακές συνοδούς (Klaips et al. 2018). Συνεπώς, οι HSP70 και HSP90 είναι σημαντικές στη διαδικασία διαλογής πρωτεϊνών για επαναδίπλωση ή εξάλειψη. Η ειδικότητα και οι λειτουργικές ιδιότητες των HSP70 και HSP90 επηρεάζονται από αλληλεπιδράσεις με μια ποικιλία συνμοριακών συνοδών. Η λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ των μοριακών συνοδών και του πρωτεασώματος δεν περιορίζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα, αλλά συμβαίνει, επίσης, και στο ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια (Labbadia and Morimoto, 2015; Tsakiri and Trougakos, 2015).

1.2.2. Μονοπάτι ουβικιτίνης- πρωτεασώματος

Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση φυσιολογικών πρωτεϊνών μικρού χρόνου ημιζωής, ρυθμιστικών πρωτεϊνών, καθώς και μη αναδιπλωμένων ή λανθασμένα αναδιπλωμένων, διαλυτών πρωτεϊνών. Έτσι, εξασφαλίζει τη σταθερότητα του πρωτεώματος σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα, όπως ο πυρήνας, το κυτοσόλιο, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια, καθώς και στον εξωκυττάριο χώρο. Το μονοπάτι αυτό αποτελείται από τα ένζυμα ενεργοποίησης-σύζευξης της ουβικιτίνης και το πρωτεάσωμα. Το σήμα αναγνώρισης για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα είναι μια αλυσίδα από τουλάχιστον τέσσερα μόρια ουβικιτίνης, που είναι συνδεδεμένη στις πρωτεΐνες-υποστρώματα. Τα ουβικιτινωμένα πολυπεπτίδια αποικοδομούνται από το 26S πρωτεάσωμα, ενώ τα μη φυσιολογικά οξειδωμένα πολυπεπτίδια αποικοδομούνται από το 20S πρωτεάσωμα μέσω στόχευσης από τις μοριακές συνοδούς, με μια διαδικασία ανεξάρτητη από το ATP και την ουβικιτινίωση (Schmidt and Finley, 2014; Vilchez et al., 2014). Επίσης, το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος ελέγχει πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως τη μεταγωγή σήματος, τον κυτταρικό θάνατο, ανοσολογικές αποκρίσεις, το μεταβολισμό, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και την ανάπτυξη (Trouwakos et al. 2013) (Εικ. 2).

1.2.2.1. Μονοπάτι ουβικιτινίωσης

Η ουβικιτίνη είναι μια πρωτεΐνη με 76 αμινοξικά κατάλοιπα. Τα μόρια της ουβικιτίνης μπορούν να σχηματίσουν διάφορες αλυσίδες με σύνδεση ανάμεσα σε 7 συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσίνης, καθώς επίσης και μέσω σύντηξης της μεθειονίνης του αμινοτελικού άκρου του ενός μορίου ουβικιτίνης με το μοτίβο δι-γλυκίνης του καρβοξυτελικού άκρου ενός άλλου μορίου. Ουβικιτινίωση ονομάζεται η ενζυμική αντίδραση κατά την οποία η ουβικιτίνη είτε ως μονομερές είτε με τη μορφή αλυσίδας προσδένεται σε πρωτεΐνες ρυθμίζοντας έτσι την «τύχη» τους σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την «τύχη» των ουβικιτινωμένων υποστρωμάτων είναι το μήκος της αλυσίδας ουβικιτίνης, καθώς μακρύτερες αλυσίδες ουβικιτίνης αυξάνουν τη συγγένεια με το πρωτεάσωμα. Η ουβικιτινίωση, πέρα από στόχευση πρωτεϊνών για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα, χρησιμοποιείται, επίσης, και για άλλες κυτταρικές διαδικασίες, όπως ανοσολογικές αποκρίσεις, ενδοκύτωση και ενδοκυτταρική μετακίνηση πρωτεϊνών, ρύθμιση της μεταγραφής μέσω της χρωματίνης, επιδιόρθωση του DNA ή σχηματισμό σηματοδοτικών συμπλόκων (Tsakiri and Trougakos, 2015).

Η σύζευξη της ουβικιτίνης σε ένα πολυπεπτίδιο είναι μια διαδικασία που εξαρτάται από κατανάλωση ATP και μεσολαβείται από μια σειρά ενζύμων. Αρχικά, το μόριο της ουβικιτίνης ενεργοποιείται με την κατανάλωση ATP και μεταφέρεται στο ενεργό κέντρο ενός ενζύμου ενεργοποίησης ουβικιτίνης, E1. Στην συνέχεια, η ενεργοποιημένη ουβικιτίνη

μεταφέρεται στο ενεργό κέντρο μιας οικογένειας ενζύμων σύζευξης ουβικιτίνης, E2. Τέλος, η λιγάση της ουβικιτίνης, E3, καταλύει τη σύζευξη του καρβοξυτελικού άκρου ενός καταλοίπου γλυκίνης του ενός μορίου ουβικιτίνης με την αμινομάδα ενός εσωτερικού καταλοίπου λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου (Tsakiri and Trougakos, 2015).

Έχει βρεθεί μόνο ένα ένζυμο E1, το οποίο μπορεί να ενεργοποιεί μόρια ουβικιτίνης, ενώ υπάρχουν περίπου 30 διαφορετικά ένζυμα E2 και 600 διαφορετικά ένζυμα E3 στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι E3 λιγάσες χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις λιγάσες με HECT (Homologous to E6-AP terminus) επικράτεια και τις λιγάσες με RING (Really interesting new gene) επικράτεια. Οι λιγάσες της πρώτης κατηγορίας δέχονται την ενεργοποιημένη ουβικιτίνη και στη συνέχεια, μεταφέρουν το καρβοξυτελικό άκρο της ουβικιτίνης σε ένα κατάλοιπο λυσίνης του υποστρώματος, έτσι ώστε να σχηματιστεί ισοπεπτιδικός δεσμός. Αντίθετα, οι λιγάσες της δεύτερης κατηγορίας διαθέτουν μια μεγάλη επιφάνεια σύνδεσης που φέρνει σε επαφή το E2 ένζυμο και το υπόστρωμα (Tsakiri and Trougakos, 2015).

Η απομάκρυνση των μορίων της ουβικιτίνης από τα διάφορα υποστρώματά της είναι σημαντική τόσο για την αποικοδόμησή τους όσο και για τη βιοσύνθεση της ουβικιτίνης. Σε αυτή τη διαδικασία συμμετέχουν τα κυτταρικά ένζυμα απο-ουβικιτινώσης (deubiquitinating enzymes, DUBs), όπως η μεταλλοπρωτεάση RPN11 και οι πρωτεάσες USP14 και UCH37/UCHL5, τα οποία είναι μικρές πρωτεΐνες που υδρολύουν μικρά αμίδια και εστέρες στο καρβοξυτελικό άκρο της ουβικιτίνης. Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν στην επεξεργασία των πρόδρομων ανενεργών μορίων ουβικιτίνης, τη διόρθωση των συμπλόκων ουβικιτίνης-πρωτεΐνης, την αφαίρεση της ουβικιτίνης από τα κυτταρικά υποστρώματα-στόχους της για επαναχρησιμοποίηση και τη διατήρηση καθαρού του πρωτεασώματος από ανασταλτικές αλυσίδες ουβικιτίνης (Collins and Goldberg, 2017).

1.2.2.2. Πρωτεάσωμα

Το πρωτεάσωμα είναι μια μεγάλη πρωτεϊνική μηχανή (2,5MDa), η οποία συμβάλει στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από το 20S καταλυτικό τμήμα με ενεργότητα υδρόλυσης πρωτεϊνών (ή 20S πρωτεάσωμα) και από ένα ή δύο 19S ρυθμιστικά μόρια (30S πρωτεάσωμα), που συνδέονται στα άκρα του 20S καταλυτικού τμήματος και απαιτούνται για την αναγνώριση του υποστρώματος, την απομάκρυνση της αλυσίδας της ουβικιτίνης και το ξεδίπλωμα του υποστρώματος (Schmidt and Finley, 2014; Vilchez et al., 2014).

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το 20S καταλυτικό τμήμα σχηματίζει μια κυλινδρική δομή και διαθέτει τρία καταλυτικά κέντρα με ενεργότητες πεπτιδασών. Ο κύλινδρος αποτελείται από 28 α- και β- τύπου υπομονάδες, οι οποίες οργανώνονται σε τέσσερις

επταμερείς δακτυλίους. Οι εσωτερικοί δακτύλιοι αποτελούνται από β-τύπου υπομονάδες (β1-7) και οι εξωτερικοί δακτύλιοι αποτελούνται από α-τύπου υπομονάδες (α1-7). Οι ενεργότητες πεπτιδασών του πρωτεασώματος εντοπίζονται στους εσωτερικούς δακτυλίους και πιο συγκεκριμένα στις υπομονάδες β1, β2 και β5, οι οποίες διαθέτουν πρωτεολυτική ενεργότητα κασπάσης, θρυψίνης και χυμοθρυψίνης, αντίστοιχα. Οι πρωτεολυτικές ενεργότητες κασπάσης και θρυψίνης κόβουν μετά από όξινα και βασικά αμινοξικά κατάλοιπα, αντίστοιχα, ενώ η ενεργότητα χυμοθρυψίνης κόβει μετά από υδρόφοβα κατάλοιπα (Tsakiri and Trougakos, 2015).

Η πρόσβαση των υποστρωμάτων στα καταλυτικά κέντρα ρυθμίζεται από μια πύλη, που σχηματίζεται από τα αμινοτελικά άκρα των α-τύπου υπομονάδων των εξωτερικών δακτυλίων. Η πύλη αυτή βρίσκεται σε κλειστή κατάσταση και για να μεταβεί σε ανοιχτή θα πρέπει να μετατοπιστούν αυτά τα αμινοτελικά άκρα. Η ρύθμιση της πύλης είναι απαραίτητη και πραγματοποιείται από ενεργοποιητές του πρωτεασώματος, όπως είναι το ρυθμιστικό μόριο 19S, πρωτεΐνες από την PA28 οικογένεια και Blm10/PA200 πρωτεΐνες (Schmidt and Finley, 2014; Vilchez et al., 2014).

Το 19S ρυθμιστικό μόριο αποτελείται από 20 υπομονάδες, οι οποίες είναι εξελικτικά συντηρημένες και οργανώνονται σε δύο υποσύμπλοκα, τη βάση και το κάλυμμα. Η βάση αποτελείται από 6 AAA-τύπου ATPάσες (Rpt1-6), που σχηματίζουν έναν εξαμερή δακτύλιο, τις υπομονάδες RPN1 και RPN2 και τους υποδοχείς ουβικιτίνης RPN10 και RPN13. Το κάλυμμα αποτελείται από 9 υπομονάδες χωρίς ενεργότητα ATPάσης, οι οποίες διαθέτουν μοναδικές αλληλουχίες, δομές και λειτουργίες. Η βάση του 19S ρυθμιστικού μορίου αλληλεπιδρά με τον α-δακτύλιο του 20S καταλυτικού τμήματος, ενώ το κάλυμμα εντοπίζεται στην κορυφή της βάσης (Schmidt and Finley, 2014; Vilchez et al., 2014). Το 19S ρυθμιστικό μόριο αναγνωρίζει τα ουβικιτινωμένα υποστρώματα, αφαιρεί τις αλυσίδες της ουβικιτίνης και ξεδιπλώνει το υπόστρωμα, ώστε να επιτραπεί η είσοδός του στο 20S καταλυτικό τμήμα, όπου αποικοδομείται σε πεπτίδια (Labbadia and Morimoto, 2015).

Για την αποτελεσματική αποικοδόμηση μιας πρωτεΐνης από το πρωτεάσωμα απαιτείται πέρα από την αλυσίδα της ουβικιτίνης και μια περιοχή με χαλαρή αναδίπλωση στην πρωτεΐνη-υπόστρωμα. Τέτοιες περιοχές παρουσιάζονται κάποια στιγμή στις περισσότερες πρωτεΐνες, αλλά εμφανίζονται πιο συχνά αν υπάρχουν μεταλλάξεις, ομοιοπολικές τροποποιήσεις, βλάβες ή δράση ενζύμων ξεδίπλωσης. Έτσι, αρχικά πραγματοποιείται ένα βήμα, κατά το οποίο η αλυσίδα της ουβικιτίνης προσδένεται με υψηλή συγγένεια στους υποδοχείς της στο 26S πρωτεάσωμα, και στη συνέχεια, πραγματοποιείται ένα δεύτερο βήμα πρόσδεσης, το οποίο εξαρτάται από την δομή της πρωτεΐνης και απαιτεί την υδρόλυση ATP. Το πρώτο βήμα εξαρτάται μόνο από την παρουσία της αλυσίδας της ουβικιτίνης και δεν απαιτεί κατανάλωση ATP, και σε αυτό συμμετέχουν οι υπομονάδες RPN10 και RPN13 του

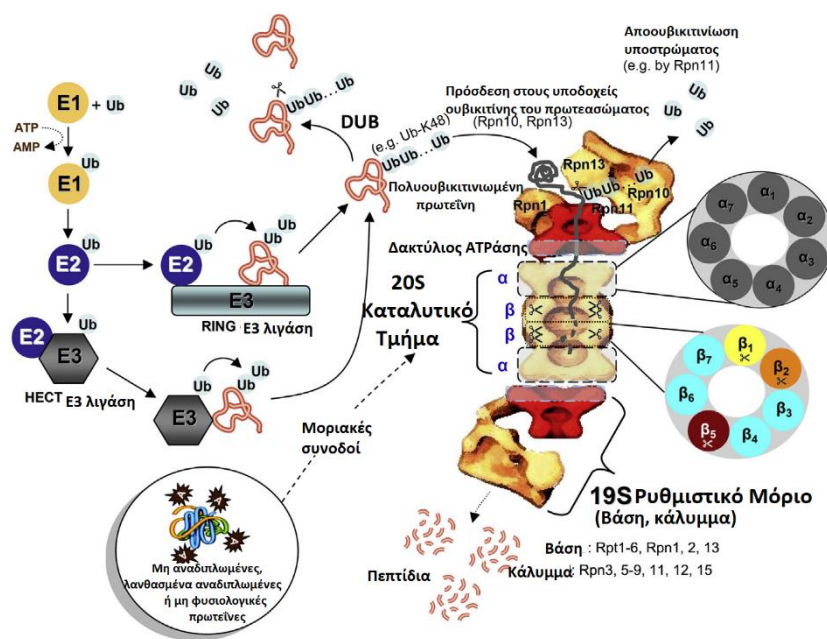
19S ρυθμιστικού μορίου, ενώ το δεύτερο βήμα απαιτεί υδρόλυση ATP και την ύπαρξη μιας περιοχής με χαλαρή διαμόρφωση στο υποστρώμα. Η πρόσδεση του υποστρώματος προκαλεί δομικές αλλαγές στο 19S σύμπλοκο, με κυριότερη τη διεύρυνση του κεντρικού καναλιού διέλευσης του υποστρώματος και την ευθυγράμμιση του με την πύλη εισόδου του 20S συμπλόκου (Collins and Goldberg, 2017).

Τα πρωτεασώματα εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα και το κυτοσόλιο, αν και το 20S καταλυτικό τμήμα μπορεί να εντοπιστεί και εξωκυττάρια στα βιολογικά υγρά. Στον πυρήνα τα πρωτεασώματα εμπλέκονται στην αποικοδόμηση πυρηνικών πρωτεϊνών, και ιδιαίτερα μιτωτικών ρυθμιστών, πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA και του μονοπατιού απόκρισης σε βλάβες του γονιδιώματος (DNA damage response, DDR). Η εξωκυττάρια εντόπιση του 20S πρωτεασώματος έχει παρατηρηθεί κυρίως σε ασθενείς με στερεούς όγκους, όπου φαίνεται να προέρχονται από τα κύτταρα των όγκων ή από καλοήγη κύτταρα ως αποτέλεσμα ανοσολογικής απόκρισης (Tsakiri and Trougakos, 2015). Τα πρωτεασώματα εντοπίζονται, επίσης, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο ποιότητας των πρωτεϊνών μέσω του μονοπατιού αποικοδόμησης που σχετίζεται με το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER-associated degradation, ERAD), καθώς επίσης και στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου εκτελούν την αποικοδόμηση που σχετίζεται με την εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Outer mitochondrial membrane-associated degradation, OMMAD) (Labbadia and Morimoto, 2015; Wedel et al., 2018).

Τα επίπεδα έκφρασης των συστατικών του πρωτεασώματος πρέπει να προσαρμόζονται στις ανάγκες του κυττάρου για απομάκρυνση των κατεστραμμένων πρωτεϊνών. Σε καταστάσεις στρες, στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων του πρωτεασώματος συμμετέχουν δύο μεταγραφικοί παράγοντες, οι NRF1 (NF-E2-related factor-1) και NRF2 (NF-E2-related factor-2). Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ανήκουν στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων Cap'n'Collar (CNC) και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων, που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα. Ο NRF1 εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ ο NRF2 στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια. Και οι δύο παράγοντες ρυθμίζονται σε πρωτεϊνικό επίπεδο μέσω αποικοδόμησης από το πρωτεάσωμα (Schmidt and Finley, 2014). Επίσης, τα κυτταρικά επίπεδα του πρωτεασώματος ρυθμίζονται μέσω ενός αυτο-ρυθμιζόμενου μηχανισμού. Τέλος, φαίνεται ότι η ρύθμιση των γονιδίων του πρωτεασώματος παρουσιάζει ιστοειδικές διαφορές, καθώς επίσης και διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα και ανάμεσα σε διαφορετικά είδη της ίδιας οικογένειας (Tsakiri and Trougakos, 2015).

Η λειτουργικότητα του πρωτεασώματος ρυθμίζεται από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, αν και οι επιδράσεις αυτών των τροποποιήσεων στην δομή, εντόπιση και λειτουργία του πρωτεασώματος παραμένουν ασαφείς. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι

διάφορες υπομονάδες του πρωτεασώματος φωσφορυλιώνονται και φαίνεται ότι οι θέσεις φωσφορυλίωσης είναι αυτές που καθορίζουν την επίδραση της τροποποίησης αυτής στην ενεργότητα του πρωτεασώματος. Επίσης, σε διάφορες υπομονάδες του 19S ρυθμιστικού μορίου και του 20S καταλυτικού τμήματος έχει παρατηρηθεί αμινοτελική ακετυλίωση, αν και η επίδραση αυτής της τροποποίησης είναι ασαφής (Tsakiri and Trougakov, 2015).



Εικόνα 2. Τα δομικά συστατικά του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος αποτελείται από το ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικιτίνης, E1, το οποίο μεταφέρει την ουβικιτίνη στο ενεργό κέντρο του ενζύμου σύζευξης της ουβικιτίνης, E2. Στη συνέχεια, οι λιγάσες της ουβικιτίνης, E3, είτε με HECT επικράτεια είτε με RING επικράτεια, συνδέουν την ουβικιτίνη με ένα εσωτερικό κατάλοιπο λυσίνης (Lys) στην πρωτεΐνη-στόχο. Η ουβικιτινωμένη πρωτεΐνη μπορεί είτε να αποφύγει την αποικοδόμηση μέσω της δράσης των κυτοσολικών ενζύμων αποουβικιτινώσεως (deubiquitinating enzymes, DUBs) είτε να στοχευθεί για αποικοδόμηση στο 26S πρωτεάσωμα. Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από το καταλυτικό τμήμα 20S και από ένα ή δύο ρυθμιστικά μόρια 19S. Το 19S ρυθμιστικό μόριο αποτελείται από 20 υπομονάδες, που οργανώνονται σε δύο υποσύμπλοκα, τη βάση και το κάλυμμα. Τα πολυουβικιτινωμένα πολυπεπτίδια δεσμεύονται στους υποδοχείς ουβικιτίνης του 19S ρυθμιστικού μορίου (RPN10, RPN13), αποουβικιτινώνονται και προωθούνται στο 20S καταλυτικό τμήμα για αποικοδόμηση. Το 20S καταλυτικό τμήμα αποτελείται από 28 υπομονάδες, που οργανώνονται σε τέσσερις δακτύλιους, και διαθέτει τρεις ενεργότητες πεπτιδασών. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι περισσότερες ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το 26S πρωτεάσωμα, ενώ οι οξειδωμένες, μη αναδιπλωμένες ή μη φυσιολογικές πρωτεΐνες

αποικοδομούνται από το 20S πρωτεάσωμα με τη μεσολάβηση των μοριακών συνοδών (Προσαρμογή από Tsakiri and Trougakos, 2015).

1.2.3. Μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος

Το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος εμπλέκεται ενεργά στην αποικοδόμηση πρωτεϊνών μεγάλου χρόνου ημιζωής, πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, κατεστραμμένων κυτταρικών οργανιδίων, λιπιδικών εναποθέσεων και παθογόνων μικροοργανισμών. Επίσης, συμβάλει στην αποικοδόμηση ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών μέσω της δράσης μοριακών συνοδών σε συνθήκες δυσλειτουργίας του πρωτεασώματος, ενώ τα λυσosώματα εμπλέκονται και στην αποικοδόμηση ή την ανακύκλωση των πρωτεασωμάτων (Vilchez et al., 2014). Το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος συμμετέχει στη ρύθμιση του καταβολισμού των πρωτεϊνών κατά την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την αναδιαμόρφωση των ιστών, καθώς και στη ρύθμιση των κυτταρικών συστατικών σε καταστάσεις έλλειψης θρεπτικών συστατικών ή αυξητικών παραγόντων και υποξίας (Trougakos et al. 2013).

Το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος αποτελείται από τρία μονοπάτια, την μικροαυτοφαγία, την μακροαυτοφαγία και την αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από τις μοριακές συνοδούς. Στη μικροαυτοφαγία, η μεμβράνη του λυσosώματος εγκολπώνει απευθείας ολόκληρες περιοχές του κυτοσολίου, ενώ στη μακροαυτοφαγία κυστίδια διπλής μεμβράνης, που ονομάζονται αυτοφαγοσώματα, εσωκλείουν πρωτεΐνες, λιπίδια, οργανίδια ή περιοχές του κυτοσολίου και συντήκονται με το λυσosώμα, όπου αποικοδομείται το περιεχόμενό τους. Στην αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από μοριακές συνοδούς, συγκεκριμένες κυτοσολικές πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από μοριακές συνοδούς μέσω ενός κοινού πεπτιδικού μοτίβου και μεταφέρονται στο λυσosώμα για αποικοδόμηση μέσω ενός ειδικού υποδοχέα στη λυσosωμική μεμβράνη. Τα λυσosώματα είναι κυστίδια με όξινο pH και η αποικοδόμηση γίνεται από διάφορες κυτταρικές υδρολάσες, όπως πρωτεάσες, λιπάσες, νουκλεάσες και γλυκοζιδάσες (Vilchez et al., 2014; Labbadia and Morimoto, 2015). Η διαδικασία της αυτοφαγίας μπορεί να συνοψιστεί σε πέντε γεγονότα: την έναρξη, την πυρήνωση, την επέκταση, τη σύντηξη και την αποικοδόμηση του φορτίου (Wedel et al. 2018).

Η ρύθμιση της αυτοφαγίας επιτυγχάνεται από μια σειρά αρνητικών ρυθμιστών, που ανιχνεύουν τα κυτταρικά επίπεδα ενέργειας, θρεπτικών συστατικών και αυξητικών παραγόντων. Έτσι, στη ρύθμιση συμμετέχουν σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι IIS (insulin/insulin-like growth factor signaling pathway), το μονοπάτι της κίνησης mTOR (mechanistic target of rapamycin) και τα σηματοδοτικά μονοπάτια των σιρτουινών. Για παράδειγμα, η ρύθμιση της αυτοφαγίας ελέγχεται από την κίνηση mTOR, η οποία παρουσία άφθονων θρεπτικών συστατικών καταστέλλει την αυτοφαγία (Trougakos et al., 2013; Pan and

Finkel, 2017). Η αναστολή της δράσης της mTOR, μεταξύ άλλων, επάγει τον σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων. Επίσης, σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αυτοφαγίας παίζουν οι ρυθμιστές της mTOR. Τέτοιοι ρυθμιστές είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι GF/PI3K/Akt, το οποίο όταν ενεργοποιείται επάγει την ενεργοποίηση της mTOR, καθώς και η κίνηση AMPK, που όταν είναι ενεργή, αναστέλλει την mTOR μέσω φωσφορυλίωσης επάγοντας έτσι την αυτοφαγία (Wedel et al. 2018). Επίσης, η SIRT1 επάγει την αυτοφαγία μέσω αποακετυλίωσης διαφόρων ATG (autophagy-related gene) πρωτεϊνών και μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι FOXO1/3/4 (Vilchez et al., 2014). Η αυτοφαγική ενεργότητα αυξάνεται, επίσης, όταν η ομοιόσταση του ενδοπλασματικού δικτύου διαταράσσεται, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα μη αναδιπλωμένες ή λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες να συσσωρεύονται (Wedel et al. 2018).

1.2.4. Ρύθμιση του δικτύου πρωτεόστασης

Με την εξέλιξη των πολυκύτταρων οργανισμών, το δίκτυο πρωτεόστασης απέκτησε επιπρόσθετα επίπεδα ρύθμισης (Labbadia and Morimoto, 2015). Τα επίπεδα αυτά εκτείνονται πέρα από το μεμονωμένο κύτταρο σε αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους ιστούς μέσω του μη αυτόνομου κυτταρικού ελέγχου, που δρα σε επίπεδο οργανισμού (Morimoto and Cuervo, 2014). Η πολύπλοκη οργάνωση των κυττάρων και των ιστών στους πολυκύτταρους οργανισμούς θέτει προκλήσεις στην επαγόμενη από στρες αναδιοργάνωση του δικτύου πρωτεόστασης, καθώς τα κύτταρα διαφέρουν ως προς την έκθεσή τους και την ευαισθησία τους σε εξωτερικά και εσωτερικά ερεθίσματα. Γι' αυτό, τα πρωτεοτοξικά γεγονότα μεταδίδονται ανάμεσα στα κύτταρα και τους ιστούς και τόσο το δίκτυο πρωτεόστασης όσο και τα μονοπάτια απόκρισης στο στρες είναι οργανωμένα, ώστε να ανιχνεύουν και να ανταποκρίνονται σε ενδοκυτταρικά και διακυτταρικά σήματα στρες, προκειμένου να αποτρέπεται η επιπλέον βλάβη στον οργανισμό (Labbadia and Morimoto, 2015; Sala et al., 2017).

Στον μη αυτόνομο κυτταρικό έλεγχο του δικτύου πρωτεόστασης μπορούν, πέρα από πρωτεοτοξικά σήματα, να μεταφερθούν στοιχεία του δικτύου, όπως μοριακές συνοδοί, ή ακόμη και τοξικές πρωτεΐνες. Η μεταφορά των σημάτων μπορεί να γίνει μέσω καναλιών, που χρησιμοποιούνται στην διακυτταρική επικοινωνία, ενώ η μεταφορά των υπόλοιπων στοιχείων μπορεί να γίνει μέσω εξωσωμάτων ή νανοσωληνίσκων (Kaushik and Cuervo, 2015). Ο μη αυτόνομος κυτταρικός έλεγχος φαίνεται να εφαρμόζεται στο μονοπάτι απόκρισης σε θερμικό σοκ (Heat shock response, HSR), στο μονοπάτι απόκρισης μη διπλωμένων πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου (Unfolded protein response, UPR), ενώ φαίνεται να συμμετέχουν και οι μοριακές συνοδοί, όπως έχει αποδειχθεί σε διάφορους οργανισμούς-μοντέλα. Η

συστημική ρύθμιση της πρωτεόστασης του οργανισμού εξασφαλίζει την υγεία και τη μακροβιότητα του (Sala et al. 2017).

Η λειτουργικότητα των διαφορετικών κλάδων του δικτύου πρωτεόστασης ελέγχεται συνεχώς από διάφορα μονοπάτια απόκρισης, όπως η απόκριση σε θερμικό σοκ (HSR), σε μη διπλωμένες πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου (UPR) και η απόκριση σε οξειδωτικό στρες (Oxidative stress response, OxR). Καθεμία από αυτές τις αποκρίσεις ελέγχεται από συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες, που ανιχνεύουν το στρες, έχουν μικρή διάρκεια ζωής και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση ως απόκριση σε συγκεκριμένους στρεσογόνους παράγοντες (Labbadia and Morimoto, 2015; Sala et al., 2017). Επιπλέον, σε καταστάσεις στρες οι μεταγραφικές αποκρίσεις συνδυάζονται με μια γενική μείωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης μέσω μείωσης του εναλλακτικού ματίσματος και της μετάφρασης του RNA, επιτρέποντας έτσι τη μετάφραση των επαγόμενων από το στρες mRNAs. Αυτό γίνεται, προκειμένου να μειωθεί η σύνθεση του μεγαλύτερου μέρους του πρωτεώματος και να δοθεί προτεραιότητα στην έκφραση μοριακών συνοδών και άλλων πρωτεϊνών απόκρισης στο στρες (Labbadia and Morimoto, 2015; Sala et al., 2017).

Η απόκριση σε θερμικό στρες (HSR) ελέγχεται κυρίως από τον μεταγραφικό παράγοντα heat shock factor 1 (HSF1), ο οποίος, ως απόκριση στη μη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο κυτοσόλιο, αυξάνει την έκφραση συγκεκριμένων μοριακών συνοδών, προκειμένου να ενισχυθεί η ικανότητα του κυττάρου για πρωτεϊνική αναδίπλωση. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο παράγοντας HSF1 παραμένει ως μονομερές σε ανενεργή κατάσταση στο κυτοσόλιο ή τον πυρήνα, όπου αλληλεπιδρά προσωρινά με μοριακές συνοδούς, όπως οι HSP70 και HSP90. Σε καταστάσεις αυξημένου στρες, οι μη φυσιολογικές πρωτεΐνες ανταγωνίζονται τον HSF1 για σύνδεση στις μοριακές συνοδούς με αποτέλεσμα ο HSF1 να απελευθερώνεται από αυτές. Στη συνέχεια, φωσφορυλιώνεται, δημιουργεί ομοτριμερή, μεταφέρεται στον πυρήνα και προσδένεται στα στοιχεία θερμικού σοκ (Heat shock elements, HSE) επάγοντας την έκφραση γονιδίων-στόχων, όπως γονιδίων μοριακών συνοδών, καθώς και γονιδίων διαφόρων παραγόντων του δικτύου πρωτεόστασης. Όταν το στρες μειωθεί, ο HSF1 απενεργοποιείται μέσω πρόσδεσης σε μοριακές συνοδούς και έτσι το σύστημα επιστρέφει σε ισορροπία (Trougakos et al., 2013; Wolff et al., 2014; Niforou et al., 2014).

Στο ενδοπλασματικό δίκτυο παρουσία πρωτεοτοξικού στρες, ενεργοποιείται η απόκριση σε μη διπλωμένες πρωτεΐνες (UPR), η οποία χαρακτηρίζεται από τρία διακριτά μονοπάτια, καθένα από τα οποία μεταδίδει πληροφορίες από το κυτοσόλιο στο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω συγκεκριμένων μεμβρανικών υποδοχέων, οι οποίοι ενεργοποιούνται ως απόκριση σε λανθασμένα αναδιπλωμένα πολυπεπίδια. Οι τρεις μεμβρανικοί υποδοχείς είναι οι πρωτεΐνες IRE1 (inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1), PERK (PKR-activated

protein kinase-like eukaryotic initiation factor 2 kinase) και ATF6 (activating transcription factor-6) και καθεμία ενεργοποιεί ένα μονοπάτι μεταγωγής σήματος καταλήγοντας είτε στη μείωση του φορτίου των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών, είτε στην αύξηση της ικανότητας του ενδοπλασματικού δικτύου για αναδίπλωση και αποικοδόμηση. Και οι τρεις αυτές μεμβρανικές πρωτεΐνες απουσία στρες είναι ανενεργές, καθώς αλληλεπιδρούν με τη μοριακή συνοδό GRP78, ενώ παρουσία στρες απελευθερώνονται, καθώς η GRP78 αλληλεπιδρά με τις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Trougakov et al., 2013).

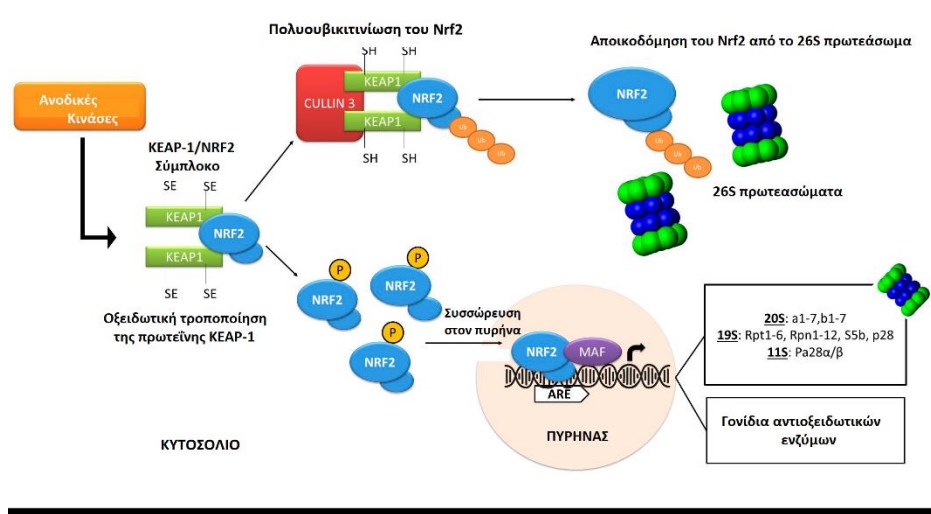
Συγκεκριμένα, η IRE1 επάγει τη μετάφραση και μεταφορά του μεταγραφικού παράγοντα XBP1 στον πυρήνα, όπου ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων που εμπλέκονται στην ομοιοστάση του ενδοπλασματικού δικτύου και τη ρύθμιση της απόπτωσης. Η πρωτεΐνη ATF6 μετά από τροποποίηση δρα ως μεταγραφικός παράγοντας και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων μοριακών συνοδών, καθώς και αποπτωτικών γονιδίων. Τέλος, η PERK επάγει τη μείωση της μετάφρασης πολλών πρωτεϊνών μέσω φωσφορυλίωσης του παράγοντα eIF2α, περιορίζοντας έτσι την είσοδο πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Επίσης, η PERK φωσφορυλιώνει τον NRF2 για να επάγει την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων (Trougakov et al., 2013; Wolff et al., 2014). Στα μιτοχόνδρια, η απόκριση UPR ελέγχεται από τον μεταγραφικό παράγοντα ATF5. Απουσία στρες, ο ATF5 μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια και αποικοδομείται από πρωτεάσες, ενώ παρουσία μιτοχονδριακού στρες συσσωρεύεται στο κυτοσόλιο και στη συνέχεια, μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων μοριακών συνοδών ειδικών για το μιτοχόνδριο (Wolff et al., 2014; Labbadia and Morimoto, 2015).

Η απόκριση σε οξειδωτικό στρες ελέγχει την έκφραση οξειδοαναγωγικών πρωτεϊνών και συστατικών, που εμπλέκονται στην πρωτεϊνική αποικοδόμηση. Σε αυτό το μονοπάτι απόκρισης συμμετέχουν οι μεταγραφικοί παράγοντες, ο NRF1 και ο NRF2. Ο παράγοντας NRF1 εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο ουβικιτινωμένος NRF1 αποικοδομείται γρήγορα, αλλά μερικώς ανεσταλμένα πρωτεασώματα πραγματοποιούν περιορισμένη πρωτεόλυση με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται ένας επεξεργασμένος NRF1 από το ενδοπλασματικό δίκτυο, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα και επάγει την γονιδιακή έκφραση (Sala et al. 2017). Ο παράγοντας NRF2 συμμετέχει στο σηματοδοτικό αντιοξειδωτικό μονοπάτι NRF2/KEAP1 (Tsakiri and Trougakov, 2015).

Η πρωτεΐνη KEAP1 είναι μια πρωτεΐνη που προσδένεται στην ακτίνη του κυτταροσκελετού και περιέχει μια αμινοτελική επικράτεια BTB/POZ και μια καρβοξυτελική επικράτεια Kelch, οι οποίες προσδένουν την E3 λιγάση, CUL3 (cullin 3-dependent E3 ligase), και τον παράγοντα NRF2, αντίστοιχα. Επίσης, διαθέτει πολλά κατάλοιπα κυστεΐνης, τα οποία δρουν σαν αισθητήρες οξειδωτικού στρες και παρουσία οξειδωτικού στρες

οξειδώνονται. Όταν δεν υπάρχει οξειδωτικό στρες, η πρωτεΐνη KEAP1 προσδένει τόσο την πρωτεΐνη CUL3 όσο και τον παράγοντα NRF2, με αποτέλεσμα ο NRF2 να ουβικιτινιώνεται και να οδηγείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Συνεπώς, σε φυσιολογικές συνθήκες ο παράγοντας NRF2 είναι μια πρωτεΐνη μικρής διάρκειας ζωής. Παρουσία οξειδωτικού στρες, μειώνεται η πρόσδεση του παράγοντα NRF2 στην πρωτεΐνη KEAP1, ο NRF2 σταθεροποιείται και μετακινείται από το κυτοσόλιο στον πυρήνα, όπου συσσωρεύεται. Εκεί, δημιουργεί ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη MAF (Musculoaponeurotic fibrosarcoma) και προσδένεται στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant response elements, AREs), ή στα στοιχεία απόκρισης σε ηλεκτρόφιλο στρες (Electrophile response elements, EpREs) (Tsakiri and Trougakos, 2015).

Η πρόσδεση σε αυτά τα στοιχεία επάγει την έκφραση μιας ομάδας αντιοξειδωτικών ενζύμων, πρωτεϊνών εξισορρόπησης του ενδοκυτταρικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού, καθώς και γονιδίων του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος. Ο παράγοντας NRF2 επηρεάζει διαδικασίες, όπως η φλεγμονή, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η κυτταρική διαφοροποίηση και ο μεταβολισμός. Επίσης, η ενεργότητα του NRF2 μπορεί να ρυθμιστεί μέσω φωσφορυλίωσης από διάφορες κινάσες (Trougakos et al., 2013; Tsakiri and Trougakos, 2015) (Εικ. 3).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση μονοπατιών που ρυθμίζουν τον μεταγραφικό παράγοντα NRF2. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο παράγοντας NRF2 πολυουβικιτινιώνεται και οδηγείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Το οξειδωτικό στρες τροποποιεί την πρωτεΐνη KEAP1 οδηγώντας σε σταθεροποίηση του NRF2 και μετακίνησή του στον πυρήνα. Εκεί, ενεργοποιεί ένα ευρύ φάσμα μεταγραφικών στόχων, συμπεριλαμβανομένων αντιοξειδωτικών γονιδίων και γονιδίων του δικτύου πρωτεόστασης. Η ενεργότητα του NRF2 μπορεί, επίσης, να ρυθμιστεί από κινάσες που δρουν αναρροϊκά του (Προσαρμογή από Wedel et al., 2018).

1.3. Γήρανση

Η γήρανση ορίζεται ως η χρονοεξαρτώμενη μείωση της λειτουργικής ικανότητας και ανθεκτικότητας των κυττάρων στο στρες και σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα νοσηρότητας και θνησιμότητας (Argyropoulou et al., 2013). Καθώς οι οργανισμοί γηράσκουν, παρατηρείται σταδιακή συσσώρευση δυσλειτουργικών βιομορίων και απορρύθμιση των πρωτεολυτικών και επιδιορθωτικών μονοπατιών του κυττάρου, οδηγώντας τελικά στην εμφάνιση του γηρασμένου ιστού καθώς και ασθενειών που σχετίζονται με το γήρας όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές διαταραχές και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Campisi 2013; López-otín et al. 2013).

Κατά τη διάρκεια της ζωής, ένας οργανισμός εκτίθεται συνεχώς σε στρεσογόνους παράγοντες, οι οποίοι αν και σε φυσιολογικά επίπεδα είναι απαραίτητοι για τη φυσιολογική ανάπτυξη, την ενδοκυτταρική σηματοδότηση και τον μεταβολισμό, σταδιακά συσσωρεύονται προκαλώντας οξειδωτικό στρες και μη ενζυμικές/μη αναστρέψιμες χημικές τροποποιήσεις, που προκαλούν βλάβες στα κυτταρικά βιομόρια. Οι στρεσογόνοι παράγοντες μπορεί να προέρχονται τόσο από εξωγενείς όσο και από ενδογενείς πηγές. Οι εξωγενείς πηγές μπορεί να σχετίζονται με το περιβάλλον (ατμοσφαιρικοί ρύποι, υπεριώδης ακτινοβολία, Χ- και γ-ακτινοβολίες) ή τη διατροφή (αναγωγικά σάκχαρα αντιδραστικών αλδευδών), ενώ οι ενδογενείς πηγές περιλαμβάνουν διάφορες φλεγμονώδεις διαδικασίες, την υπερβολική ενεργοποίηση των NAD(P)H οξειδασών και/ή τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Trouwakos et al., 2013). Στα μιτοχόνδρια παράγονται ελεύθερες δραστικές ρίζες ως παραπροϊόντα της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τέτοιες ελεύθερες δραστικές ρίζες ανήκουν στις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) (Niforou et al., 2014). Αν η συγκέντρωση αυτών των δραστικών μορφών υπερβεί την κυτταρική αντιοξειδωτική ικανότητα, προκαλείται μια κατάσταση που είναι γνωστή ως οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα την πρόκληση βλαβών στα κυτταρικά βιομόρια, όπως στις πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA (Loboda et al. 2016).

Η πρώτη γραμμή κυτταρικής άμυνας έναντι των στρεσογόνων παραγόντων εξαρτάται από ένα δίκτυο, το οποίο αποτελείται από αντιοξειδωτικά μόρια, όπως βιταμίνες, φυσικά φλαβονοειδή, καροτενοειδή, μελατονίνη ή α-λιποϊκό οξύ, και/ή αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης. Η δεύτερη γραμμή κυτταρικής άμυνας αφορά ένα μοριακό δίκτυο ανιχνευτών, το οποίο σημαίνει τα κατεστραμμένα βιομόρια και κινητοποιεί καθοδικούς παράγοντες, που είτε επιδιορθώνουν είτε απομακρύνουν τα κατεστραμμένα βιομόρια. Στην περίπτωση του γονιδιώματος, αυτοί οι ανιχνευτές ταυτοποιούν βλάβες στο DNA και ενεργοποιούν το δίκτυο απόκρισης σε βλάβες του γονιδιώματος, DDR. Στην περίπτωση του πρωτεώματος, η απόκριση στο πρωτεοτοξικό στρες (Proteome damage response, PDR) κινητοποιεί το δίκτυο πρωτεόστασης (Gumeni et al.

2017). Έτσι, για κάποιο χρονικό διάστημα, οι οργανισμοί καταφέρνουν να διατηρούν χαμηλά τα επίπεδα των κατεστραμμένων βιομορίων μέσω της δράσης του συστήματος ελέγχου ποιότητας, το οποίο εκτός από εξουδετέρωση των στρεσογόνων παραγόντων, αναγνωρίζει και επιδιορθώνει ή απομακρύνει τα δυσλειτουργικά βιομόρια. Ωστόσο, σταδιακά όσο ο οργανισμός γηράσκει, το σύστημα αυτό δυσλειτουργεί, με αποτέλεσμα οι κυτταρικές λειτουργίες βαθμιαία να απορυθμίζονται προκαλώντας τη συσσώρευση στρεσογόνων παραγόντων, την αυξημένη νοσηρότητα, τη γήρανση του ιστού και τελικά το θάνατο (Argyropoulou et al., 2013; Tsakiri and Trougakos, 2015).

Η γήρανση, πέρα από μια παθητική διαδικασία, ελέγχεται εν μέρει από γενετικά μονοπάτια και βιοχημικές διαδικασίες, που έχουν διατηρηθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Η πολυπλοκότητα αυτής της διαδικασίας προκύπτει από το γεγονός ότι ο «χρόνος» δεν επηρεάζει όλα τα κύτταρα ομοιογενώς, αλλά επιλεκτικά και στοχαστικά (Riera et al. 2016). Ωστόσο, υπάρχουν συγκεκριμένα ορόσημα, που αποτελούν κοινούς παρονομαστές της γήρανσης σε διάφορους οργανισμούς (López-Otín et al., 2013).

1.3.1. Ορόσημα της γήρανσης

Τα ορόσημα της γήρανσης (Hallmarks of aging), τα οποία θεωρείται ότι συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή και μαζί καθορίζουν τον γηρασμένο φαινότυπο, παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω (López-Otín et al., 2013) (Εικ. 4).

Γενωμική αστάθεια: Η ακεραιότητα του DNA συνεχώς δοκιμάζεται από εξωγενείς, φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς παράγοντες, καθώς επίσης και από ενδογενείς απειλές συμπεριλαμβανομένων των λαθών κατά την αντιγραφή του DNA, αυθόρμητων υδρολυτικών αντιδράσεων και των επιπέδων ROS. Οι γενετικές αλλοιώσεις περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις, μετατοπίσεις, απώλεια ή αύξηση χρωμοσωμάτων, μείωση του μήκους των τελομερών και καταστροφή γονιδίων λόγω εισδοχής ιών ή τρανσποζονίων. Για να ελαχιστοποιηθούν αυτές οι αλλοιώσεις, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει ένα περίπλοκο σύστημα μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA. Παρόμοιοι μηχανισμοί υπάρχουν και για το μιτοχονδριακό DNA, το οποίο υφίσταται σε μεγάλο βαθμό σχετιζόμενες με τη γήρανση μεταλλάξεις εξαιτίας του οξειδωτικού μικροπεριβάλλοντος των μιτοχονδρίων, της έλλειψης προστατευτικών ιστονών και της περιορισμένης επάρκειας μηχανισμών επιδιόρθωσης. Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να προκαλέσει γενωμική αστάθεια είναι ελαττώματα στο πυρηνικό έλασμα, το οποίο συμβάλλει στη διατήρηση του γονιδιώματος, παρέχοντας το ικρίωμα πρόσδεσης της χρωματίνης και των πρωτεϊνικών συμπλόκων, που ρυθμίζουν τη γενωμική σταθερότητα (López-Otín et al., 2013).

Φθορά των τελομερών: Οι DNA πολυμεράσες, που είναι υπεύθυνες για την αντιγραφή του DNA, δεν έχουν την ικανότητα να αντιγράψουν τα τελικά άκρα των γραμμικών

χρωμοσωμάτων, με αποτέλεσμα το μήκος των τελομερών μετά από κάθε διαίρεση να μικραίνει. Αυτό δε συμβαίνει σε κύτταρα που εκφράζουν μια ειδική DNA πολυμεράση, την τελομεράση. Ωστόσο, τα περισσότερα σωματικά κύτταρα των θηλαστικών δεν εκφράζουν την τελομεράση με αποτέλεσμα σταδιακά να προκύπτουν δυσλειτουργικά τελομερή. Τα δυσλειτουργικά τελομερή ενεργοποιούν την απόκριση DDR, αλλά δε γίνεται επιδιόρθωση καθώς ένα ειδικό σύμπλοκο νουκλεοπρωτεΐνης, το σύμπλοκο σελτερίνης, που σταθεροποιείται στα τελομερή, αποτρέπει την αναγνώριση αυτών από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Ωστόσο, η απόκριση DDR μέσω της πρωτεΐνης p53 αναστέλλει τελικά την κυτταρική διαίρεση, ώστε να αποφευχθεί η γενωμική αστάθεια (Campisi, 2013; López-Otín et al., 2013; Gorgoulis et al., 2019).

Επιγενετικές τροποποιήσεις: Οι επιγενετικές αλλαγές περιλαμβάνουν τροποποιήσεις στα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA, μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών και αναδιοργανώσεις της χρωματίνης. Η σχέση μεταξύ της μεθυλίωσης του DNA και της γήρανσης είναι περίπλοκη. Διάφορα στοιχεία δείχνουν μια σχετιζόμενη με τη γήρανση γενική υπομεθυλίωση του DNA, ενώ αντίθετα συγκεκριμένες περιοχές του DNA παρουσιάζουν υπερμεθυλίωση. Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών που σχετίζονται με τη γήρανση είναι η μεθυλίωση, ενώ σημαντικό ρόλο παίζουν οι NAD-εξαρτώμενες αποακετυλάσες της οικογένειας των σιρτουινών (Argyropoulou et al., 2013; López-Otín et al., 2013; Tsakiri and Trougakos, 2015). Οι παραπάνω επιγενετικές τροποποιήσεις μαζί με συγκεκριμένες χρωμοσωμικές πρωτεΐνες και παράγοντες αναδιοργάνωσης της χρωματίνης προκαλούν αλλαγές στην αρχιτεκτονική της χρωματίνης, όπως απώλεια και ανακατανομή της ετεροχρωματίνης, που αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της γήρανσης. Τέλος, η γήρανση σχετίζεται με αύξηση της μεταγραφής και με μια ασυνήθιστη παραγωγή και ωρίμανση πολλών mRNAs (Argyropoulou et al., 2013; López-Otín et al., 2013; Gorgoulis et al., 2019).

Απώλεια της πρωτεόστασης: Η μείωση της πρωτεόστασης είναι ένα άλλο ορόσημο της γήρανσης. Με την αύξηση της ηλικίας, η επαγόμενη από στρες σύνθεση των μοριακών συνοδών μειώνεται και η ενεργότητα των δύο κύριων πρωτεολυτικών μονοπατιών, που εμπλέκονται στον έλεγχο ποιότητας του πρωτεώματος, μειώνεται σημαντικά (López-Otín et al., 2013).

Απορρύθμιση των μονοπατιών ανίχνευσης θρεπτικών συστατικών: Τα κύρια μονοπάτια μεταγωγής σήματος για την ανίχνευση θρεπτικών συστατικών και ενέργειας είναι το μονοπάτι IIS, το μονοπάτι της κινάσης TOR και το μονοπάτι της κινάσης AMPK. Έχει βρεθεί ότι μείωση της λειτουργίας των υποδοχέων της ινσουλίνης ή του παράγοντα IGF-1, ή διαφόρων ενδοκυτταρικών καθοδικών παραγόντων, όπως της κινάσης AKT, της κινάσης mTOR και των μεταγραφικών παραγόντων FOXO, συνδέεται με μακροβιότητα, αποτυπώνοντας έτσι τη σημαντική επίδραση των τροφικών και ενεργειακών μονοπατιών

στην εξέλιξη της γήρανσης. Η αναστολή της κινάσης TOR ή καθοδικών στόχων της, όπως η κινάση S6K, επεκτείνει τη διάρκεια ζωής στους περισσότερους οργανισμούς-μοντέλα. Επίσης, η κινάση AMPK καταστέλλει τα αναβολικά μονοπάτια όταν τα επίπεδα του κυτταρικού ATP μειώνονται και η ενεργότητα της μειώνεται κατά τη γήρανση. Συνεπώς, η αναβολική σηματοδότηση επιταχύνει τη γήρανση, ενώ μειωμένη σηματοδότηση θρεπτικών συστατικών προάγει τη μακροβιότητα (Argyropoulou et al., 2013; López-Otín et al., 2013).

Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία: Καθώς η ηλικία των κυττάρων και των οργανισμών αυξάνεται, η αποτελεσματικότητα της αναπνευστικής αλυσίδας τείνει να μειώνεται, αυξάνοντας, έτσι, την εκροή ηλεκτρονίων και μειώνοντας την παραγωγή ATP. Η θεωρία των μιτοχονδριακών ελεύθερων δραστικών ριζών για τη γήρανση προτείνει ότι η σταδιακή μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, που συμβαίνει κατά τη γήρανση, έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ελεύθερων μορφών οξυγόνου (ROS), η οποία προκαλεί περαιτέρω μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και γενικευμένη κυτταρική βλάβη. Ωστόσο, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα έχει αποδειχθεί ο ρόλος των ROS στην ενεργοποίηση σημάτων πολλαπλασιασμού και επιβίωσης ως απόκριση σε φυσιολογικά σήματα και καταστάσεις στρες. Έτσι, τα ROS μπορούν να θεωρηθούν σήμα επιβίωσης, που επάγεται από το στρες, και έχει ως στόχο να αντισταθμίσει την προοδευτική φθορά, που σχετίζεται με τη γήρανση (López-Otín et al., 2013).

Κυτταρική γήρανση: Η κυτταρική γήρανση ορίζεται ως μια μη αντιστρεπτή κατάσταση αναστολής του κυτταρικού κύκλου που συνδέεται με διάφορες φαινοτυπικές αλλαγές. Είναι πιθανό η κυτταρική γήρανση να αποτελεί μια ωφέλιμη απόκριση, η οποία συμβάλλει στο να απαλλαχθούν οι ιστοί από κατεστραμμένα και πιθανόν ογκογόνα κύτταρα. Για να γίνει αυτό, απαιτείται ένα αποτελεσματικό κυτταρικό σύστημα αντικατάστασης, το οποίο να περιλαμβάνει εκκαθάριση των γηρασμένων κυττάρων και κινητοποίηση της αποκατάστασης του αριθμού των κυττάρων. Ωστόσο, στους ηλικιωμένους οργανισμούς, το σύστημα αυτό μπορεί να είναι ανεπαρκές ή μπορεί να έχει εξαντληθεί η αναγεννητική ικανότητα των προγονικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τη σταδιακή συσσώρευση γηρασμένων κυττάρων, η οποία επιδεινώνει τη βλάβη και συμβάλει στη γήρανση (López-Otín et al., 2013).

Εξάντληση των βλαστοκυττάρων: Η μείωση της αναγεννητικής ικανότητας των ιστών είναι ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της γήρανσης. Η μείωση των βλαστοκυττάρων αποτελεί συνέπεια πολλαπλών τύπων βλάβης. Αν και ο ανεπαρκής πολλαπλασιασμός των βλαστοκυττάρων και των προγονικών κυττάρων είναι επιβλαβής για τη μακροπρόθεσμη διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού, ο υπερβολικός πολλαπλασιασμός τους μπορεί, επίσης, να είναι επιβλαβής λόγω επιτάχυνσης της εξάντλησης των βλαστοκυττάρων. Γι' αυτό είναι σημαντική η μακροπρόθεσμη λειτουργικότητα των βλαστοκυττάρων μέσω διατήρησης της αδράνειάς τους (López-Otín et al., 2013).

Αλλαγή της διακυτταρικής επικοινωνίας: Οι αλλαγές στη διακυτταρική επικοινωνία παρατηρούνται σε τρεις κλάδους της, τον ενδοκρινή, τον νευροενδοκρινή και τον νευρικό. Έτσι, η νευροορμονική σηματοδότηση τείνει να απορρυθμίζεται με την αύξηση της ηλικίας, καθώς οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις αυξάνονται, η ανοσολογική παρακολούθηση έναντι των παθογόνων μειώνεται και η σύνθεση του περι- και εξωκυτταρικού περιβάλλοντος αλλάζει, επηρεάζοντας τις μηχανικές και λειτουργικές ικανότητες όλων των ιστών. Οι ηλικιο-εξαρτώμενες αλλαγές σε έναν ιστό μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά και άλλους ιστούς, αποδεικνύοντας έτσι τον συντονισμό των οργάνων, που χαρακτηρίζει τον φαινότυπο της γήρανσης (López-Otín et al., 2013).



Εικόνα 4. Λειτουργικές διασυνδέσεις μεταξύ των οροσήμων της γήρανσης. Τα προτεινόμενα εννέα ορόσημα της γήρανσης ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες. Τα ορόσημα στην κορυφή της εικόνας θεωρούνται οι κύριες αιτίες της κυτταρικής βλάβης. Τα ορόσημα στο μέσο της εικόνας θεωρούνται τμήμα αντισταθμιστικών ή ανταγωνιστικών αποκρίσεων στη βλάβη. Αυτές οι αποκρίσεις, αρχικά, περιορίζουν τη βλάβη, αλλά αν είναι χρόνιες σταδιακά γίνονται επιβλαβείς. Στο κάτω μέρος της εικόνας, παρουσιάζονται τα ενωτικά ορόσημα, τα οποία αποτελούν το τελικό αποτέλεσμα των δύο προηγούμενων ομάδων οροσήμων και είναι τελικά υπεύθυνα για τη μείωση της λειτουργικότητας που σχετίζεται με την αύξηση της ηλικίας (Προσαρμογή από López-Otín et al., 2013).

1.3.2. Κυτταρική γήρανση

Τα κύτταρα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται, τα μιτωτικά και τα μετα-μιτωτικά κύτταρα. Τα μιτωτικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται, ενώ τα μετα-μιτωτικά κύτταρα έχουν μόνιμα χάσει την ικανότητα αυτή λόγω διαφοροποίησης. Επίσης, υπάρχει και μια κατηγορία κυττάρων, όπου τα κύτταρα βρίσκονται σε μια κατάσταση αδράνειας (φάση G0 του κυτταρικού κύκλου) και

δεν πολλαπλασιάζονται, αλλά κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να πολλαπλασιαστούν (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Τα φυσιολογικά μιτωτικά κύτταρα έχουν μια περιορισμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και ο αριθμός των διαιρέσεων που πραγματοποιεί το κύτταρο μέχρι να φτάσει στο τέλος της αναδιπλασιαστικής φάσης του έχει οριστεί ως όριο Hayflick (Campisi 2013).

Η κυτταρική γήρανση είναι μια κατάσταση, που προκαλείται από στρεσογόνες βλάβες και χαρακτηρίζεται από μη αναστρέψιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου, εκκριτικά χαρακτηριστικά, βλάβη των μακρομορίων και αλλαγές στο μεταβολισμό (Gorgoulis et al. 2019). Οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως στη μείωση του μήκους των τελομερών, η οποία οδηγεί σταδιακά σε δυσλειτουργικά τελομερή και μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού p53 σε γήρανση. Αυτός ο τύπος γήρανσης ονομάζεται κυτταρική γήρανση που ξεκινάει από τα τελομερή (M1) ή αναδιπλασιαστική γήρανση. Ένας δεύτερος τύπος γήρανσης είναι η πρώτη επαγόμενη γήρανση λόγω στρες (M0), η οποία προκαλείται από την επαναλαμβανόμενη έκθεση των φυσιολογικών κυττάρων σε διάφορους τύπους στρες (οξειδωτικό στρες, έκφραση ογκογονιδίων, γενοτοξικό στρες, κλπ) (Brack 2000; Campisi 2013).

1.3.3. Χαρακτηριστικά γηρασμένων κυττάρων

Τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν πλήθος μορφολογικών, μοριακών και βιοχημικών αλλαγών. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίζονται από μη αναστρέψιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου, η οποία μπορεί να είναι απόκριση κινδύνου, που προκαλείται από βλαβερά ερεθίσματα, ή αφύσικος πολλαπλασιασμός (Gorgoulis et al. 2019). Παρόλο που δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν τα γηρασμένα κύτταρα παραμένουν μεταβολικώς ενεργά (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Στα κύτταρα των θηλαστικών, η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (RB) και η πρωτεΐνη p53 παίζουν σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της αναστολής του κυτταρικού κύκλου κατά τη γήρανση. Η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος φωσφορυλιώνεται από συγκεκριμένες κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες και έτσι μειώνεται η ικανότητά της να καταστέλλει την ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα E2F, ο οποίος είναι απαραίτητος για την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, στα γηρασμένα κύτταρα παρατηρείται συσσώρευση δύο αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινάσων, των πρωτεϊνών p21 και p16, με αποτέλεσμα να καταστέλλεται ο παράγοντας E2F και συνεπώς να επιτυγχάνεται αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Αυτή η αναστολή γίνεται μόνιμη μέσω της μετάπτωσης των γονιδίων-στόχων του E2F σε ετεροχρωματίνη, της δράσης των κυτοκινών που εκκρίνουν τα γηρασμένα κύτταρα και/ή της παραγωγής ROS.

Επίσης, τα γηρασμένα κύτταρα εκκρίνουν μια ποικιλία παραγόντων, όπως προφλεγμονώδεις κυτοκίνες, χημειοκίνες, αυξητικούς ρυθμιστές, αγγειογόνους παράγοντες

και μεταλλοπρωτεΐνάσες της μήτρας, καθορίζοντας έτσι τον σχετιζόμενο με τη γήρανση εκκριτικό φαινότυπο (Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP). Αυτές οι παρακρινείς ιδιότητες των γηρασμένων κυττάρων εξηγούν τον ρόλο της κυτταρικής γήρανσης στη συνολική γήρανση του οργανισμού, καθώς και στην ηλικιο-σχετιζόμενη παθολογία και μπορεί να είναι είτε ωφέλιμες είτε καταστροφικές ανάλογα με το εκκρινόμενο περιεχόμενο. Ο φαινότυπος SASP ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τη διάρκεια της γήρανσης, την προέλευση των ερεθισμάτων πριν τη γήρανση και τον κυτταρικό τύπο (Campisi 2013; Gorgoulis et al. 2019).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό των γηρασμένων κυττάρων είναι οι βλάβες που παρατηρούνται στα μακρομόρια, DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια. Πέρα από την μείωση του μήκους των τελομερών και την εμφάνιση δυσλειτουργικών τελομερών, παρατηρούνται εστίες βλάβης στο DNA, όπως οι σχετιζόμενες με τη γήρανση εστίες ετεροχρωματινής (senescence-associated heterochromatin foci, SAHFs) και οι σχετιζόμενες με τη γήρανση εστίες βλάβης του DNA (senescence-associated DNA-damage foci, SDFs). Επίσης, παρατηρούνται βλάβες τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία πολλών πρωτεϊνών, που προκαλούνται μεταξύ άλλων και από το οξειδωτικό στρες, καθώς και η δημιουργία πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα αν συνδεθούν με σάκχαρα ή λιπίδια σχηματίζουν μη διαλυτά συσσωματώματα, που ονομάζονται συσσωματώματα λιποφουσκίνης, τα οποία μπορούν να εντοπιστούν στα λυσοσώματα με ιστοχημικές μεθόδους ή μικροσκοπία. Τέλος, στα γηρασμένα κύτταρα παρατηρούνται αλλαγές στο λιπιδικό μεταβολισμό, λιπιδικές βλάβες και εναποθέσεις (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Gorgoulis et al., 2019).

Επιπρόσθετα, τα γηρασμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται από απορρύθμιση του μεταβολικού προφίλ τους. Για παράδειγμα, παρατηρούνται αλλαγές στη λειτουργία, τη δυναμική και τη μορφολογία των μιτοχονδρίων, τα οποία εμφανίζονται λιγότερο λειτουργικά. Παράλληλα, ο αριθμός και το μέγεθος των λυσοσωμάτων φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά. Επιπλέον, στα γηρασμένα κύτταρα παρατηρούνται αλλαγές στην έκφραση, κυρίως γονιδίων που σχετίζονται με την αναστολή/ενεργοποίηση του κυτταρικού κύκλου και με τον εκκριτικό φαινότυπο της γήρανσης (Gorgoulis et al. 2019). Τέλος, υπερεκφράζονται γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν εκκρινόμενες πρωτεΐνες, που μπορούν να αλλάξουν το μικροπεριβάλλον του ιστού (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

Υπάρχουν διάφοροι ιστοχημικοί δείκτες που χαρακτηρίζουν τα γηρασμένα κύτταρα. Ένας από αυτούς είναι η ειδική για τη γήρανση χρώση β-γαλακτοσιδάσης (Senescence associated beta galactosidase, SA-β-gal), η οποία προέρχεται από τη λυσοσωμική β-γαλακτοσιδάση, η οποία στα γηρασμένα κύτταρα υπερεκφράζεται, καθώς επίσης και η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p16^{INK4a} της οποίας η έκφραση αυξάνεται με την ηλικία και μπορεί να ανιχνευθεί σε πολλούς ιστούς (Campisi 2013). Τέλος, τα γηρασμένα κύτταρα

μπορούν να ταυτοποιηθούν από εστίες βλάβης στο DNA, που σχετίζονται με τη γήρανση (SDFs). Αυτές οι εστίες περιέχουν πρωτεΐνες που σχετίζονται με βλάβη στο DNA, όπως είναι η φωσφορυλιωμένη ιστόνη H2AX (γH2AX) και η πρωτεΐνη πρόσδεσης στην p53 (53BP1), και προκύπτουν από δυσλειτουργικά τελομερή και άλλες πηγές DNA βλάβης (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

1.3.4. Ρύθμιση της γήρανσης

Υπάρχουν τρία εξελικτικά συντηρημένα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία έχει βρεθεί ότι συνδέονται με τη ρύθμιση της διάρκειας της ζωής. Στα μονοπάτια αυτά συμμετέχουν πρωτεΐνες-κλειδιά, όπως είναι η οικογένεια των σιρτουινών, τα συστατικά του μονοπατιού IIS και η κινάση mTOR μαζί με τους καθοδικούς παράγοντές της (Pan and Finkel, 2017) (Εικ. 5.).

Οι σιρτουίνες είναι μια συντηρημένη οικογένεια NAD^+ -εξαρτώμενων ενζύμων, τα οποία καταλύουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τόσο των ιστονών όσο και άλλων πρωτεϊνών, όπως μεταγραφικών παραγόντων. Αυτές οι τροποποιήσεις ανήκουν σε μια ευρεία κατηγορία αντιδράσεων αποακετυλίωσης. Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση διαφόρων μονοπατιών και κυτταρικών διαδικασιών, όπως στην κυτταρική επιβίωση, το μεταβολισμό και την ανθεκτικότητα στο στρες. Η υπερέκφραση των σιρτουινών έχει αποδειχθεί ότι επεκτείνει τη διάρκεια ζωής σε πολλούς οργανισμούς-μοντέλα. Η εξάρτηση της ενεργότητας των σιρτουινών από το NAD είναι ένας μηχανισμός μέσω του οποίου ανιχνεύουν και ανταποκρίνονται στη μεταβολική κατάσταση, μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών απόκρισης στο στρες και αλλαγών στον ενεργειακό μεταβολισμό. Για παράδειγμα, η SIRT1 ενεργοποιεί σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι εμπλέκονται σε μονοπάτια απόκρισης στο στρες (π.χ. p53, FOXO και HSF1) (Vilchez et al., 2014; Pan and Finkel, 2017; Wedel et al., 2018).

Το ενδοκυτταρικό μονοπάτι σηματοδότησης του αυξητικού παράγοντα IGF-1 είναι ίδιο με αυτό που προκαλείται από την ινσουλίνη (INS), το οποίο ενημερώνει τα κύτταρα για την παρουσία της γλυκόζης. Αυτά τα δύο μονοπάτια σηματοδότησης (IIS) είναι τα πιο συντηρημένα μονοπάτια ελέγχου της γήρανσης κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Ανάμεσα στους πολλούς στόχους τους είναι η οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων FOXO, των οποίων η μετακίνηση στον πυρήνα ρυθμίζεται αρνητικά μέσω φωσφορυλίωσης και οι οποίοι εμπλέκονται λειτουργικά στη διατήρηση των βλαστοκυττάρων, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την απόπτωση, τη ρύθμιση του μεταβολισμού και την αντοχή σε μεταβολικό και οξειδωτικό στρες, καθώς και τα σύμπλοκα mTOR (Hipp et al., 2019). Μειωμένη σηματοδότηση αυτού του μονοπατιού έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διάρκειας ζωής (Pan and Finkel, 2017).

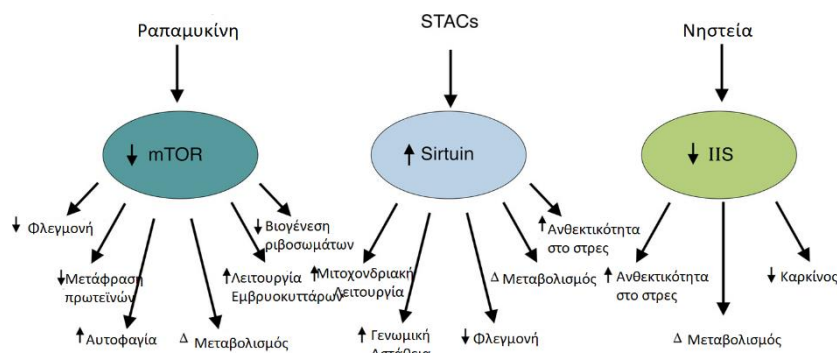
Ο στόχος της ραπαμυκίνης, TOR, είναι ένα κύριο κυτταρικό μονοπάτι ανίχνευσης θρεπτικών συστατικών, το οποίο ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και ενσωματώνει τη σηματοδότηση της ινσουλίνης και σήματα κυτταρικού στρες. Η TOR είναι μια υψηλά συντηρημένη κινάση σερίνης/θρεονίνης που αποτελείται από δύο λειτουργικά και δομικά διαφορετικά σύμπλοκα, το TORC1 και το TORC2. Η ραπαμυκίνη αναστέλλει κυρίως το TORC1, το οποίο ελέγχει διαδικασίες που σχετίζονται με την ανάπτυξη, όπως τη βιογένεση των ριβοσωμάτων, τη μεταγραφή, την πρωτεϊνοσύνθεση, την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, το μιτοχondριακό μεταβολισμό και την αυτοφαγία ως απόκριση στα κυτταρικά επίπεδα θρεπτικών, αυξητικών παραγόντων και ενέργειας. Η TORC1 ρυθμίζει τη μετάφραση και την ανάπτυξη μέσω φωσφορυλίωσης δύο καθοδικών παραγόντων, της ριβοσωμικής κινάσης S6K1 και του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της μετάφρασης 4E-BP. Αναστολή της λειτουργίας της TOR ή καθοδικών παραγόντων της έχει ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής. Γενικά, η TOR λειτουργεί ως αισθητήρας ενέργειας και αντιλαμβάνεται την αφθονία θρεπτικών συστατικών ή αυξητικών παραγόντων. Η ενεργοποίησή της προάγει τις αναβολικές διαδικασίες, ενώ αναστέλλει τις καταβολικές διαδικασίες, ώστε να προωθήσει την κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Riera et al., 2016; Pan and Finkel, 2017).

Τα προαναφερθέντα σηματοδοτικά δίκτυα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Μια κύρια διασύνδεση μεταξύ τους είναι η AMP-ενεργοποιούμενη πρωτεϊνική κινάση, AMPK. Η AMPK ανιχνεύει τα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών και ενεργοποιείται όταν τα επίπεδα κυτταρικής ενέργειας είναι χαμηλά, αναστέλλοντας έτσι τις αναβολικές διαδικασίες. Σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών, η AMPK ενεργοποιεί τη γλυκόλυση και την οξείδωση των λιπαρών οξέων, έτσι ώστε να αποκατασταθούν τα επίπεδα ATP. Οι αλλαγές αυτές στον ενδοκυτταρικό μεταβολισμό και η αύξηση στα επίπεδα NAD⁺ γίνεται μέσω αύξησης της ενεργότητας της SIRT1. Η SIRT1, όπως προαναφέρθηκε, ρυθμίζει την ενεργότητα των μεταγραφικών παραγόντων FOXO, συνδέοντας έτσι τη δράση της SIRT1 με τον καθοδικό παράγοντα του IIS μονοπατιού. Τέλος, η AMPK ρυθμίζει απευθείας την ενεργότητα της TOR κινάσης (Riera et al., 2016; Pan and Finkel, 2017).

Είναι πλέον αποδεκτό ότι, παρά την πολύπλοκη φύση της διαδικασίας της γήρανσης, τόσο η ποιότητα ζωής όσο και η μακροβιότητα μπορούν να βελτιωθούν και να αυξηθούν μέσω γενετικών, διατροφικών και/ή φαρμακολογικών παρεμβάσεων (Argyropoulou et al., 2013; Riera et al., 2016). Η πιο αποτελεσματική παρέμβαση για επιμήκυνση της μακροβιότητας σε οργανισμούς-μοντέλα είναι ο θερμιδικός περιορισμός, ο οποίος αφορά στη μείωση (χωρίς υποσιτισμό) της πρόσληψης τροφής κατά 10-50% κάτω από τα επίπεδα που τρέφονται τα θηλαστικά κατά βούληση. Ο θερμιδικός περιορισμός δεν προάγει μόνο τη μακροβιότητα, αλλά επίσης μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης των περισσότερων, αν όχι όλων,

των ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του διαβήτη, των καρδιαγγειακών και νευροεκφυλιστικών ασθενειών και του καρκίνου (Argyropoulou et al. 2013).

Δεδομένου όμως ότι οι γενετικές παρεμβάσεις ή ο θερμιδικός περιορισμός δε μπορούν να εφαρμοστούν στον άνθρωπο, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μεγάλο ενδιαφέρον για την ανεύρεση φυσικών προϊόντων (Natural Products, NPs) που ενδεχομένως μπορούν να επεκτείνουν το προσδόκιμο ζωής (Argyropoulou et al., 2013).



Εικόνα 5. Περιβαλλοντικές ή φαρμακολογικές στρατηγικές για την επιβράδυνση της γήρανσης. Φάρμακα, όπως η ραπαμυκίνη και τα STACs (sirtuin-activating compounds), καθώς και παρεμβάσεις στον τρόπο ζωής, όπως η νηστεία και ο θερμιδικός περιορισμός, επηρεάζουν την ενεργότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού IIS καθώς και των σηματοδοτικών μονοπατιών της κινάσης mTOR και των σιρτουινών. Αυτές οι αλλαγές επάγουν ένα πολύπλοκο δίκτυο λειτουργικών αλλαγών, που μεμονωμένα ή συλλογικά μπορούν να επιβραδύνουν τη διαδικασία της γήρανσης (*Προσαρμογή από Pan and Finkel, 2017*).

1.3.5. Γήρανση και δίκτυο πρωτεόστασης

Η ικανότητα των κυττάρων να διατηρούν λειτουργικό πρωτέωμα, σε συνθήκες ηρεμίας ή στρες, σταδιακά υποβαθμίζεται, με αποτέλεσμα να αναπτύσσεται πρωτεοτοξικότητα και οι οργανισμοί να γίνονται ευάλωτοι σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις (Kaushik and Cuervo, 2015; Klaips et al., 2018). Αυτές οι παθολογικές καταστάσεις ονομάζονται ηλικιο-εξαρτώμενες πρωτεϊνοπάθειες και αναφέρονται σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, καρδιομυοπάθειες και μεταβολικές διαταραχές (Sala et al. 2017). Επίσης, οι ασθένειες αυτές σχετίζονται με μειωμένη λειτουργία του δικτύου πρωτεόστασης, η οποία μπορεί να προκαλείται από μεταλλάξεις στα συστατικά του δικτύου ή από παρέμβαση τοξικών συσσωματωμάτων στη λειτουργία του δικτύου (Klaips et al. 2018).

Η πρωτεϊνοσύνθεση είναι πρωταρχικό σημείο ελέγχου της πρωτεόστασης και η ρύθμισή της είναι κρίσιμη για την κυτταρική ανάπτυξη και τη διατήρηση της ενδοκυτταρικής "δεξαμενής" πρωτεϊνών. Με την αύξηση της ηλικίας παρατηρείται ότι οι ρυθμοί σύνθεσης πρωτεϊνών τείνουν να μειώνονται, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στη μείωση του αριθμού των ριβοσωμάτων (Hipp et al. 2019). Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών μπορεί να είναι είτε ενζυμικές (Enzymatic protein modifications, EPMs) είτε μη ενζυμικές (Nonenzymatic protein modifications, NEPMs). Οι τροποποιήσεις της τελευταίας κατηγορίας αυξάνονται με την αύξηση της ηλικίας ή στις ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες και περιλαμβάνουν οξείδωση των πρωτεϊνών και/ή σχηματισμό τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advanced glycation end products, AGEs), τα οποία προέρχονται από εξωγενείς πηγές και κυρίως σχηματίζονται από αναγωγικά σάκχαρα και αλδεϋδες. Υψηλά επίπεδα εξωκυττάρων AGEs ενεργοποιούν ένα σύνολο μεμβρανικών υποδοχέων του πλάσματος προκαλώντας οξειδωτικό στρες και φλεγμονή, ενώ παράλληλα σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διάφορων ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών (Niforou et al., 2014).

Οι μοριακές συνοδοί, επίσης, επηρεάζονται από αλλαγές που παρατηρούνται κατά τη γήρανση. Για παράδειγμα, παρατηρείται καταστολή των ATP-εξαρτώμενων μοριακών συνοδών και επαγωγή των ATP-ανεξάρτητων μοριακών συνοδών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην περιορισμένη ποσότητα διαθέσιμου ATP λόγω μειωμένης μιτοχονδριακής λειτουργίας και απορρύθμισης του μεταβολισμού των λιπιδίων και της γλυκόζης, που παρατηρούνται στους οργανισμούς μεγαλύτερης ηλικίας. Επίσης, ανεπιθύμητες τροποποιήσεις στην πρωτεΐνη-υπόστρωμα μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητα των μοριακών συνοδών να την αναγνωρίζουν (Kaushik and Cuervo, 2015).

Η λειτουργικότητα του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος είναι βέλτιστη σε νεαρούς οργανισμούς, ενώ βαθμιαία με την αύξηση της ηλικίας μειώνεται, με αποτέλεσμα την αύξηση του πρωτεοτοξικού στρες, δεικνύοντας έτσι ότι το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος εμπλέκεται στην εμφάνιση και, πιθανόν, την εξέλιξη του φαινομένου της γήρανσης. Κατά τη γήρανση παρατηρείται συσσώρευση μιας λανθασμένης μορφής της ουβικιτίνης (Ubb+1), καθώς επίσης και των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών. Η Ubb+1 είναι μια μεταλλαγμένη μορφή της ουβικιτίνης, που παρουσιάζει διαφορετικές ιδιότητες σύνδεσης και προκαλεί δυσλειτουργία του πρωτεασώματος και απόπτωση. Η συσσώρευση ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών σχετίζεται με τη μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος κατά τη διάρκεια της γήρανσης (Tsakiri and Trougakos, 2015).

Η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος διακρίνεται με τη μείωση της έκφρασης των υπομονάδων του ή/και της συναρμολόγησης πρωτεασωμάτων ή με την απόφραξη του λόγω αυξημένης συσσώρευσης πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων στο εσωτερικό του. Η μειωμένη

έκφραση των υπομονάδων του πρωτεασώματος φαίνεται να οφείλεται στη δυσλειτουργία του μονοπατιού NRF2/KEAP1 κατά τη διάρκεια της γήρανσης (Schmidt and Finley, 2014; Tsakiri and Trougakos, 2015). Επίσης, κατά τη διάρκεια της γήρανσης παρατηρείται μείωση της ενεργότητας του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσοσώματος (Vilchez et al. 2014). Η μείωση της ενεργότητας των δύο πρωτεολυτικών μονοπατιών επιταχύνει την πρωτεωμική βλάβη και μειώνει τη διάρκεια ζωής, ενώ γενετική ή φαρμακολογική ενεργοποίηση του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος ή των ρυθμιστών του καθυστερεί την κυτταρική γήρανση ή την *in vivo* γήρανση. Έτσι, η ρύθμιση της ενεργότητας των πρωτεολυτικών μονοπατιών αποτελεί μια σημαντική προσέγγιση για την επιβράδυνση του ρυθμού της γήρανσης ή μια θεραπευτική προσέγγιση εναντίον διαφόρων ασθενειών σχετιζόμενων με το γήρας (Sklirou et al. 2018)(Tsakiri and Trougakos 2015).

1.4. Φυσικά Προϊόντα

Τα φυσικά προϊόντα, εκχυλίσματα ή καθαρά μόρια, αποτελούν μία μεγάλη κατηγορία εξαιρετικά διαφορετικών δομικών ικριωμάτων, που μπορούν να προσφέρουν υποσχόμενα αποτελέσματα στην πρόκληση για αύξηση της διάρκειας υγιούς ζωής και/ή στην καθυστέρηση της γήρανσης (Argyropoulou et al. 2013; Wedel et al. 2018). Τα φυσικά προϊόντα μπορούν να απομονωθούν από διάφορες πηγές της βιόσφαιρας. Για παράδειγμα, η τεράστια βιοποικιλότητα των θαλάσσιων οικοσυστημάτων προσφέρει πολλαπλές ευκαιρίες βιολογικής αναζήτησης, εκμετάλλευσης και χρήσης, καθώς είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι θαλάσσιοι οργανισμοί διαθέτουν την ικανότητα να παράγουν μια τεράστια ποικιλία μορίων με μοναδικά δομικά και βιολογικά χαρακτηριστικά λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Έτσι, το θαλάσσιο περιβάλλον αποτελεί μια ενδιαφέρουσα πηγή φυσικών ενώσεων με πιθανές αντιγηραντικές ιδιότητες (Argyropoulou et al. 2013). Επίσης, οι μικροοργανισμοί εκτεθειμένοι σε διαφορετικούς τύπους στρες, όπως η υπερϊώδης ακτινοβολία, οι θερμοκρασιακές διακυμάνσεις, η διαθεσιμότητα του νερού και ο ενδο-/δια-ειδικός ανταγωνισμός για πόρους, έχουν εξελιχθεί έτσι, ώστε να παράγουν ένα μεγάλο φάσμα βιοδραστικών φυσικών μορίων (Peyrat et al. 2019).

Τα φυσικά προϊόντα καθυστερούν την κυτταρική γήρανση και/ή επιμηκύνουν την μακροβιότητα κυρίως μέσω ενεργοποίησης κυτταροπροστατευτικών πρωτεοστατικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Wedel et al. 2018). Έτσι, τα φυσικά μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακολογικοί ρυθμιστές των μονοπατιών σηματοδότησης, που εμπλέκονται στη ρύθμιση της γήρανσης, όπως, για παράδειγμα, των σηματοδοτικών μονοπατιών ανίχνευσης των θρεπτικών συστατικών, μιμούμενα έτσι την επίδραση του θερμιδικού περιορισμού. Επίσης, τα φυσικά προϊόντα μπορούν να μεσολαβήσουν στην προστασία των βιομορίων από βλάβες σχετιζόμενες με την ηλικία, είτε μέσω άμεσης

εξουδετέρωσης των στρεσογόνων παραγόντων, είτε μέσω ήπιας ενεργοποίησης των μονοπατιών απόκρισης στο στρες (Argyropoulou et al. 2013). Έτσι, υπάρχουν αρκετά φυσικά προϊόντα, που έχουν μελετηθεί και έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και/ή το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος (Wedel et al. 2018).

Η ρεσβερατρόλη είναι μια φυσική πολυφαινόλη, που συναντάται σε πολλά φυτά συμπεριλαμβανομένων των σταφυλιών, των μούρων, του φυτού πολυγόνου και των φιστικιών. Έχει πολλές ωφέλιμες επιδράσεις στην υγεία, όπως αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και κυτταροπροστατευτικές ιδιότητες. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι σε πολλούς οργανισμούς προωθεί τη μακροβιότητα και επιβραδύνει την εξέλιξη διαφόρων ηλικιο-εξαρτώμενων ανθρώπινων ασθενειών. Η ρεσβερατρόλη αποτελεί ισχυρό αναστολέα παραγωγής ROS και οξείδωσης των πρωτεϊνών. Έχει αποδειχθεί ότι επάγει την αυτοφαγία μέσω διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον. Προσδένεται απευθείας στην θέση πρόσδεσης ATP της κινάσης mTOR, αναστέλλοντας τη δράση της, ενεργοποιώντας έτσι το μονοπάτι της αυτοφαγίας. Επιπλέον, η ρεσβερατρόλη ενεργοποιεί τον παράγοντα NRF2, ενισχύοντας τη μεταγραφή αντιοξειδωτικών ενζύμων (Mehta, Rayalam, and Wang 2018). Τέλος, έχει δείχθει ότι η ρεσβερατρόλη επάγει τη δράση των σιρτουινών στους οργανισμούς *S. cerevisiae*, *C. elegans* και *D. melanogaster* με αποτέλεσμα τη μακροβιότητα (Baur and Sinclair 2006; Bhullar and Hubbard 2015; Conaway et al. 1999; Wood et al. 2004).

Η μετφορμίνη είναι ένα άλλο φυσικό προϊόν, το οποίο προέρχεται από τη γουανιδίνη και επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής. Η ευεργετική δράση της εντοπίζεται στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2, καθώς και της κινάσης AMPK, η οποία μειώνει τη σηματοδότηση των μονοπατιών ανίχνευσης θρεπτικών μέσω καταστολής της ενεργότητας των TOR και S6K. Επίσης, επιβραδύνει τη σχετιζόμενη με τη γήρανση συσσώρευση λιποφουσκίνης. Η μετφορμίνη έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 και του μεταβολικού συνδρόμου (Berstein 2012).

Η κουρκουμίνη προέρχεται από τον κουρκουμά και έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, νευρο- και καρδιο-προστατευτικές ιδιότητες. Μελέτες αναφέρουν ότι η χορήγηση κουρκουμίνης, η οποία παράγεται από το φυτό *Curcuma longa*, στους οργανισμούς *C. elegans*, *D. melanogaster* και *M. musculus* οδήγησε σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής τους (Liao et al. 2011; Shehzad et al. 2011; Shen, Parnell, et al. 2013; Shen, Xiao, et al. 2013). Σε μοριακό επίπεδο, η ευεργετική δράση της κουρκουμίνης πιθανόν οφείλεται στην ενεργοποίηση των σιρτουινών και της αντιοξειδωτικής απόκρισης μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 και της αναστολής του μονοπατιού TOR. Τέλος, φαίνεται να επάγει την απόπτωση μέσω ενεργοποίησης της αυτοφαγίας σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων (Argyropoulou et al. 2013; Bielak-Zmijewska et al. 2019; Wedel et al. 2018).

Οι κατεχίνες είναι πολυφαινόλες, οι οποίες κατέχουν αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιαγγειογόνες ιδιότητες και φαίνεται να έχουν ωφέλιμες επιδράσεις στη θεραπεία και την πρόληψη του καρκίνου, του διαβήτη, της παχυσαρκίας, νευροεκφυλιστικών και καρδιαγγειακών ασθενειών. Επιπλέον, ενισχύουν την ανθεκτικότητα σε οξειδωτικό/θερμικό στρες και έχει βρεθεί ότι επεκτείνουν το προσδόκιμο ζωής σε διάφορους οργανισμούς (Argyropoulou et al. 2013; Wedel et al. 2018).

Η σουλφοραφάνη είναι ένα φυσικό προϊόν που μπορεί να απομονωθεί από μαγειρεμένα λαχανικά και είναι παρόν σε μια ποικιλία από του στόματος συμπληρωμάτων διατροφής, τα οποία περιλαμβάνουν την καθαρή μορφή του ή το εκχύλισμα του βλαστού του μπρόκολου. Η σουλφοραφάνη έχει χαρακτηριστεί για τις αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητές της, οι περισσότερες εκ των οποίων οφείλονται στην ικανότητά της να ενεργοποιεί το μονοπάτι NRF2/KEAP1. Επιπλέον, επάγει διάφορα αντιοξειδωτικά ένζυμα και ένζυμα μεταβολισμού φαρμάκων φάσης II σε διάφορους ιστούς, καθώς επίσης έχει χημειοπροστατευτικές επιδράσεις εναντίον της καρκινογένεσης (Wedel et al. 2018).

Η ρεσερπίνη έχει αποδειχθεί ότι επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής στον οργανισμό-μοντέλο *C.elegans*. Διαθέτει αντικαρκινική δράση και επάγει την ενεργοποίηση του παράγοντα NRF2 και την έκφραση κυτταροπροστατευτικών γονιδίων. Ωστόσο, η κλινική χρήση της ως αντιψυχωτικό και αντιυπερτασικό φάρμακο έχει αποκαλύψει την ύπαρξη διαφόρων παρενεργειών, όπως αναπνευστικών, ψυχιατρικών και καρδιαγγειακών επιπλοκών. Η ελαιοευρωπαϊνή είναι ένα φυσικό μόριο, το οποίο προέρχεται από το εκχύλισμα του φύλλου της ελιάς, έχει αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες και αυξάνει την αναδιπλασιαστική περίοδο του κυττάρου. Καταστέλλει το οξειδωτικό στρες, καθώς έχει την ικανότητα απομάκρυνσης των ελεύθερων ριζών, μειώνει την οξείδωση των πρωτεϊνών και αυξάνει σε χαμηλές συγκεντρώσεις την πρωτεασωματική ενεργότητα, καθυστερώντας έτσι την κυτταρική γήρανση (Argyropoulou et al. 2013; Wedel et al. 2018).

Η οσθόλη παρουσιάζει μια ποικιλία ωφέλιμων για την υγεία ιδιοτήτων, όπως νευροπροστασία, προστασία του ήπατος, καρδιαγγειακή προστασία, πρόληψη έναντι του καρκίνου, της φλεγμονής και της μόλυνσης και ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος (Zhang et al. 2015). Η σπερμιδίνη είναι μια φυσική πολυαμίνη, η οποία συντίθεται και υπάρχει σε πολλά φυτά, ζώα και ανθρώπους. Διαθέτει αντιγηραντικές ιδιότητες και φαίνεται να αυξάνει το προσδόκιμο ζωής σε διάφορους οργανισμούς, καθώς επίσης και την πολλαπλασιαστική ικανότητα των φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων. Η σπερμιδίνη αποτελεί ενεργοποιητή της αυτοφαγίας, μειώνει τις προκαλούμενες από οξειδωτικό στρες βλάβες και επιπλέον, βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία. Η κερκετόλη είναι ένα από τα πιο κοινά διαιτητικά φλαβονοειδή, που συναντώνται στα λαχανικά και τα φρούτα, όπως στο μπρόκολο, τα κρεμμύδια, τα κεράσια, τα κόκκινα σταφύλια, τα μήλα και τα μούρα. Είναι

γνωστή για τις αντιοξειδωτικές της ικανότητες και επιπλέον, έχει βρεθεί ότι επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής. Η κερκετόλη αυξάνει την ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες και ρυθμίζει ένα σύνολο γονιδίων, που σχετίζονται κυρίως με τα μονοπάτια ανίχνευσης θρεπτικών συστατικών. Τέλος, φαίνεται να επάγει την απόπτωση σε διάφορες καρκινικές σειρές (Argyropoulou et al. 2013; Wedel et al. 2018).

Η ασταξανθίνη είναι ένα καροτενοειδές, το οποίο προέρχεται από υδρόβιους οργανισμούς και επάγει μακροβιότητα στον οργανισμό-μοντέλο *C.elegans* μέσω ενίσχυσης της έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ένα άλλο φυσικό προϊόν με αντιγηραντικές ιδιότητες είναι η ραπαμυκίνη, η οποία έχει πρόσφατα χρησιμοποιηθεί ως ανοσοκατασταλτικό. Η ραπαμυκίνη επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής μέσω αναστολής του μονοπατιού της κίνησης TOR και των επακόλουθων καθοδικών αλλαγών στην αυτοφαγία και το ρυθμό πρωτεϊνοσύνθεσης. Παρέχει αυξημένη αντοχή στο οξειδωτικό στρες και έχει προστατευτικές επιδράσεις έναντι διαφόρων σχετιζόμενων με τη γήρανση ασθενειών (Argyropoulou et al. 2013).

Επιπρόσθετα, μελέτες έχουν δείξει ότι και διάφορα φυσικά εκχυλίσματα κατέχουν αντιγηραντικές ιδιότητες. Για παράδειγμα, το εκχύλισμα από τα πέταλα των τριαντάφυλλων, το οποίο είναι πλούσιο σε φαινολικά μόρια, διαθέτει αντιοξειδωτική, αντιβακτηριακή και αντιγηραντική δράση, καθώς και παρέχει προστασία έναντι των καρδιαγγειακών ασθενειών (Boskabady, Kiani, and Rakhshandah 2006; Dong et al. 2012; Schriener et al. 2012). Επίσης, εκχυλίσματα από βρώσιμα μπαχαρικά, όσπρια, λαχανικά και φρούτα, τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικά της Μεσογειακής διατροφής, έχει αποδειχθεί ότι φέρουν σημαντική αντιγηραντική δράση. Για παράδειγμα, η ρίγανη διαθέτει σημαντική αντιμικροβιακή δράση, ενώ το εκχύλισμά της είναι γνωστό για την αντι-υπερλιπιδαιμική και αντιοξειδωτική του ικανότητα (Dong et al. 2012; Ličina et al. 2013).

Παρόλα αυτά, ο αριθμός των διαθέσιμων φυσικών προϊόντων που παρουσιάζουν αντιγηραντική δράση είναι αρκετά χαμηλός. Ωστόσο, μεγάλο μέρος της παγκόσμιας φυτικής, υδρόβιας και μικροβιακής ποικιλότητας παραμένει ανεξερεύνητο. Συνοψίζοντας, μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και ενδεχομένως και της μακροβιότητας αποτελεί η κατανάλωση διατροφικών βιοδραστικών φυσικών προϊόντων που ενεργοποιούν τους πρωτεοστατικούς και/ή αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου και συνεπώς καθυστερούν την εμφάνιση της γήρανσης και των ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών (Sklirou et al. 2018; Wedel et al. 2018). Αξίζει ωστόσο, να αναφερθεί ότι αποτελέσματα που έχουν προκύψει από οργανισμούς-μοντέλα δεν εφαρμόζονται σε όλες τις περιπτώσεις και στον άνθρωπο, ενώ κρίνεται αναγκαίο να ταυτοποιηθούν οι μη τοξικές δοσολογίες των φυσικών προϊόντων (Wedel et al. 2018).

1.5. Σκοπός

Η διατήρηση της ομοιοδυναμικής ισορροπίας του πρωτεώματος είναι σημαντική για τη σωστή λειτουργία των κυττάρων και συνολικά για την επιβίωση του οργανισμού. Ο έλεγχος της πρωτεόστασης πραγματοποιείται από ένα πολύπλοκο δίκτυο παραγόντων, το δίκτυο πρωτεόστασης. Η απορρύθμιση των μηχανισμών του δικτύου πρωτεόστασης και η απώλεια της πρωτεόστασης έχουν ως αποτέλεσμα την πρωτεωμική αστάθεια και συμμετέχουν στην ανάπτυξη και τον καθορισμό του φαινοτύπου της γήρανσης.

Στα πλαίσια αυτά, σκοπός της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης φυσικών προϊόντων στα στοιχεία του δικτύου πρωτεόστασης και την αντιοξειδωτική απόκριση των κυττάρων με απώτερο στόχο την ανίχνευση βιοδραστικών μορίων με πιθανή αντι-γηραντική δράση.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2. Υλικά-Μέθοδοι

2.1. Υλικά

2.1.1. Βιολογικό υλικό

2.1.1.1. Κυτταρικές σειρές

Η κυτταρική σειρά ανθρώπινων φυσιολογικών δερματικών ινοβλαστών BJ, και οι καρκινικές σειρές Caco-2 (κυτταρική σειρά ανθρώπινου ορθοκολικού καρκινώματος), MDA-MB-231 και MCF7 (κυτταρικές σειρές ανθρώπινου αδenoκαρκινώματος μαστού), και PC-3 (κυτταρική σειρά ανθρώπινου καρκινώματος προστάτη) αγοράστηκαν από την εταιρεία American Tissue Culture Collection (ATCC). Η κυτταρική σειρά ανθρώπινων αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων HaCaT αγοράστηκε από την εταιρεία Elabscience, Inc.

2.1.2. Υλικά κυτταροκαλλιέργειας

Το θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM) (41966-029), ο ορός εμβρύου βοός (fetal bovine serum, FBS) (10270-106), το διάλυμα μη απαραίτητων αμινοξέων 100x (non-essential amino acids) (11140-050), το διάλυμα θρυψίνης/EDTA 10x (15400-054), καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate-Buffered Saline, PBS) 10x (70011-044) αγοράστηκαν από την εταιρεία Thermo Fisher Scientific. Επίσης, το θρεπτικό υλικό Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640, που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς PC-3 αγοράστηκε από την ίδια εταιρεία.

2.1.3. Χημικά αντιδραστήρια

Το εκχύλισμα XTMm223-S2-BM και το φυσικό μόριο TM1-S3 LAEMB T89-100 P1 προέρχονται από μια βιβλιοθήκη μικροβιακών συμβιωτικών οργανισμών, οι οποίοι έχουν απομονωθεί από θαλάσσια ασπόνδυλα, όπως μαλάκια, κοράλλια, σφουγγάρια, χιτωνοειδή, εχινόδερμα και θαλάσσιες ανεμώνες. Τα ασπόνδυλα αυτά ζουν στη μεσοφωτική ωκεάνια ζώνη (βάθος μεταξύ 30 και 150 μέτρων) τροπικών κοραλλιογενών και εύκρατων οικοσυστημάτων του Ινδικού Ωκεανού, των ακτών της Ταϊλάνδης, της Ερυθράς θάλασσας και της Ανατολικής Μεσογείου.

Τα φυτικά εκχυλίσματα Α, Β, Γ και Δ έχουν απομονωθεί από το φυτό *Cichorium intybus* με διαφορετική μέθοδο εκχύλισης το καθένα. Αρχικά, για την απομόνωση του εκχυλίσματος

Α χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκχύλισης με υπερήχους (Sonication-assisted Extraction), η οποία βασίζεται στη χρήση υπερήχων για τη διατάραξη της ακεραιότητας των κυττάρων και την απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών, βιοδραστικών ουσιών στο διαλύτη, ο οποίος στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι ένα μείγμα αιθανόλης και νερού σε αναλογία 1:1. Για το εκχύλισμα Β χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκχύλισης με υπερκρίσιμα υγρά (Supercritical Fluid Extraction, SFE), στην οποία το διαλυτικό μέσο δεν είναι υγρό ή αέριο αλλά βρίσκεται σε μια ενδιάμεση κατάσταση (υπερκρίσιμη κατάσταση) και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το CO₂ μαζί με 5% αιθανόλη. Τα εκχυλίσματα Γ και Δ απομονώθηκαν με την τεχνική επιταχυνόμενης εκχύλισης (Accelerated Solvent Extraction, ASE), η οποία αποτελεί μια αυτοματοποιημένη μέθοδο στερεής-υγρής εκχύλισης που πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις. Η διαφορά στη μέθοδο εκχύλισης των δύο εκχυλισμάτων είναι ότι στην περίπτωση του Γ χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ο αιθανικός αιθυλεστέρας, ενώ στην περίπτωση του Δ χρησιμοποιήθηκε μείγμα αιθανόλης και νερού σε αναλογία 1:1.

Τα αντιδραστήρια, που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και οι εταιρείες από τις οποίες αγοράστηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήριο	Εταιρεία	Κωδικός
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories, Inc.	1705061
CM-H ₂ DCFDA	Thermo Fisher Scientific	C6827
FastGene Scriptase II cDNA Kit	NIPPON Genetics	LS64
Phosphatase inhibitor cocktail I	Sigma-Aldrich, Inc.	P2850
Phosphatase inhibitor cocktail II	Sigma-Aldrich, Inc.	P5726
Pink Prestained Protein Marker	Nippon Genetics Europe GmbH	MWP02
Protease inhibitor cocktail	Sigma-Aldrich, Inc.	P8340
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories, Inc.	5000006
RNAiso plus (Total RNA extraction reagent)	Takara	9109
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Suc-LLVY-AMC, LLVY)	Enzo Life Sciences, Inc.	BML-P802
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich, Inc.	M2128

Z-Phe-Arg-AMC (Z-FR-AMC)	Enzo Life Sciences, Inc.	P139
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	Solis BioDyne,	08-36-00001

2.1.4. Αντισώματα

Αντίσωμα	Εταιρεία	Κωδικός
20S proteasome α 7/PSMA3	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-100456
20S proteasome β 5/PSMB5	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-55009
53BP1	Cell Signaling Technology, Inc.	4937
Beclin1 (BECN1)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-11427
Clusterin (CLU)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-6419
donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2020
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-25778
goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2005
goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-2004
HSP27	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-13132
HSP70	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-59570
NQO1	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-16464
p53	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-47698
phospho-p53 ^{Ser15}	Cell Signaling Technology, Inc.	9286
SQSTM1/p62	Enzo Life Sciences, Inc.	BML-PW9860

2.1.5. PCR εκκινητές

Εκκινητής	Αλληλουχία
<i>HMBS-F</i>	AAGAGACCATGCAGGCTACCA
<i>HMBS-R</i>	ACAAGTTGGCCAGGCTGATG
<i>PSMB6-F</i>	GACCTGATGGCGGGAATCAT
<i>PSMB6-R</i>	CAAAGCGAGAGCATTGGCA
<i>PSMB7-F</i>	CAAGCTGGATTTTCTCCGCC
<i>PSMB7-R</i>	TGATTTTCTCAGTGAGGACTGC
<i>RPN11-F</i>	ACGGAAGCCGAAGCAAATA
<i>RPN11-R</i>	GCAAACCGGCGATGAATCAG
<i>SQSTM1-F</i>	CATCGGAGGATCCGAGTGTG

<i>SQSTM1-R</i>	TTCTTTTCCCTCCGTGCTCC
<i>CTSL-F</i>	ACAGGGAAGGGAAACACAGC
<i>CTSL-R</i>	TTCACAGGAGTCACGTAGCC
<i>CTSD-F</i>	ACCTTCATCGCAGCCAAGTT
<i>CTSD-R</i>	AGCACGTTGTTGACGGAGAT
<i>CTSB-F</i>	GCCAACTCCTGGAACACTGA
<i>CTSB-R</i>	GTACTGATCGGTGCGTGGA
<i>NRF2-F</i>	CATCCAGTCAGAAACCAGTGG
<i>NRF2-R</i>	GCAGTCATCAAAGTACAAAGCAT
<i>NQO1-F</i>	AGCAGACGCCCGAATTCAA
<i>NQO1-R</i>	AGAGGCTGCTTGGAGCAAAA
<i>TXNRD1-F</i>	TTGGAGTGCCTGGATTCT
<i>TXNRD1-R</i>	TTTGTTGGCCATGTCCTGGT

2.1.6. Όργανα

Όργανο	Εταιρεία
Επωαστικός κλίβανος για τη διατήρηση κυτταροκαλλιιεργειών (Forma™ Series II Water-Jacketed CO ₂ Incubators, Model 3100 Series)	Thermo Fisher Scientific
Θάλαμος νηματικής ροής (Biological Safety Cabinet, Safemate 1.2, BioAir)	EUROCLONE S.p.A.
Δεξαμενή υγρού αζώτου για τη φύλαξη των κυττάρων (Biorack 300 Liquid Nitrogen Sample Storage Tank)	Statebourne Cryogenics Ltd
Ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης με ενσωματωμένη ψηφιακή μηχανή (Inverted Phase Contrast Microscope Eclipse TS-100F equipped with DS-L3 Camera)	Nikon Corporation
Φυγόκεντρος με κεφαλή για σωληνάρια όγκου 15 ml (Zentrifugen Universal 16A)	Hettich Holding GmbH & Co. oHG
Ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος (Heraeus™ Fresco™ 17 Microcentrifuge)	Thermo Fisher Scientific
Φασματοφωτόμετρο πλακών μικροτιτλοδότησης (SPARK® multimode microplate reader)	Tecan Trading AG
Φασματοφωτόμετρο (BioSpec-nano spectrophotometer)	Shimadzu Inc.

Φασματοφωτόμετρο (Genova Bio Life Science Jenway Spectrophotometer)	
Φθορισμόμετρο (VersaFluor™ Fluorometer System)	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Συσκευή σύνθεσης cDNA (Minicycler PTC-150)	MJ Research Inc
Συσκευή Q-Real-Time PCR (PikoReal™ Real-Time PCR System)	Thermo Fisher Scientific
Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (PerfectBlue™ vertical double gel systems)	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών (PerfectBlue™ Tank Electro Blotter)	PEQLAB Biotechnologie GmbH

2.2 Μέθοδοι

2.2.1. Κυτταροκαλλιέργειες

2.2.1.1. Διατήρηση και ανακαλλιέργεια των κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές BJ και HaCaT καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM παρουσία 10 % (v/v) FBS και 1 % (v/v) μη απαραίτητων αμινοξέων. Οι καρκινικές κυτταρικές σειρές MDA-MB-231, MCF7 και Caco2 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM παρουσία 10 % (v/v) FBS, ενώ η καρκινική σειρά PC-3 καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό RPMI παρουσία 10 % (v/v) FBS. Οι καλλιέργειες όλων των κυτταρικών σειρών αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο σε συνθήκες ατμόσφαιρας CO₂ 5 %, υγρασίας 95 % και θερμοκρασίας 37 °C.

Τα κύτταρα όταν φτάσουν στο 90 % της κάλυψης του πυθμένα της φιάλης ή του τρυβλίου καλλιέργειας ανακαλλιεργούνται με την διαδικασία της θρυψινοποίησης. Όλα τα υλικά κυτταροκαλλιέργειας, που χρησιμοποιούνται, θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία 37 °C. Αρχικά, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και προστίθεται διάλυμα PBS, έτσι ώστε τα κύτταρα να εκπλυθούν και να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ορού, τα οποία περιέχουν αναστολείς της θρυψίνης. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα θρυψίνης/EDTA, το οποίο διασπά τις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων, καθώς και μεταξύ των κυττάρων και του στερεού υποστρώματός τους. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37 °C, έως ότου συρρικνωθούν και στρογγυλοποιηθούν, και ακολουθεί η αποκόλλησή τους με ήπιες μηχανικές αναταράξεις της φιάλης καλλιέργειας. Γίνεται αδρανοποίηση της θρυψίνης και επαναιώρηση των

κυττάρων σε νέο θρεπτικό υλικό με επανειλημμένες ήπιες αναρροφήσεις. Τέλος, τα κύτταρα μοιράζονται σε νέες φιάλες με κατάλληλο λόγο κατανομής.

2.2.1.2. Απόψυξη και ψύξη των κυτταρικών σειρών

Τα κύτταρα μπορούν να φυλαχθούν στους $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ στο υγρό άζωτο για μεγάλο χρονικό διάστημα και μετά από απόψυξη και επαναφορά στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ να ανακαλλιεργηθούν, διατηρώντας τις ιδιότητές τους. Για να είναι επιτυχής η ψύξη των κυττάρων, τα κύτταρα θα πρέπει να βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και ο μεταβολισμός τους να είναι έντονος. Για την ψύξη των κυττάρων χρησιμοποιείται το διάλυμα ψύξης (freezing medium), το οποίο αποτελείται από 50 % (v/v) FBS, 40 % (v/v) πλήρες θρεπτικό υλικό της εκάστοτε κυτταρικής σειράς και 10 % (v/v) DMSO. Το DMSO (Dimethyl sulfoxide) είναι ένα αντιδραστήριο με κρυοπροστατευτικές ιδιότητες, καθώς περιορίζει τη δημιουργία κρυστάλλων προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα κατά τη διαδικασία ψύξης-απόψυξης. Μετά την προσθήκη του διαλύματος ψύξης τα κύτταρα τοποθετούνται σε αποστειρωμένα φιαλίδια. Η ψύξη των κυττάρων γίνεται σταδιακά, καθώς τα κύτταρα φυλάσσονται αρχικά στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 ώρα, στη συνέχεια στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 24 ώρες και τέλος τοποθετούνται στους $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε δεξαμενές υγρού αζώτου για φύλαξη. Αντίθετα, η διαδικασία της απόψυξης είναι ταχεία, προκειμένου να αποφευχθεί η δημιουργία βλαβών στα κύτταρα από τους κρυστάλλους, που πιθανόν έχουν δημιουργηθεί κατά την ψύξη. Αρχικά, το φιαλίδιο, αφού απομακρυνθεί από το υγρό άζωτο, τοποθετείται απευθείας σε υδατόλουτρο στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στη συνέχεια, το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε φιάλη καλλιέργειας, που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό. Την επόμενη μέρα, και αφού έχει ολοκληρωθεί η προσκόλληση των κυττάρων, γίνεται αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού, προκειμένου να απομακρυνθεί το DMSO, που περιείχε το διάλυμα ψύξης και το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα.

2.2.1.3. Μέτρηση αριθμού κυττάρων

Για την καταμέτρηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer. Αρχικά, αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της θρυψινοποίησης, τα κύτταρα επαναιωρούνται στο θρεπτικό τους υλικό και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά σε 1.500 rpm. Ακολούθως, το υπερκείμενο απορρίπτεται, ενώ το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε θρεπτικό υλικό. Από το διάλυμα των κυττάρων 10 μl τοποθετούνται στο αιμοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer, έτσι ώστε να καλύπτονται τα τέσσερα τεταρτημόρια του, καθένα από τα οποία διαθέτει χωρητικότητα ίση με 10^{-4} ml . Υπολογίζεται ο μέσος όρος των κυττάρων στα τέσσερα τεταρτημόρια, και η τιμή που

προκύπτει πολλαπλασιάζεται με 10^4 . Η τελική τιμή που προκύπτει αντιστοιχεί στη συγκέντρωση των κυττάρων ανά ml.

2.2.2. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη δοκιμασία MTT

Τα ζωντανά κύτταρα και, συνεπώς, τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα, έχουν την ικανότητα να ανάγουν το υδατοδιαλυτό άλας του τετραζολίου MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], με αποτέλεσμα την παραγωγή κρυστάλλων φορμαζανίου, οι οποίοι έχουν ιώδες χρώμα. Σε αυτή την ικανότητα των ζωντανών κυττάρων βασίζεται η δοκιμασία MTT για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων. Το MTT διαπερνά την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και ανάγεται από μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες με αποτέλεσμα την παραγωγή αδιάλυτου φορμαζανίου. Οι κρύσταλλοι, που σχηματίζονται, διαταράσσουν την ακεραιότητα των κυττάρων και επέρχεται κυτταρικός θάνατος.

Με την προσθήκη ισοπροπανόλης, DMSO ή άλλων οργανικών διαλυτών γίνεται λύση των κυττάρων, διαλυτοποίηση των κρυστάλλων φορμαζανίου και παραγωγή ενός έγχρωμου προϊόντος, του οποίου η απορρόφηση μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά σε μήκος κύματος 500-600 nm. Η απορρόφηση αυτή είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του έγχρωμου προϊόντος και συνεπώς του αριθμού των μεταβολικά ενεργών κυττάρων. Έτσι, η δοκιμασία MTT αντανάκλα άμεσα τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα και συνεπώς τη βιωσιμότητα ενός κυτταρικού πληθυσμού.

Για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας, εναιώρημα κυττάρων σε θρεπτικό υλικό επιστρέφεται σε πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων και μετά την προσκόλλησή τους, επωάζονται με τον παράγοντα επίδρασης στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Με το πέρας της επώασης, απομακρύνεται το υλικό από τα κύτταρα και προστίθεται MTT (Sigma-Aldrich, Inc.), το οποίο είναι διαλυμένο σε άχρωμο θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση 1 mg/ml. Γίνεται επώαση για 3-4 ώρες και στη συνέχεια, αφαιρείται το διάλυμα MTT και προστίθεται ανάλογη ποσότητα ισοπροπανόλης. Τέλος, με χρήση του φασματοφωτόμετρου πλακών μικροτιτλοδότησης TECAN εκτιμάται η συγκέντρωση του έγχρωμου προϊόντος σε μήκος κύματος απορρόφησης 570 nm.

2.2.3. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford είναι μια φασματοφωτομετρική διαδικασία, με την οποία γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινες συνθήκες απουσία πρωτεϊνών στο διάλυμα απορροφά σε μήκος κύματος 465 nm, ενώ παρουσία πρωτεϊνών η χρωστική προσδένεται σε αυτές και έτσι το μήκος κύματος απορρόφησης μετατοπίζεται στα 595 nm. Για την πραγματοποίηση της μεθόδου, για κάθε δείγμα σε ένα

σωληνάριο τύπου eppendorf τοποθετούνται 200 µl διαλύματος Bradford 5x (Bio-Rad Laboratories, Inc.), 800 µl dH₂O και 1µl δείγματος. Για την μέτρηση είναι απαραίτητη η δημιουργία και ενός δείγματος μάρτυρα (τυφλό), το οποίο αντί για δείγμα περιέχει 1 µl από τον διαλύτη, στον οποίο είναι διαλυμένες οι πρωτεΐνες. Τέλος, ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του κάθε δείγματος γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία έχει κατασκευαστεί χρησιμοποιώντας ως πρότυπο διάλυμα την αλβουμίνη ορού βοός (bovine serum albumin, BSA).

2.2.4. Μέτρηση της ενεργότητας του πρωτεασώματος

Για τη μέτρηση της κύριας ενεργότητας του πρωτεασώματος, δηλαδή της χυμοθρυψίνης χρησιμοποιήθηκε το φθοροπεπτίδιο Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (LLVY) (Enzo Life Sciences, Inc.). Αρχικά, γίνεται θρυψινοποίηση των κυττάρων, καταμέτρησή τους και επίστρωση κατάλληλου αριθμού κυττάρων σε τρυβλία καλλιέργειας. Μετά την προσκόλλησή τους, γίνεται επώαση για το επιθυμητό χρονικό διάστημα με τον υπό μελέτη παράγοντα επίδρασης, ο οποίος διαλύεται στο θρεπτικό υλικό της εκάστοτε κυτταρικής σειράς.

Με το πέρας της επώασης, πραγματοποιείται θρυψινοποίηση, μεταφορά των κυττάρων σε σωλήνα φυγοκέντρωσης και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 1.500 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε PBS, μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου eppendorf και φυγοκεντρείται ξανά στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο, γίνεται λύση των κυττάρων με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος λύσης [0,2 % (v/v) Nonidet P-40, 5 mM ATP, 10 % (v/v) γλυκερόλη, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6] και επώαση στους 4 °C για 30 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση.

Στη συνέχεια, γίνεται φυγοκέντρωση (13.300 rpm, 15 min, 4 °C), συλλέγονται οι πρωτεΐνες, οι οποίες βρίσκονται στο υπερκείμενο, και πραγματοποιείται προσδιορισμός της συγκέντρωσής τους με τη δοκιμασία Bradford. Ακολούθως, 20 µg του κάθε δείγματος επωάζονται στο διάλυμα αντίδρασης (100 mM Hepes, pH 7,4) με το φθοροπεπτίδιο LLVY σε συγκέντρωση 50 µM για 30 λεπτά σε σκότος και σε θερμοκρασία 37 °C. Μετά την επώαση, είτε προστίθεται διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (30 mM CH₃COONa, 70 mM CH₃COOH, 100 mM ClCH₂COONa, pH 4,3) και πραγματοποιείται μέτρηση του φθορισμού στο φθορισμόμετρο VersaFluorTM Fluorometer System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) με φίλτρο διέγερσης (Excitation) στα 360 nm και φίλτρο εκπομπής (Emission) στα 440 nm, είτε μετράται κατευθείαν ο φθορισμός στο φασματοφωτόμετρο πλακών μικροτιτλοδότησης TECAN στα ίδια μήκη κύματος.

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

Για τη μέτρηση της ενεργότητας των καθεψινών, τα κύτταρα, αρχικά, θρυψινοποιούνται, καταμετρούνται και επιστρώνονται σε τρυβλία καλλιέργειας. Αφού ολοκληρωθεί η προσκόλλησή τους, επωάζονται με τον παράγοντα επίδρασης για το επιθυμητό χρονικό διάστημα. Με το πέρας της επώασης, γίνεται θρυψινοποίηση, φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 1.500 rpm σε θερμοκρασία δωματίου, επαναδιάλυση σε PBS και ξανά φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος λύσης (1 mM dithiothreitol, 50 mM Tris-HCl, pH 4,0) και ακολουθεί η επανάληψη μιας σειράς βημάτων δύο φορές. Τα βήματα αυτά περιλαμβάνουν την παραμονή του λύματος στον πάγο για 10 λεπτά, την ανάδυσή του και την εμβάπτισή του στο υγρό άζωτο. Αφού ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία, γίνεται φυγοκέντρωση για 15 λεπτά σε 13.300 rpm στους 4 °C.

Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο συλλέγεται και γίνεται προσδιορισμός της συγκέντρωσής του σε πρωτεΐνες με τη δοκιμασία Bradford. Στη συνέχεια, 20 µg πρωτεΐνης του κάθε δείγματος επωάζονται με το διάλυμα αντίδρασης για τη μέτρηση της ενεργότητας των λυσοσωμικών καθεψινών B και L (50 mM CH₃COONa, 8 mM L-Cysteine Hydrochloride, 1 mM EDTA, pH 4,0) και με το φθοροπεπτίδιο Z-Phe-Arg-AMC (Z-FR-AMC) (Enzo Life Sciences, Inc.) για 30 λεπτά σε σκότος και στους 37 °C. Μετά την επώαση, πραγματοποιείται μέτρηση του φθορισμού στο φθορισμόμετρο VersaFluor™ Fluorometer System με φίλτρο διέγερσης στα 360 nm και φίλτρο εκπομπής στα 440 nm ή στο φασματοφωτόμετρο πλακών μικροτιτλοδότησης TECAN στα ίδια μήκη κύματος.

2.2.6. Μέτρηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου

Για τη μέτρηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου, τα κύτταρα που είχαν επιστρωθεί σε τρυβλία καλλιέργειας, αφού θρυψινοποιηθούν, εκπλυθούν με PBS και φυγοκεντρηθούν (1.500 rpm, 5 min), ακολούθως επωάζονται με τον ειδικό ιχνηθέτη CM-H₂DCFDA (Thermo Fisher Scientific), ο οποίος φθορίζει παρουσία ROS σε συγκέντρωση 10 µM σε PBS σε σκότος (30 min, 37 °C).

Μετά την επώαση, ο ιχνηθέτης απομακρύνεται, προστίθεται PBS και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε σκότος στους 37 °C. Στη συνέχεια, γίνεται δύο φορές έκπλυση με PBS και προσθήκη του διαλύματος λύσης [150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP-40, 50 mM Tris pH 8,0]. Ακολουθεί φυγοκέντρωση (13.300 rpm, 15 min, 4 °C), συλλογή του υπερκειμένου και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford. Τέλος, καταγράφεται ο εκπεμπόμενος φθορισμός με τη χρήση φίλτρων με κύματος διέγερσης 490 nm και μήκος κύματος εκπομπής 520 nm σε φθορισμόμετρο (VersaFluor™ Fluorometer System) ή στο

φασματοφωτόμετρο πλακών μικροτιτλοδότησης TECAN. Η κανονικοποίηση πραγματοποιείται ως προς τη συγκέντρωση ολικών πρωτεϊνών.

2.2.7 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης

2.2.7.1. Απομόνωση ολικού RNA

Αρχικά, τα κύτταρα της εκάστοτε κυτταρικής σειράς θρυψινοποιούνται και επιστρώνονται σε τρυβλία καλλιέργειας διαμέτρου 100 mm. Μετά την προσκόλλησή τους, γίνεται επώαση με τον υπό μελέτη παράγοντα επίδρασης. Μετά την επώαση, γίνεται αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού, έκπλυση με PBS και προσθήκη 1 ml του αντιδραστηρίου NucleoZOL. Στη συνέχεια, τα κύτταρα, που είναι διαλυμένα στο παραπάνω αντιδραστήριο, συλλέγονται και μεταφέρονται σε σωληνάρια τύπου eppendorf. Για κάθε 500 μl NucleoZOL, που χρησιμοποιείται, προστίθενται 200 μl dH₂O ελεύθερου νουκλεασών, γίνεται ανάμειξη για 15 δευτερόλεπτα και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 12.000 g σε θερμοκρασία δωματίου από την οποία προκύπτουν δύο φάσεις, μία στο κάτω μέρος που περιέχει DNA, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες και μία στο επάνω μέρος που περιέχει το RNA. Με προσοχή, μεταφέρονται 500 μl της ανώτερης φάσης σε καινούριο σωληνάριο τύπου eppendorf και προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης, προκειμένου να γίνει κατακρήμνιση του RNA. Ακολουθεί παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 12.000 g στους 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρηση, απορρίπτεται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθενται 500 μl αιθανόλης 75 % (v/v), γίνεται ελαφριά ανακίνηση και ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε 8.000 g στους 4 °C, προκειμένου να γίνει καθαρισμός του RNA. Τέλος, απομακρύνεται το υπερκείμενο και, αφού εξαμεινιστεί καλά η αιθανόλη, το ίζημα επαναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα dH₂O ελεύθερου νουκλεασών και πραγματοποιείται μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA. Η διαδικασία αυτή γίνεται με τη χρήση φασματοφωτομέτρου (BioSpec-nano spectrophotometer, Shimadzu Inc.) με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 260 και 280 nm.

2.2.7.2. Σύνθεση cDNA

Για τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit FastGene Scriptase II cDNA (Nippon Genetics) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, για μια αντίδραση σύνθεσης αναμειγνύονται σε φιαλίδιο των 0,2 ml 2 ml του μίγματος αντίδρασης 5x, όγκος RNA που αντιστοιχεί σε 1 μg RNA και dH₂O ελεύθερου νουκλεασών σε τελικό όγκο 10 μl. Τα βήματα της σύνθεσης περιλαμβάνουν την επιμήκυνση των εκκινητών για 10 λεπτά στους 25 °C, τον πολυμερισμό του DNA για 15 λεπτά στους 42 °C και την απενεργοποίηση

του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση για 5 λεπτά στους 85 °C και πραγματοποιούνται σε θερμικό κυκλοποιητή (Minicycler PTC-150, MJ Research). Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης σύνθεσης, το cDNA αραιώνεται με dH₂O ελεύθερου νουκλεασών σε κατάλληλη αναλογία και φυλάσσεται στους -20 °C.

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

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης χρησιμοποιήθηκε η Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction, Q-RT-PCR), μέσω της οποίας επιτυγχάνεται λογαριθμική ενίσχυση και ποσοτικοποίηση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Συγκεκριμένα, στην Q-RT-PCR η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος μετράται μετά την ολοκλήρωση κάθε κύκλου της αντίδρασης μέσω της καταγραφής της αύξησης του φθορισμού της χρησιμοποιούμενης φθορίζουσας χρωστικής, η οποία είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος της αντίδρασης. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό κιτ 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis BioDyne) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, για μια αντίδραση PCR τελικού όγκου 10 μl αναμειγνύονται 2 μl μίγματος αντίδρασης 5x, όγκος πρόσθιου (Forward) και ανάστροφου (Reverse) εκκινητή με τελική συγκέντρωση 300 nM έκαστος, 1 μl cDNA και dH₂O ελεύθερο νουκλεασών. Η αντίδραση Q-RT-PCR πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα PikoReal™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) και το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει την αρχική ενεργοποίηση (Initial activation) της πολυμεράσης στους 95 °C για 7 λεπτά, ακολουθούμενη από την αποδιάταξη (Denaturation) του DNA στους 95 °C για 15 λεπτά, την υβριδοποίηση (Annealing) των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στους 60 °C για 30 δευτερόλεπτα, την επιμήκυνση (Elongation) των κλώνων στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα και τη λήξη της αντίδρασης στους 20 °C για 10 δευτερόλεπτα. Τα στάδια της αποδιάταξης, της υβριδοποίησης και της επιμήκυνσης πραγματοποιούνται σε 40 κύκλους.

2.2.8. Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης με ανοσοαποτύπωμα Western

Το ανοσοαποτύπωμα Western (Western blot) είναι μια ποιοτική και ημιποσοτική μέθοδος, με την οποία μπορούν να ανιχνευθούν οι υπό μελέτη πρωτεΐνες. Αρχικά, οι πρωτεΐνες του δείγματος διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους με ηλεκτροφόρηση και στη συνέχεια μεταφέρονται σε ειδική μεμβράνη. Η μεμβράνη επωάζεται με ειδικά αντισώματα για τις υπό μελέτη πρωτεΐνες και έτσι επιτυγχάνεται η ανίχνευσή τους. Χρησιμοποιούνται δύο τύπων αντισώματα, το πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό για την υπό μελέτη

πρωτεΐνη και προσδένεται σε αυτή, και το δευτερογενές αντίσωμα. Το τελευταίο είναι ειδικό για το είδος του ξενιστή του πρωτογενούς αντισώματος, οπότε αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρωτογενές αντίσωμα, και είναι επίσης συζευγμένο με έναν ιχνηθέτη. Ο ιχνηθέτης αντιδρά με ειδικό υπόστρωμα και έχει ως αποτέλεσμα την ανίχνευση της πρωτεΐνης με χρώση, ραδιενέργεια ή χημειοφωταύγεια.

2.2.8.1. Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης κυττάρων

Το πρώτο βήμα για τη διεξαγωγή του ανοσοαποτυπώματος Western είναι η απομόνωση του συνόλου των πρωτεϊνών από τα κύτταρα. Τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία καλλιέργειας και την επόμενη μέρα επωάζονται με τον παράγοντα επίδρασης. Μετά την επώαση, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται, φυγοκεντρούνται (1.500 rpm, 5 min) και το ίζημα τους επαναιωρείται σε 1 ml PBS. Ακολούθως, γίνεται εκ νέου φυγοκέντρηση και στο ίζημα των κυττάρων προστίθεται το διάλυμα λύσης [150 mM NaCl, 1 % (v/v) NP-40, 50 mM Tris pH 8,0], στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών. Για να επιτευχθεί καλύτερη λύση, τα κύτταρα αφήνονται για 30 min στους 4 °C υπό συνεχή ανάδευση και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται (13.300 rpm, 15 min, 4 °C). 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 φύλαξη του στους -80 °C.

2.2.8.2. Προετοιμασία των δειγμάτων και αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση

Το επόμενο βήμα του ανοσοαποτυπώματος Western είναι ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με SDS-ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE). Η βασική αρχή της ηλεκτροφόρησης στηρίζεται στο γεγονός ότι φορτισμένα μόρια, όπως οι πρωτεΐνες, μπορούν να διαχωριστούν με βάση το μέγεθός τους, εάν αναγκαστούν να κινηθούν διαμέσου ενός πηκτώματος λόγω ηλεκτρικού πεδίου.

Αρχικά, οι πρωτεΐνες, που απομονώθηκαν στο προηγούμενο βήμα, αναμειγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος Laemmli (2x) [125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) γλυκερόλη, 10 % (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,02 % (w/v) κυανούν της βρωμοφαινόλης]. Με αυτό το διάλυμα, οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται, λόγω του απορρυπαντικού SDS και της β-μερκαπτοαιθανόλης, η οποία ανάγει δισουλφιδικούς δεσμούς, και αποκτούν αρνητικό φορτίο λόγω του SDS. Συνεπώς, μόλις οι πρωτεΐνες «φορτωθούν» στο πήκτωμα και βρεθούν εντός του ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται διαμέσου του πηκτώματος από τον αρνητικό προς τον

θετικό πόλο. Ένας επιπλέον παράγοντας που προκαλεί περαιτέρω αποδιάταξη των πρωτεϊνών είναι η θέρμανση στους 95 °C για 5 λεπτά.

Αφού παρασκευαστούν τα πηκτώματα επιστοίβαξης [126 mM Tris-HCl pH 6,8, 5 % (w/v) πολυακρυλαμιδίου, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED] και διαχωρισμού [375 mM Tris-HCl pH 8,8, 6-15 % (w/v) πολυακρυλαμιδίου (ανάλογα με το μοριακό βάρος της υπό ανίχνευση πρωτεΐνης), 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,04 % (v/v) TEMED)], τα δείγματα τοποθετούνται σε εσοχές/πηγαδάκια του πηκτώματος επιστοίβαξης, έτσι ώστε σε κάθε πηγαδάκι να υπάρχουν 30 µg πρωτεΐνης. Επίσης, σε μία 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 πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή σε μεμβράνη PVDF. Η μεταφορά αυτή γίνεται με χρήση ειδικής συσκευής παρουσία διαλύματος μεταφοράς Transfer Buffer [25 mM Tris-HCl, 192 mM γλυκίνη, 15 % (v/v) μεθανόλη]. Η μεταφορά γίνεται με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου, το οποίο αναγκάζει τις αρνητικά λόγω του SDS φορτισμένες πρωτεΐνες να κινηθούν από το πήκτωμα, το οποίο είναι προσανατολισμένο στον αρνητικό πόλο, προς τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που βρίσκεται σε επαφή με αυτό με προσανατολισμό προς τον θετικό πόλο.

2.2.8.4 Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών

Αφού γίνει η μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, το επόμενο βήμα είναι ο ανοσοεντοπισμός των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Αρχικά, η μεμβράνη επώάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση με διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων, το οποίο αποτελείται από 5 % (w/v) άπαχο γάλα σε TBS-T (Tris-Buffered Saline, Tween-20) [20 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20]. Ακολουθεί επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου σε 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, πραγματοποιείται επώαση της μεμβράνης με δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση

του ραπανιού και ακολουθούν άλλες τρεις εκπλύσεις με διάλυμα TBS-T όπως και προηγουμένως.

Σε επόμενο βήμα της διαδικασίας, λαμβάνει χώρα η ανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών με τα αντιδραστήρια του kit Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc.), τα οποία προστίθενται σε αναλογία 1:1 στην επιφάνεια της μεμβράνης για 5 min. Η μεμβράνη στεγνώνεται ελαφρώς από το ECL και τοποθετείται σε ειδική κασετίνα καλυμμένη με μία λεπτή διάφανη μεμβράνη. Τέλος, γίνεται άμεση έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ ακτίνων X σε σκοτεινό θάλαμο, το οποίο κατόπιν μεταφέρεται σε διάλυμα εμφάνισης (Developer), ξεπλένεται με H₂O βρύσης και μονιμοποιείται σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer).

Η ποσοτικοποίηση των ζωνών εντόπισης των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με το πρόγραμμα ImageJ (National Institutes of Health, USA).

2.2.8.5. Αποδέσμευση των αντισωμάτων από τη μεμβράνη

Για τη διαδικασία της απομάκρυνσης των αντισωμάτων, αρχικά, πραγματοποιείται έκπλυση της μεμβράνης με TBS-T και στη συνέχεια γίνεται επώαση με διάλυμα απομάκρυνσης αντισωμάτων [62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 0,7 % (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη]. Η επώαση γίνεται στους 56 °C για 30 λεπτά. Με το πέρας της επώασης, γίνονται τρεις εκπλύσεις των 10 λεπτών με TBS-T, έτσι ώστε να απομακρυνθούν το SDS και η β-μερκαπτοαιθανόλη του διαλύματος απομάκρυνσης των αντισωμάτων. Έπειτα, μπορεί να πραγματοποιηθεί νέα διαδικασία ανοσοεντοπισμού ξεκινώντας από το στάδιο της επώασης με το διάλυμα κάλυψης των μη ειδικών θέσεων για 1 h.

2.2.9 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα λογιστικών φύλλων Microsoft Excel. Τα γραφήματα προκύπτουν από μέσους όρους δύο τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων και οι μπάρες σφάλματος υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση (standard deviation, SD). Η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων εκτιμάται μέσω Student's t-test και παρουσιάζεται στα γραφήματα με έναν ή δύο αστερίσκους όταν $P < 0,05$ ή $P < 0,01$, αντίστοιχα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

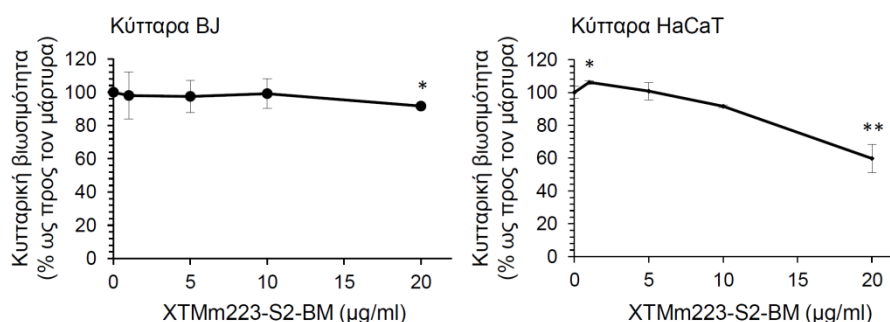
3. Αποτελέσματα

3.1. Μελέτη του εκχυλίσματος XTMm223-S2-BM

Σε συνέχεια μίας εκτενούς μελέτης που αφορά στη σάρωση υψηλής απόδοσης (high-throughput screening) φυσικών προϊόντων με σκοπό την ανίχνευση βιοδραστικών μορίων έναντι της κυτταρικής γήρανσης, το εκχύλισμα XTMm223-S2-BM βρέθηκε να κατέχει σημαντικές ιδιότητες έναντι της γήρανσης [αναστολή των ενζύμων ελαστάσης και τυροσινάσης και ενεργοποίηση του πρωτεασώματος σε *in vitro* πειράματα (αδημοσίευτα αποτελέσματά μας)] και γι' αυτό επελέγη να εξεταστεί περαιτέρω σε ανθρώπινες καλλιέργειες κυττάρων. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η επίδραση του εκχυλίσματος στη βιωσιμότητα των κυττάρων, το δίκτυο πρωτεόστασης, καθώς επίσης και η πιθανή αντιοξειδωτική του δράση.

3.1.1. Το εκχύλισμα XTMm223-S2-BM δεν προκαλεί κυτταροτοξικότητα, προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες και μειώνει το οξειδωτικό φορτίο

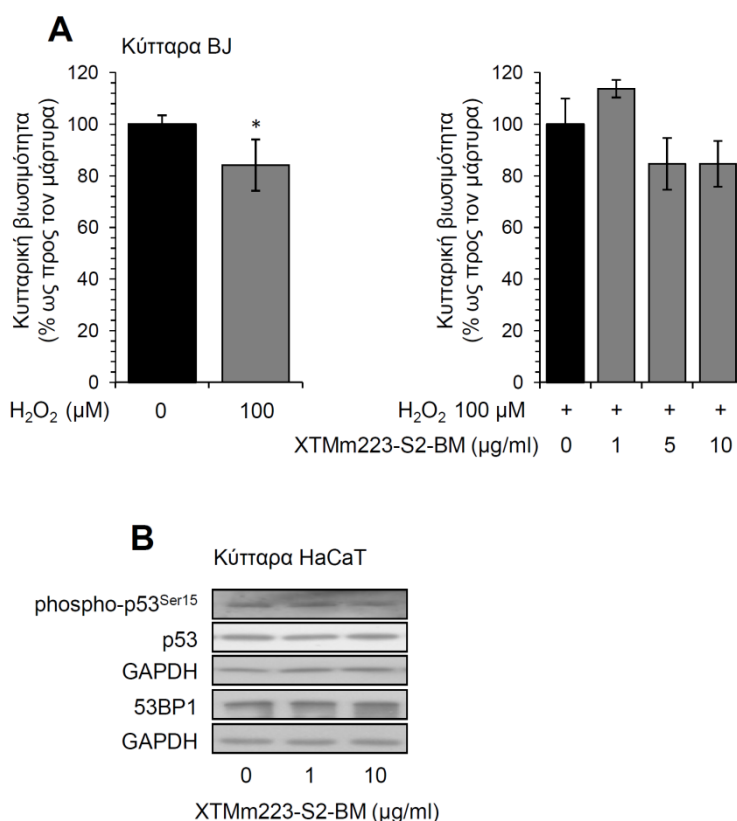
Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος XTMm223-S2-BM στη βιωσιμότητα των ανθρώπινων φυσιολογικών δερματικών ινοβλαστών BJ και των ανθρώπινων αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων HaCaT (δοκιμασία MTT). Για τον σκοπό αυτό, τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.1, και στις δύο κυτταρικές σειρές το εκχύλισμα σε συγκεντρώσεις μέχρι 10 $\mu\text{g/ml}$ δεν παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (πάνω από 10 $\mu\text{g/ml}$) παρατηρείται μείωση της βιωσιμότητας και στις δύο υπό μελέτη κυτταρικές σειρές.



Εικόνα 3.1 Το εκχύλισμα XTMm223-S2-BM δεν παρουσιάζει τοξικότητα σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες και σε ανθρώπινα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα. Σχετικά (%) επίπεδα βιωσιμότητας (δοκιμασία MTT) των ανθρώπινων φυσιολογικών ινοβλαστών δέρματος (BJ)

και των ανθρώπινων αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων (HaCaT) έπειτα από επώαση με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του XTm223-S2-BM για 24 ώρες. Οι τιμές 100% αφορούν στα κύτταρα-μάρτυρες. Μάρκες σφάλματος: $\pm$ SD, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

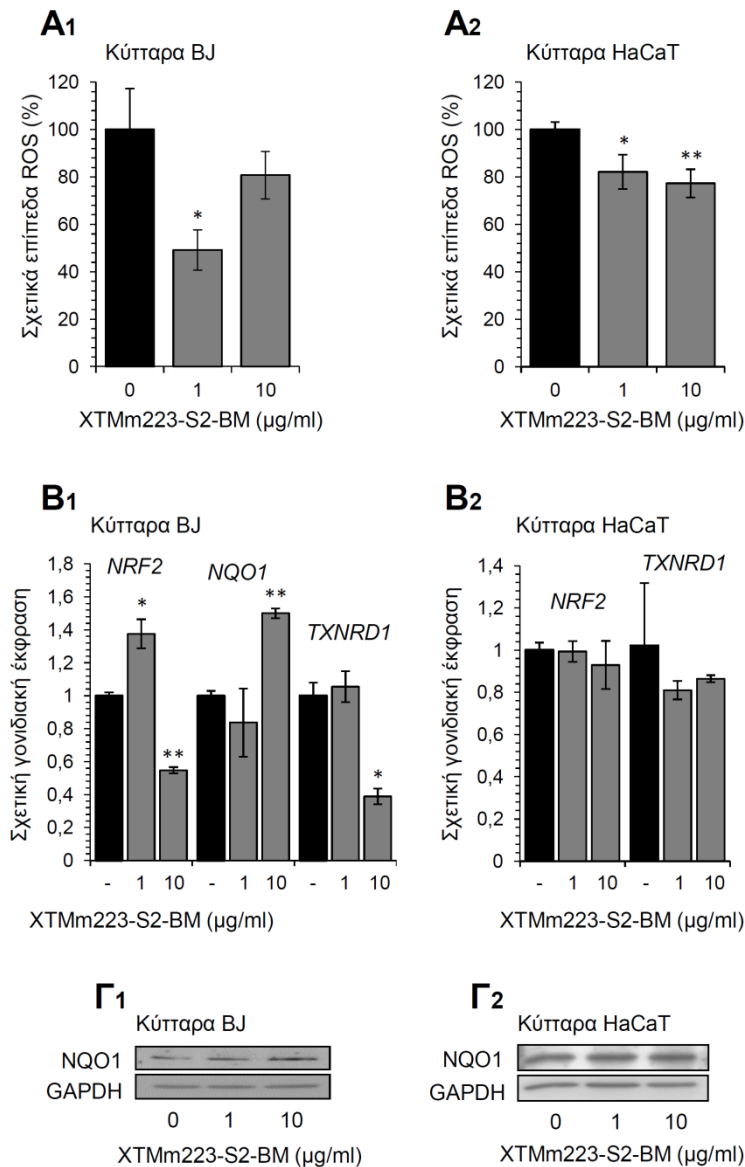
Στη συνέχεια, εξετάστηκε εάν το εκχύλισμα XTm223-S2-BM έχει προστατευτική δράση για τα κύτταρα έναντι του οξειδωτικού στρες. Για τον λόγο αυτό, οι ινοβλάστες BJ επώαστηκαν ταυτόχρονα με διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα H_2O_2 (100 μ M) και μετά από 24 ώρες υπολογίστηκαν τα ποσοστά βιωσιμότητας. Όπως διαπιστώνεται στην Εικόνα 3.2Α, το εκχύλισμα σε συγκέντρωση 1 μ g/ml τείνει να προστατεύσει τα κύτταρα από την τοξικότητα που προκαλεί το H_2O_2 . Ωστόσο, δεν παρατηρείται κάτι αντίστοιχο σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος. Επιπλέον, η 24ωρη επώαση των κερατινοκυττάρων HaCaT με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος οδήγησε σε δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης 53BP1, καθώς και των επιπέδων φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης p53 στο κατάλοιπο σερίνης 15 (Ser15). Η τροποποίηση αυτή αποτελεί βιοδείκτη βλαβών DNA και γενοτοξικού στρες. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης p53 (Εικ. 3.2Β).



Εικόνα 3.2 Το XTm223-S2-BM προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. (Α) Σχετική (%) βιωσιμότητα (δοκιμασία MTT) των ινοβλαστών BJ που επώαστηκαν για 24 ώρες ταυτόχρονα με

τον οξειδωτικό παράγοντα H_2O_2 σε συγκέντρωση 100 μM και τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του XTMm223-S2-BM. Οι τιμές 100% αφορούν στα κύτταρα-μάρτυρες. (B) Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα Western έναντι των πρωτεϊνών phospho-p53^{Ser15}, p53 και 53BP1 μετά από επώαση των ανθρώπινων αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων HaCaT με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του XTMm223-S2-BM. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD,* $P < 0,05$.

Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος XTMm223-S2-BM στην αντιοξειδωτική απόκριση του κυττάρου. Αρχικά, εξετάστηκε η επίδρασή του στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Τα κύτταρα επώαστηκαν με το εκχύλισμα για 24 ώρες και τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS υπολογίστηκαν με φθορισμομετρία. Διαπιστώθηκε ότι η επώαση των φυσιολογικών ινοβλαστών BJ με το εκχύλισμα σε συγκέντρωση 1 $\mu g/ml$ είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων ROS σε σημαντικό βαθμό, ενώ στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (10 $\mu g/ml$) παρατηρήθηκε μία τάση μείωσης των επιπέδων ROS αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό (Εικ. 3.3A₁). Σημαντική μείωση των επιπέδων ROS παρατηρήθηκε επίσης, και στα κερατινοκύτταρα HaCaT μετά από επώαση με τις συγκεντρώσεις 1 $\mu g/ml$ και 10 $\mu g/ml$ του εκχυλίσματος (Εικ. 3.3A₂). Σε συμφωνία με τις παραπάνω παρατηρήσεις, μετά από 24ωρη επώαση των φυσιολογικών ινοβλαστών BJ με το εκχύλισμα σε συγκέντρωση 1 $\mu g/ml$ διαπιστώθηκε η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου αντιοξειδωτικής απόκρισης *NRF2* (σε συγκέντρωση 1 $\mu g/ml$), και του γονιδίου-στόχου του, *NQO1* (σε συγκέντρωση 10 $\mu g/ml$) (Εικ. 3.3B₁). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αντιοξειδωτικής απόκρισης μετά από επώαση των κερατινοκυττάρων HaCaT με το υπό μελέτη εκχύλισμα (Εικ. 3.3B₂). Τέλος, μέσω ανοσοαποτύπωματος Western, μετά από επώαση με το εκχύλισμα, παρατηρήθηκε επαγωγή των επιπέδων έκφρασης της αντιοξειδωτικής πρωτεΐνης *NQO1* και στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικ. 3.3Γ₁ και 3.3Γ₂).

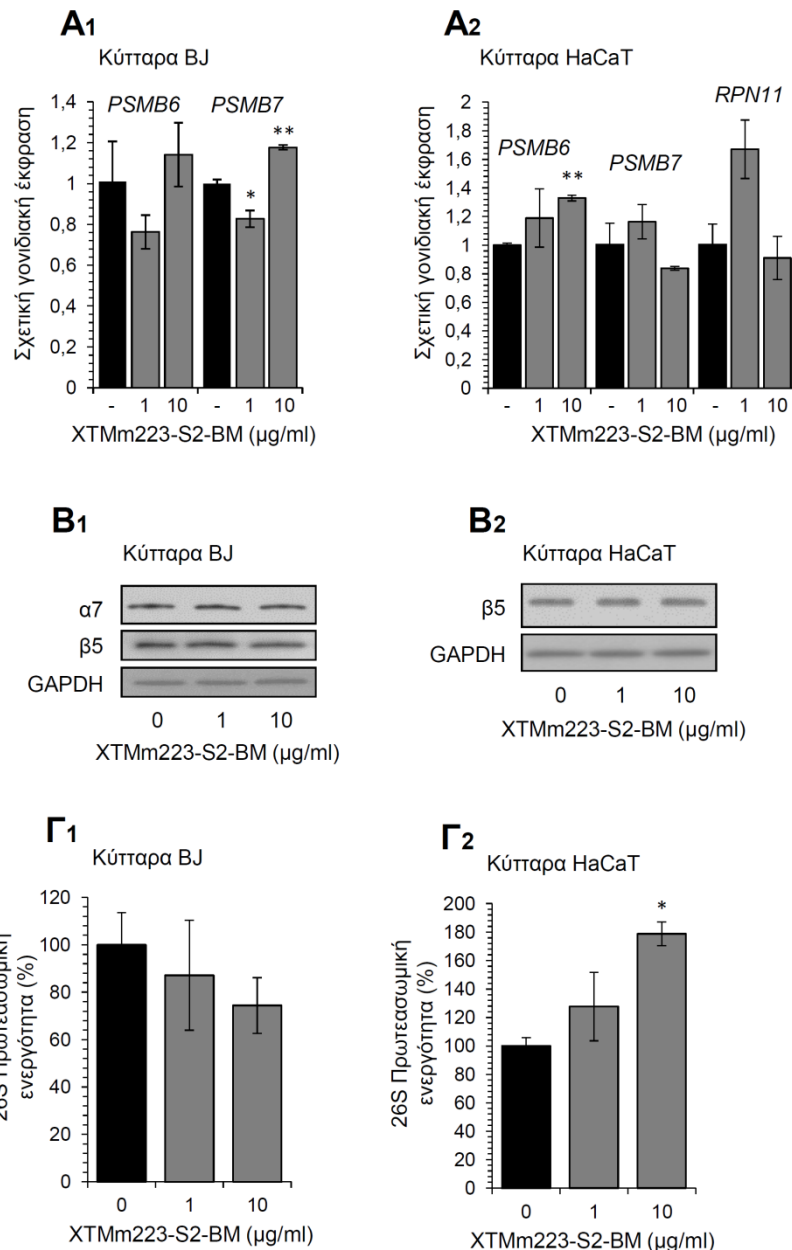


Εικόνα 3.3 Το XTmm223-S2-BM μειώνει το οξειδωτικό φορτίο και ενεργοποιεί τα στοιχεία της αντιοξειδωτικής απόκρισης. (A₁, A₂) Σχετικά (%) επίπεδα ROS μετά από επώαση των ανθρώπινων ινοβλαστών BJ και των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων HaCaT με το εκχύλισμα XTmm223-S2-BM σε συγκεντρώσεις 1 και 10 μg/ml για 24 ώρες. Οι (%) τιμές που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν τη μέτρηση των επιπέδων ROS μέσω φθορισμομετρίας. Οι τιμές 100% αφορούν στα κύτταρα-μάρτυρες. (B₁, B₂) Οι αναλύσεις των σχετικών επιπέδων της γονδιακής έκφρασης μέσω Q-RT-PCR αναφέρονται στα γονίδια του μονοπατιού αντιοξειδωτικής απόκρισης (*NRF2*, *NQO1*, *TXNRD1*). Το γονίδιο *HMBS* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του XTmm223-S2-BM. Οι τιμές που αφορούν στα κύτταρα-μάρτυρες ορίστηκαν στο 1. (Γ₁, Γ₂) Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα Western έναντι της αντιοξειδωτικής πρωτεΐνης NQO1 μετά από χορήγηση των αναγραφόμενων συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος XTmm223-S2-BM στα κύτταρα BJ και HaCaT για 24 ώρες. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς. Μπάρες σφάλματος: ± SD, * P<0,05, ** P<0,01.

3.1.2. Το εκχύλισμα XTMm223-S2-BM ενεργοποιεί τα στοιχεία του δικτύου πρωτεόστασης

Στη συνέχεια, μελετήσαμε την επίδραση του εκχυλίσματος XTMm223-S2-BM στο δίκτυο των σηματοδοτικών μονοπατιών πρωτεωμικής σταθερότητας του κυττάρου. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι η μικρής διάρκειας (24 h) έκθεση των ινοβλαστών BJ στο υπό μελέτη εκχύλισμα οδήγησε σε επαγωγή της έκφρασης του πρωτεασωμικού γονιδίου *PSMB7* (σε συγκέντρωση 10 µg/ml), και επιπλέον, παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης της έκφρασης του γονιδίου *PSMB6* στην ίδια συγκέντρωση (Εικ. 3.4A₁). Μετά από αντίστοιχη επώαση των κερατινοκυττάρων HaCaT, παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης του πρωτεασωμικού γονιδίου *PSMB6*, καθώς επίσης και μια τάση αύξησης της έκφρασης των γονιδίων *PSMB7* και *RPN11* (σε συγκέντρωση 1 µg/ml) (Εικ. 3.4A₂). Με ανοσοαποτύπωμα Western, μετά από επώαση των ινοβλαστών BJ με το εκχύλισμα διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεασωμικής υπομονάδας β5, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της υπομονάδας α7 (Εικ. 3.4B₁). Ομοίως, και στα κερατινοκύτταρα HaCaT παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεασωμικής υπομονάδας β5 (Εικ. 3.4B₂).

Ακολούθως, εξετάστηκε η επίδραση του εκχυλίσματος στην ενεργότητα του πρωτεασώματος. Για τον σκοπό αυτό, τα κύτταρα επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος για 24 ώρες και η πρωτεασωμική ενεργότητα εκτιμήθηκε με φθορισμομετρία. Στους φυσιολογικούς ινοβλάστες BJ δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στην κύρια ενεργότητα του πρωτεασώματος, δηλαδή της χυμοθρυψίνης (Εικ. 3.4Γ₁), ενώ αντίθετα στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα HaCaT παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας (Εικ. 3.4Γ₂).



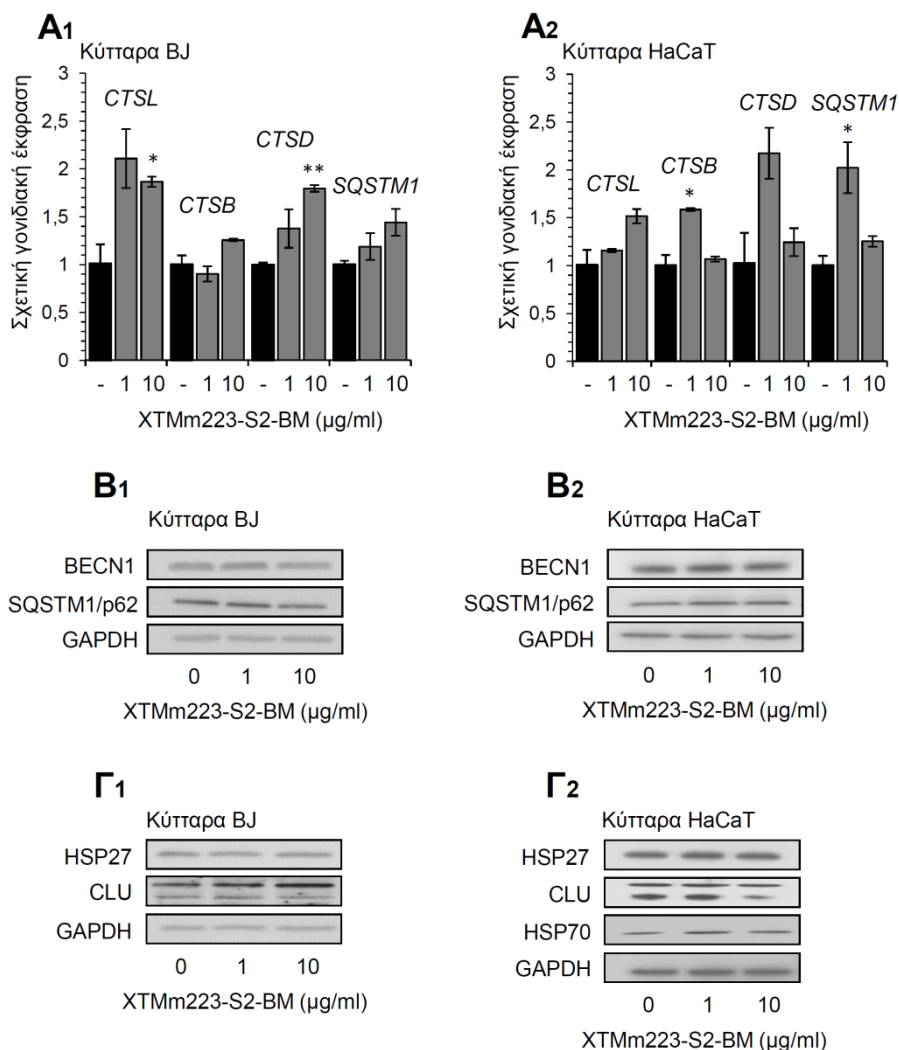
Εικόνα 3.4 Το XTmm223-S2-BM ενεργοποιεί το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. (A₁, A₂)

Οι αναλύσεις των σχετικών επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης με Q-RT-PCR αναφέρονται στα 20S (*PSMB6*, *PSMB7*) και 19S (*RPN11*) πρωτεασωμικά γονίδια. Το γονίδιο *HMBS* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 24 ώρες με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του XTmm223-S2-BM. Οι τιμές που αφορούν στα κύτταρα-μάρτυρες ορίστηκαν στο 1. (B₁, B₂) Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα Western έναντι των πρωτεασωμικών υπομονάδων α7 και β5 έπειτα από χορήγηση των αναγραφόμενων συγκεντρώσεων XTmm223-S2-BM σε ινοβλάστες BJ και κερατινοκύτταρα HaCaT για 24 ώρες. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς. (Γ₁, Γ₂) Σχετικά (%) επίπεδα της κύριας ενζυμικής πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (LLVY/β5) σε ινοβλάστες BJ και κερατινοκύτταρα HaCaT που επωάστηκαν για 24 ώρες με το

εκχύλισμα σε συγκεντρώσεις 1 $\mu\text{g/ml}$ και 10 $\mu\text{g/ml}$ XTMm223-S2-BM. Οι τιμές 100% αφορούν στα κύτταρα-μάρτυρες. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD, * $P<0,05$, ** $P<0,01$.

Η επώαση των ινοβλαστών BJ με το εκχύλισμα για 24 ώρες οδήγησε σε επαγωγή των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσοσώματος *CTSL* και *CTSD*, ενώ παρατηρήθηκε και μια τάση αύξησης της έκφρασης των γονιδίων *CTSB* και *SQSTM1* (Εικ. 3.5A₁). Σε αντίστοιχη επώαση των κερατινοκυττάρων HaCaT, διαπιστώθηκε επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *CTSB* και *SQSTM1*, και μια τάση αύξησης της έκφρασης των γονιδίων *CTSL* και *CTSD* (Εικ. 3.5A₂). Σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα, στα κύτταρα BJ παρατηρήθηκε επαγωγή των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών BECN1 και SQSTM1/p62 στη συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$ του εκχυλίσματος (Εικ. 3.5B₁), ενώ στα κύτταρα HaCaT παρατηρήθηκε επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης BECN1 στη συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/ml}$ και της πρωτεΐνης SQSTM1/p62 και στις δύο υπό μελέτη συγκεντρώσεις (Εικ. 3.5B₂).

Επιπρόσθετα, η επώαση των φυσιολογικών ινοβλαστών BJ με το εκχύλισμα για 24 ώρες, οδήγησε σε μικρή επαγωγή των επιπέδων έκφρασης των μοριακών συνοδών HSP27 και CLU (Εικ. 3.5Γ₁). Αντίστοιχη επώαση των κερατινοκυττάρων HaCaT αύξησε τα επίπεδα έκφρασης των μοριακών συνοδών HSP27 και HSP70, ενώ παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης της μοριακής συνοδού CLU (Εικ. 3.5Γ₂).



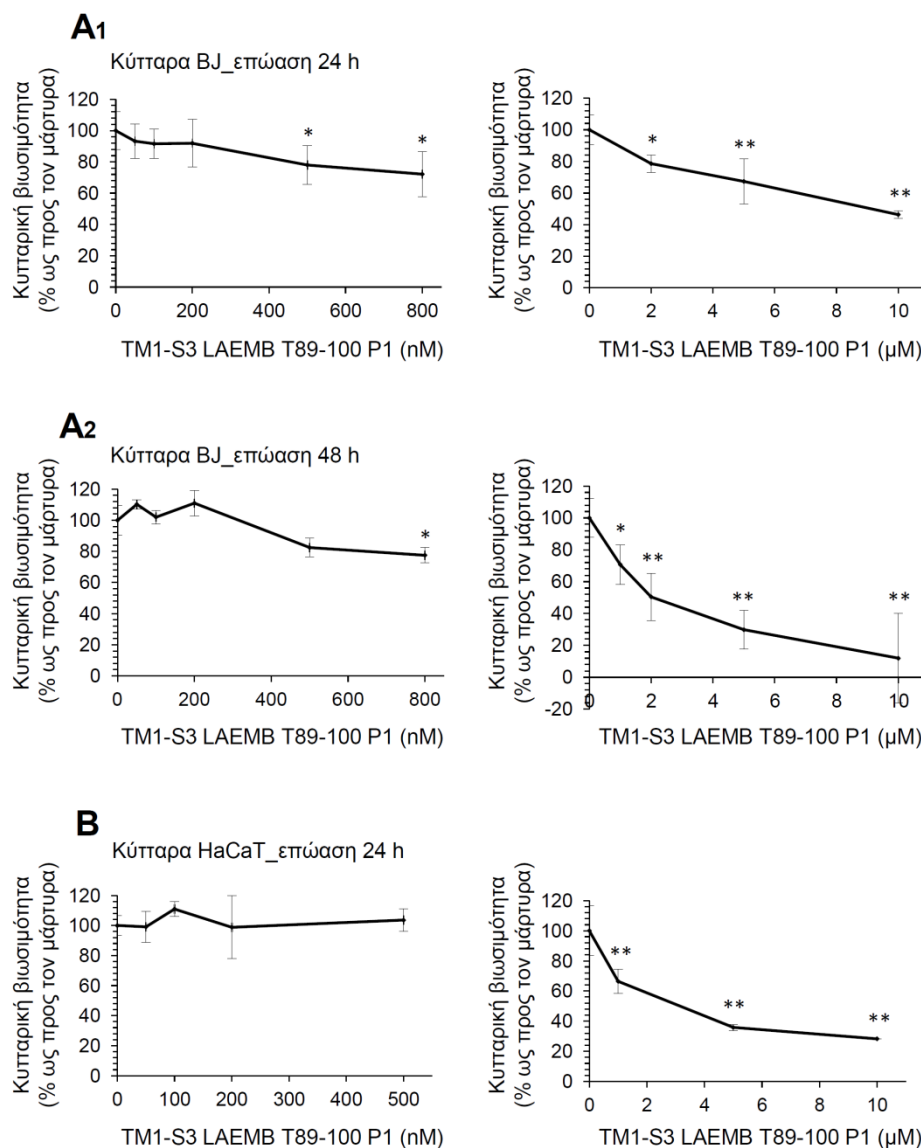
Εικόνα 3.5 Το XTMm223-S2-BM ενεργοποιεί το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος και αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης μοριακών συνοδών. (A₁, A₂) Οι αναλύσεις των σχετικών επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης με Q-RT-PCR αναφέρονται στα γονίδια του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος (*CTSL*, *CTSB*, *CTSD*, *SQSTM1*). Το γονίδιο *HMBS* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος XTMm223-S2-BM. Οι τιμές που αφορούν στα κύτταρα-μάρτυρες ορίστηκαν στο 1. (B₁, B₂) Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα Western έναντι των αυτοφαγικών πρωτεϊνών BECN1 και SQSTM1 έπειτα από χορήγηση του εκχυλίσματος XTMm223-S2-BM στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις στα κύτταρα BJ και HaCaT για 24 ώρες. (Γ₁, Γ₂) Αντιπροσωπευτικό ανοσοαποτύπωμα Western έναντι των μοριακών συνοδών HSP27, HSP70 και CLU μετά από χορήγηση του εκχυλίσματος XTMm223-S2-BM στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις στα κύτταρα BJ και HaCaT για 24 ώρες. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς Μπάρες σφάλματος: ± SD,* P<0,05, ** P<0,01.

3.2. Μελέτη του μορίου TM1-S3 LAEMB T89-100 P1

Όπως προαναφέρθηκε, στα πλαίσια σάρωσης φυσικών προϊόντων, επελέγη να εξεταστεί περαιτέρω το μόριο TMI-S3 LAEMB T89-100 P1, το οποίο έχει βρεθεί ότι προσδένεται στις κινάσες AuroraA, FynB και RET με σταθερά συγγένειας της τάξης των nM, καθώς επίσης και στις κινάσες WEE1 και KIT με σταθερά συγγένειας της τάξης των μM (αδημοσίευτα αποτελέσματά μας).

3.2.1. Διαφορική ευαισθησία των υπό μελέτη κυτταρικών σειρών στο μόριο TM1-S3 LAEMB T89-100 P1

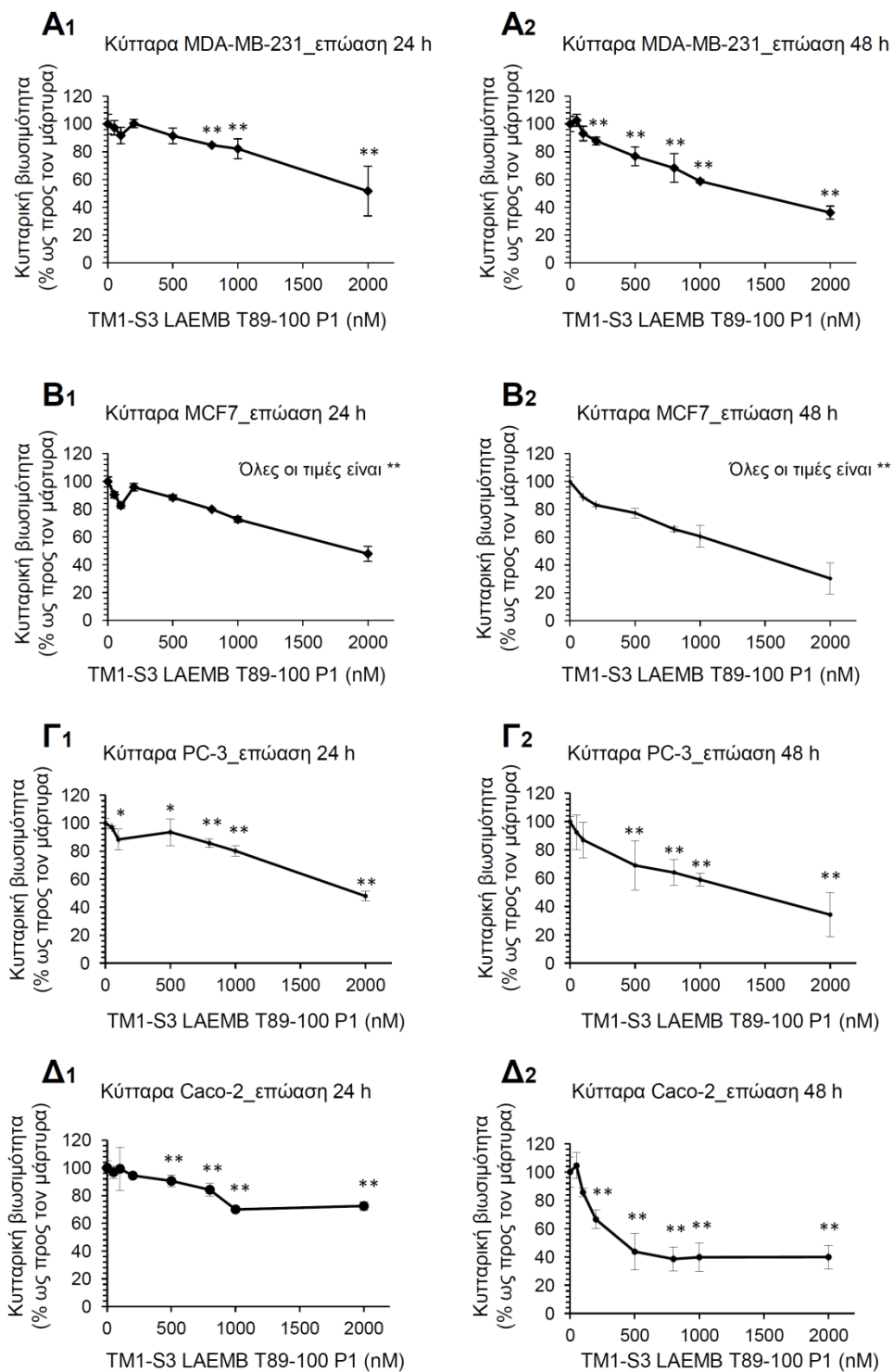
Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του μορίου TM1-S3 LAEMB T89-100 P1 στη βιωσιμότητα των ανθρώπινων φυσιολογικών δερματικών ινοβλαστών BJ (δοκιμασία MTT). Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 και 48 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του μορίου. Όπως φαίνεται και στην Εικ. 3.6A₁, στην 24ωρη επώαση διαπιστώθηκε ότι σε συγκεντρώσεις μέχρι τα 500 nM, το μόριο δεν έχει κυτταροτοξική δράση. Ωστόσο, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (μέχρι 10 μM), η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται σε σημαντικό βαθμό. Ομοίως, μετά από επώαση 48 ωρών, παρατηρήθηκε μείωση της βιωσιμότητας των ινοβλαστών σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 500 nM (Εικ. 3.6A₂). Σχετικά με την επίδραση του μορίου σε ανθρώπινα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT, διαπιστώθηκε ότι σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 1 μM δεν προκαλεί κυτταροτοξικότητα, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η κυτταροτοξική δράση του είναι σημαντική (επώαση 24 ωρών) (Εικ. 3.6B).



Εικόνα 3.6 Επίδραση του μορίου TM1-S3 LAEMB T89-100 P1 στη βιωσιμότητα ανθρώπινων φυσιολογικών ινοβλαστών δέρματος και ανθρώπινων αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων. (A₁,A₂) Σχετικά (%) επίπεδα βιωσιμότητας (δοκιμασία MTT) των ανθρώπινων φυσιολογικών ινοβλαστών δέρματος (BJ) έπειτα από επώαση με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του μορίου TM1-S3 LAEMB T89-100 P1 για 24 (A₁) και 48 (A₂) ώρες. (B) Σχετικά (%) επίπεδα βιωσιμότητας των ανθρώπινων αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων (HaCaT) έπειτα από επώαση με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του μορίου TM1-S3 LAEMB T89-100 P1 για 24 ώρες. Οι τιμές 100% αφορούν στα κύτταρα-μάρτυρες. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD,* P<0,05, ** P<0,01.

Στη συνέχεια, εξετάσαμε την επίδραση του μορίου TM1-S3 LAEMB T89-100 P1 στη βιωσιμότητα κυττάρων που ανήκουν σε διάφορες καρκινικές σειρές, στις οποίες έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζονται μόρια-στόχοι του μορίου, όπως οι κινάσες AuroraA (Shu et al. 2010; Xu et al. 2013), FynB (Posadas et al. 2010) και RET (Griseri et al. 2016). Τα κύτταρα

επώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του μορίου για 24 και 48 ώρες. Στην καρκινική σειρά MDA-MB-231, η οποία προέρχεται από καρκίνωμα μαστού, παρατηρήθηκε ότι, μετά από 24 ώρες επώαση, η βιωσιμότητα των κυττάρων άρχισε να μειώνεται σε σημαντικό βαθμό από τη συγκέντρωση των 800 nM (Εικ. 3.7A₁). Αντίστοιχα, μετά από επώαση 48 ωρών, η κυτταροτοξική δράση του μορίου διαπιστώνεται από τη συγκέντρωση των 200 nM (Εικ. 3.7A₂). Με αντίστοιχη μελέτη, στα κύτταρα της καρκινικής σειράς του μαστού MCF7, τόσο μετά από 24 όσο και μετά από 48 ώρες επώαση διαπιστώθηκε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων ήδη από τη συγκέντρωση των 50 nM (Εικ. 3.7B₁ και 3.7B₂). Επίσης, στην κυτταρική σειρά καρκίνου του προστάτη PC-3 μετά από επώαση 24 ωρών, παρατηρήθηκε τοξικότητα του μορίου από τη συγκέντρωση των 100 nM (Εικ. 3.7Γ₁), ενώ μετά από 48 ώρες επώαση, η βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσιάζει τάση μείωσης ήδη από τη συγκέντρωση των 50 nM (Εικ. 3.7Γ₂). Τέλος, στα κύτταρα της καρκινικής σειράς του παχέος εντέρου CaCo-2, διαπιστώθηκε ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων αρχίζει να μειώνεται από τη συγκέντρωση των 500 nM μετά από επώαση 24 ωρών (Εικ. 3.7Δ₁), ενώ μετά από επώαση 48 ωρών, η κυτταροτοξικότητα του μορίου γίνεται διακριτή από τη συγκέντρωση των 200 nM (Εικ. 3.7Δ₂).



Εικόνα 3.7 Διαφορική ευαισθησία διάφορων καρκινικών κυτταρικών σειρών στο μόριο TM1-S3 LAEMB T89-100 P1. (A₁, A₂) Σχετικά (%) επίπεδα βιωσιμότητας (δοκιμασία MTT) της κυτταρικής σειράς αδενοκαρκινώματος μαστού MDA-MB-231 έπειτα από επώαση με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του μορίου TM1-S3 LAEMB T89-100 P1 για 24 (A₁) και 48 ώρες (A₂). (B₁, B₂) Σχετικά (%) επίπεδα βιωσιμότητας της κυτταρικής σειράς αδενοκαρκινώματος μαστού MCF7 έπειτα από επώαση με το μόριο TM1-S3 LAEMB T89-100 P1 για 24 (B₁) και 48 ώρες (B₂). (Γ₁, Γ₂) Σχετικά

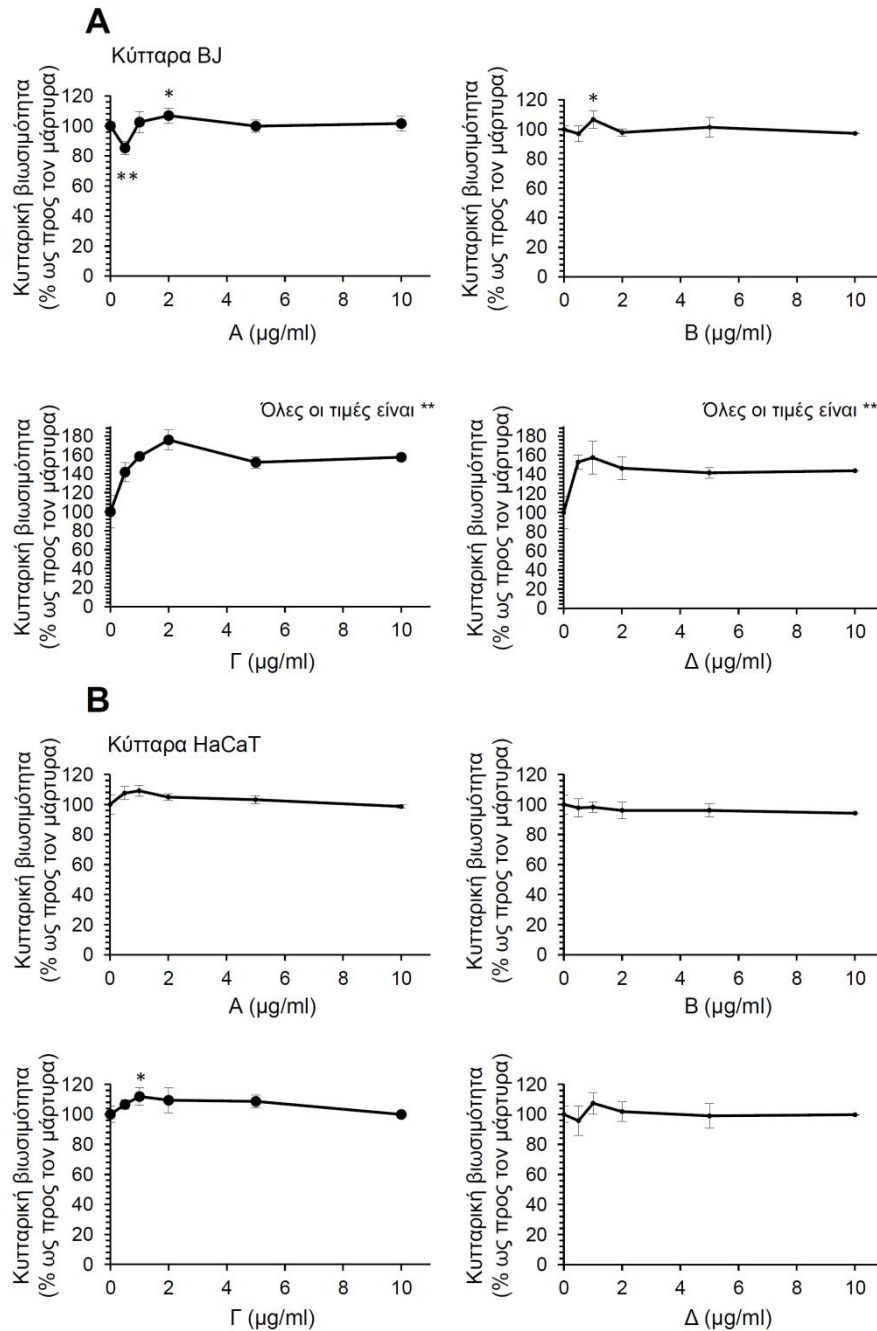
(%) επίπεδα βιωσιμότητας της κυτταρικής σειράς του προστάτη PC-3 μετά από επώαση με το μόριο TM1-S3 LAEMB T89-100 P1 για 24 (Γ_1) και 48 (Γ_2) ώρες. (Δ_1 , Δ_2) Σχετικά (%) επίπεδα βιωσιμότητας της κυτταρικής σειράς του παχέος εντέρου Caco-2 έπειτα από επώαση με το μόριο για 24 (Δ_1) και 48 (Δ_2) ώρες. Οι τιμές 100% αφορούν στα κύτταρα-μάρτυρες. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD,* $P<0,05$, ** $P<0,01$.

3.3. Μελέτη εκχυλισμάτων από το φυτό *Cichorium intybus*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα εκχυλίσματα Α, Β, Γ και Δ έχουν απομονωθεί από το φυτό *Cichorium intybus* με διαφορετικό τρόπο εκχύλισης το καθένα. Στα εκχυλίσματα αυτά εξετάστηκε η επίδρασή τους στη βιωσιμότητα των κυττάρων, τα ενδοκυτταρικά επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου καθώς και στα μονοπάτια του δικτύου πρωτεόστασης.

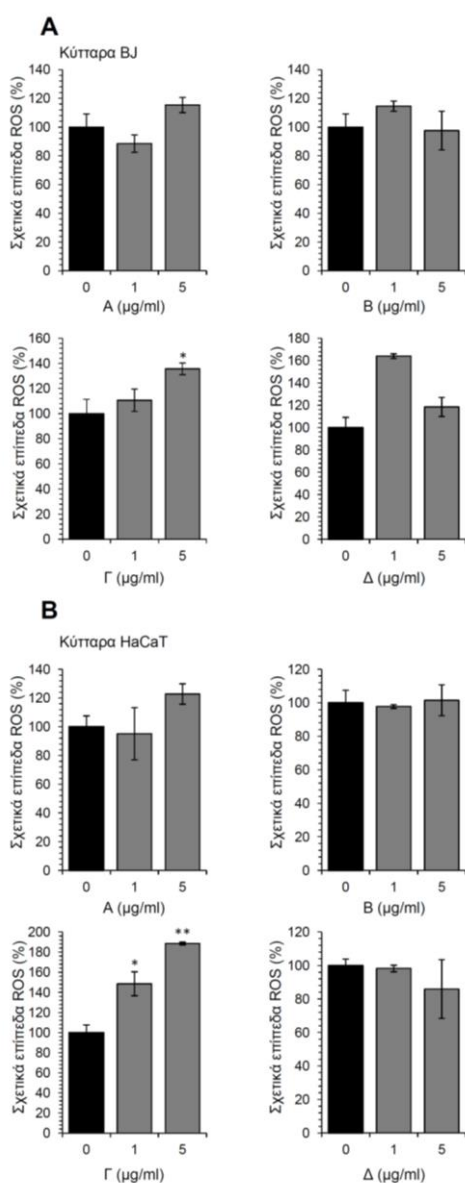
3.3.1. Διαφορική επίδραση των εκχυλισμάτων του φυτού *Cichorium intybus* στο οξειδωτικό φορτίο των κυττάρων και το δίκτυο πρωτεόστασης

Αρχικά, μελετήσαμε την επίδραση των εκχυλισμάτων Α, Β, Γ και Δ στη βιωσιμότητα των ανθρώπινων φυσιολογικών ινοβλαστών BJ και των ανθρώπινων αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων HaCaT. Για τον σκοπό αυτό, τα κύτταρα επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων για 24 ώρες και στη συνέχεια, εκτιμήθηκαν τα επίπεδα βιωσιμότητας με τη δοκιμασία MTT. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.8Α, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική επίπτωση στη βιωσιμότητα των ινοβλαστών BJ μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα Α και Β, ενώ παρατηρήθηκε μια αύξηση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των κυττάρων μετά από επώαση με τα εκχυλίσματα Γ και Δ. Επιπλέον, βρέθηκε ότι και τα τέσσερα εκχυλίσματα δεν προκαλούν τοξικότητα στα κερατινοκύτταρα HaCaT στις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν (Εικ. 3.8Β).



Εικόνα 3.8 Επίδραση των εκχυλισμάτων του φυτού *Cichorium intybus* στη βιωσιμότητα των ανθρώπινων φυσιολογικών ινοβλαστών και των ανθρώπινων αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων. (A, B) Σχετικά (%) επίπεδα βιωσιμότητας (δοκιμασία MTT) των ανθρώπινων φυσιολογικών ινοβλαστών δέρματος BJ (A) και των ανθρώπινων αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων HaCaT (B) έπειτα από επώαση με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων A, B, Γ και Δ για 24 ώρες. Οι τιμές 100% αφορούν στα κύτταρα-μάρτυρες. Όπου A: εκχύλιση με υπερήχους, B: εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά, Γ και Δ: επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη τον αιθανικό αιθυλεστέρα (Γ) ή μείγμα αιθανόλης και νερού σε αναλογία 1:1 (Δ). Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

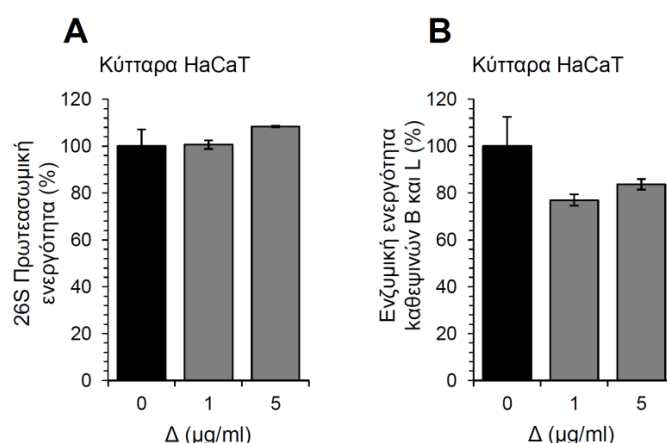
Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση των παραπάνω εκχυλισμάτων στα ενδοκυτταρικά επίπεδα δραστικών μορφών οξυγόνου. Για τον λόγο αυτό, τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων και ακολούθως, τα επίπεδα ROS υπολογίστηκαν μέσω φθορισμομετρίας. Στους ανθρώπινους φυσιολογικούς ινοβλάστες BJ δεν παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων ROS, ενώ για τα εκχυλίσματα Γ και Δ διαπιστώθηκε αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS (Εικ. 3.9Α). Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και κατά την εκτίμηση των επιπέδων ROS μετά από έκθεση των HaCaT κυττάρων στα υπό μελέτη εκχυλίσματα. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια μικρή τάση μείωσης των ενδοκυτταρικών επιπέδων ROS μετά από επώαση με το εκχύλισμα Δ (Εικ. 3.9Β).



Εικόνα 3.9 Επίδραση των εκχυλισμάτων του φυτού *Cichorium intybus* στο οξειδωτικό φορτίο των ανθρώπινων φυσιολογικών ινοβλαστών και των αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων. (Α,

B) Σχετικά (%) επίπεδα ROS μετά από επώαση των ανθρώπινων ινοβλαστών BJ (A) και των ανθρώπινων αθανατοποιημένων κερατινοκυττάρων HaCaT (B) με τα εκχυλίσματα Α, Β, Γ και Δ σε συγκεντρώσεις 1 και 5 μg/ml για 24 ώρες. Οι τιμές 100% αφορούν στα κύτταρα-μάρτυρες. Όπου Α: εκχύλιση με υπερήχους, Β: εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά, Γ και Δ: επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη τον αιθανικό αιθυλεστέρα (Γ) ή μείγμα αιθανόλης και νερού σε αναλογία 1:1 (Δ). Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Τέλος, με βάση την παρατήρησή μας ότι το εκχύλισμα Δ πιθανόν έχει αντιοξειδωτική δράση στα κύτταρα HaCaT, μελετήσαμε την επίδραση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος στην ενεργότητα του πρωτεασώματος καθώς επίσης και στην ενζυμική ενεργότητα των καθεψινών Β και L του λυσοσώματος. Έτσι, τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος και ακολούθως μετρήθηκαν οι αντίστοιχες ενζυμικές ενεργότητες μέσω φθορισμομετρίας. Η επώαση των HaCaT κερατινοκυττάρων με το εκχύλισμα Δ οδήγησε σε μια μικρή τάση αύξησης της πρωτεασωματικής ενεργότητας των κυττάρων (Εικ. 3.10Α), ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε μια τάση μείωσης της ενεργότητας των καθεψινών Β και L (Εικ. 3.10Β).



Εικόνα 3.10 Επίδραση του εκχυλίσματος του φυτού *Cichorium intybus* στο δίκτυο πρωτεόστασης σε ανθρώπινα αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα. (Α) Σχετικά (%) επίπεδα της κύριας ενζυμικής πρωτεασωματικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης (LLVY/β5) σε ανθρώπινα αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα HaCaT που επώαστηκαν για 24 ώρες με 1 μg/ml και 5 μg/ml του εκχυλίσματος Δ. (Β) Σχετικά (%) επίπεδα της ενζυμικής ενεργότητας των καθεψινών Β και L έπειτα από επώαση των κερατινοκυττάρων HaCaT με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος Δ για 24 ώρες. Οι τιμές 100% αφορούν στα κύτταρα-μάρτυρες. Όπου Δ, το εκχύλισμα που απομονώθηκε με την τεχνική επιταχυνόμενης εκχύλισης με διαλύτη μείγμα αιθανόλης και νερού σε αναλογία 1:1.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. Συζήτηση

Η κυτταρική γήρανση ορίζεται ως μία μη αναστρέψιμη αναστολή του κυτταρικού κύκλου και χαρακτηρίζεται, μεταξύ άλλων, από συσσώρευση δυσλειτουργικών βιομορίων και απορρύθμιση των πρωτεολυτικών και επιδιορθωτικών μονοπατιών του κυττάρου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η γήρανση σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα νοσηρότητας και θνησιμότητας, καθώς και εμφάνισης ασθενειών, όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές διαταραχές και τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα (López-Otín et al., 2013; Gorgoulis et al, 2019).

Είναι πλέον αποδεκτό ότι τόσο η ποιότητα όσο και το προσδόκιμο ζωής μπορούν να βελτιωθούν και να επεκταθούν, αντίστοιχα, μέσω γενετικών, διατροφικών και/ή φαρμακολογικών παρεμβάσεων. Δεδομένου όμως ότι οι γενετικές παρεμβάσεις ή ο θερμιδικός περιορισμός δε μπορούν να εφαρμοστούν στον άνθρωπο, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μεγάλο ενδιαφέρον για την ανεύρεση φυσικών προϊόντων, που πιθανόν μπορούν να αυξήσουν το προσδόκιμο ζωής (Argyropoulou et al., 2013).

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας και σε συνέχεια μίας εκτενούς μελέτης που αφορά στη σάρωση υψηλής απόδοσης (high-throughput screening) φυσικών προϊόντων με σκοπό την ανίχνευση βιοδραστικών μορίων έναντι της κυτταρικής γήρανσης, μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος XTMm223-S2-BM, του μορίου TM1-S3 LAEMB T89-100 P1 καθώς και εκχυλίσμάτων του φυτού *Cichorium intybus* σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το εκχύλισμα XTMm223-S2-BM και το μόριο TM1-S3 LAEMB T89-100 P1 έχουν απομονωθεί από συμβιωτικούς μικροοργανισμούς θαλάσσιων ασπόνδυλων που διαβιούν στη μεσοφωτική ωκεάνια ζώνη (μεταξύ 30 και 150 μέτρων), ενώ τα εκχυλίσματα του φυτού *Cichorium intybus* έχουν απομονωθεί με διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης, φιλικούς προς το περιβάλλον.

Είναι πλέον αποδεκτό ότι η κυτταρική και η *in vivo* γήρανση χαρακτηρίζονται από αυξημένο οξειδωτικό στρες, μειωμένη έκφραση και ενεργότητα του πρωτεασώματος και του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσοσώματος, καθώς και υψηλά επίπεδα γενωμικής και πρωτεωμικής αστάθειας (Trougakos et al., 2013; Tsakiri and Trougakos, 2015). Συνεπώς, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση των μορίων του δικτύου πρωτεόστασης θα μπορούσε να επιβραδύνει τον ρυθμό εξέλιξης της γήρανσης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα πρωτεοστατικά ρυθμιστικά μόρια ενδεχομένως αποτελούν πιθανούς θεραπευτικούς παράγοντες έναντι της γήρανσης και άλλων ηλικιο-εξαρτώμενων παθολογιών (Labbadia and Morimoto, 2015; Trougakos et al., 2013).

Ένας μεγάλος αριθμός φυσικών προϊόντων, που έχουν απομονωθεί από διάφορες πηγές της βιόσφαιρας (φυτά, θαλάσσιοι οργανισμοί ή μικροοργανισμοί) έχει δειχθεί ότι

καθυστερούν το φαινόμενο της γήρανσης και επεκτείνουν το προσδόκιμο ζωής σε διάφορους οργανισμούς-μοντέλα μέσω ενεργοποίησης των μηχανισμών του δικτύου πρωτεόστασης (Argyropoulou et al. 2013; Sklirou et al. 2018). Παραδείγματα τέτοιων φυσικών προϊόντων είναι, μεταξύ άλλων, η ρεσβερατρόλη, η ραπαμυκίνη και η κουρκουμίνη, τα οποία έχουν βρεθεί ότι ενεργοποιούν πρωτεοστατικούς και/ή αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου και οδηγούν σε αύξηση του αριθμού κυτταρικών διπλασιασμών σε ανθρώπινους ινοβλάστες και/ή του προσδόκιμου ζωής σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα (Argyropoulou et al. 2013; Wedel et al., 2018).

Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι το εκχύλισμα XTMm223-S2-BM μείωσε το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό φορτίο σε ανθρώπινους φυσιολογικούς ινοβλάστες καθώς και σε ανθρώπινα αθανатоποιημένα κερατινοκύτταρα και αύξησε τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αντιοξειδωτικής απόκρισης και των πρωτεϊνών που αυτά κωδικοποιούν. Επίσης, αύξησε την ανθεκτικότητα των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες. Το εκχύλισμα αυτό βρέθηκε ότι αποτελεί θετικό ρυθμιστή των γονιδίων που εμπλέκονται στα μονοπάτια ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσοσώματος και στις δύο υπό μελέτη κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, αύξησε τα επίπεδα έκφρασης πρωτεασωματικών υπομονάδων, πρωτεϊνών του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσοσώματος καθώς και μοριακών συνοδών, ενώ παράλληλα οδήγησε σε αύξηση της κύριας ενζυμικής ενεργότητας του πρωτεασώματος.

Συμπερασματικά, και παρότι ο μηχανισμός δράσης του συγκεκριμένου εκχυλίσματος δεν είναι γνωστός, αποτελεί θετικό ενεργοποιητή των μηχανισμών προστασίας του κυττάρου και ειδικότερα των ρυθμιστών του δικτύου πρωτεόστασης και της αντιοξειδωτικής απόκρισης. Συνεπώς, το εκχύλισμα XTMm223-S2-BM αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο παράγοντα με πιθανή αντι-γηραντική δράση.

Όσον αφορά στο μόριο TM1-S3 LAEMB T89-100 P1, εξετάστηκε εάν καρκινικές κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν κινάσες-στόχους του μορίου, παρουσιάζουν διαφορική ευαισθησία σε σχέση με φυσιολογικά και αθανатоποιημένα κύτταρα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι το ποσοστό βιωσιμότητας των κυτταρικών σειρών από καρκίνο μαστού, προστάτη και παχέος εντέρου ήταν σημαντικά μειωμένο συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό των φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων μετά από έκθεση στο μόριο TM1-S3 LAEMB T89-100 P1. Το γεγονός αυτό δεικνύει την ευαισθησία των υπό μελέτη καρκινικών σειρών στη δράση του μορίου.

Με βάση την παρατήρηση αυτή, θα μπορούσε το συγκεκριμένο μόριο να χρησιμοποιηθεί ως ικρίωμα για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη μορίων με πιθανή αντι-καρκινική δράση. Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης του μορίου TM1-S3 LAEMB T89-100 P1 δεν είναι σαφής, γνωρίζουμε, ωστόσο, ότι προσδένεται σε κινάσες όπως η Aurora A, η Fyn B και η RET (αδημοσίευτα αποτελέσματά μας). Επίσης, η δομή του είναι παρόμοια με αυτή της

σταυροσπορίνης (αδημοσίευτα αποτελέσματά μας), η οποία αποτελεί μη ειδικό αναστολέα κυτταρικών κινασών.

Ειδικότερα, η κινάση Aurora A είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης που συμβάλλει στη ρύθμιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και συμμετέχει σε ογκογόνα σηματοδοτικά μονοπάτια σε διάφορες κακοήθειες (Carvalho et al. 2015). Έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου, συνδέεται με την καρκινογένεση και την εξέλιξη της κακοήθειας, ενώ θεωρείται αρνητικός προγνωστικός δείκτης (Furukawa et al. 2006; Katayama, Brinkley, and Sen 2003; Tong et al. 2004). Η κινάση FynB είναι μια κινάση τυροσίνης, που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης-επιβίωσης και της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, την κυτταρική προσκόλληση και την ανοσολογική απόκριση. Έχει αποδειχθεί ότι υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους κακοήθειας και η υπερέκφρασή της έχει συνδεθεί με επαγωγή της αντι-αποπτωτικής ενεργότητας της AKT, καθώς και με τη μετανάστευση και προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων (Saito et al. 2010). Η κινάση RET είναι μια κινάση τυροσίνης, που εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική μετανάστευση και διαφοροποίηση και επάγει πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως τα PI3K/AKT/MTOR και RAS/RAF/MAPK. Υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου και αποτελεί αρνητικό προγνωστικό δείκτη (Ban et al. 2017; Li et al. 2019; Nakashima et al. 2007).

Λαμβάνοντας υπόψη τη συμμετοχή των κινασών αυτών στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου, καθώς επίσης και το γεγονός ότι η δομή του υπό μελέτη μορίου είναι παρόμοια με αυτή της σταυροσπορίνης, μπορούμε να υποθέσουμε ότι το μόριο προσδένεται στις κινάσες-στόχους του, μειώνοντας ή αναστέλλοντας τη λειτουργία τους. Έτσι, μπορεί να υποστηριχθεί η αντι-καρκινική του δράση και η πιθανή του χρήση για την παραγωγή αντι-καρκινικών μορίων.

Κατά τη μελέτη των εκχυλισμάτων του φυτού *Cichorium intybus*, τα οποία προέκυψαν με διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης, μόνο το εκχύλισμα που απομονώθηκε με την τεχνική επιταχυνόμενης εκχύλισης (με διαλύτη μείγμα αιθανόλης και νερού) θα μπορούσε να εξεταστεί περαιτέρω, καθώς οδήγησε σε μία τάση μείωσης του ενδοκυτταρικού οξειδωτικού φορτίου και αύξησης της κύριας πρωτεασωματικής ενεργότητας σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα.

Τα φυσικά προϊόντα, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο πιο εκτεταμένης έρευνας στο μέλλον, προκειμένου να γίνουν γνωστοί οι μηχανισμοί δράσης τους στα κύτταρα και οι επιπλέον ωφέλιμες ιδιότητες, που πιθανόν να διαθέτουν.

Ωστόσο, καθώς ο αριθμός των διαθέσιμων φυσικών προϊόντων που παρουσιάζουν αντι-γηραντική δράση είναι αρκετά χαμηλός (Argyropoulou et al., 2013), κρίνεται αναγκαία η

αναζήτηση νέων πηγών βιοδραστικών φυσικών προϊόντων. Υποσχόμενες πηγές αναζήτησης αποτελούν πολυάριθμα ανεξερεύνητα οικοσυστήματα, οικοσυστήματα με ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς και οικοσυστήματα με τεράστια βιοποικιλότητα, όπως αυτή των θαλάσσιων οικοσυστημάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5. Βιβλιογραφία

- Argyropoulou, Aikaterini, Nektarios Aligiannis, Ioannis P. Trougakis, and Alexios Leandros Skaltsounis. 2013. "Natural Compounds with Anti-Ageing Activity." *Natural Product Reports* 30(11):1412–37.
- Ban, Kechen, Shu Feng, Longjiang Shao, and Michael Ittmann. 2017. "RET Signaling in Prostate Cancer." (17):4885–97.
- Baur, Joseph A., and David A. Sinclair. 2006. "Therapeutic Potential of Resveratrol: The in Vivo Evidence." *Nature Reviews Drug Discovery* 5(6):493–506.
- Berstein, Lev M. 2012. "Metformin in Obesity, Cancer and Aging: Addressing Controversies." *Aging* 4(5):320–29.
- Bhullar, Khushwant S., and Basil P. Hubbard. 2015. "Lifespan and Healthspan Extension by Resveratrol." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1852(6):1209–18.
- Bielak-Zmijewska, Anna, Wioleta Grabowska, Agata Ciolko, Agnieszka Bojko, Grażyna Mosieniak, Łukasz Bijoch, and Ewa Sikora. 2019. "The Role of Curcumin in the Modulation of Ageing." *International Journal of Molecular Sciences* 20(5).
- Boskabady, M. H., S. Kiani, and H. Rakhshandah. 2006. "Relaxant Effects of Rosa Damascena on Guinea Pig Tracheal Chains and Its Possible Mechanism(S)." *Journal of Ethnopharmacology* 106(3):377–82.
- Brack, C. 2000. "EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and Cellular Gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999." *The EMBO Journal* 19(9):1929–34.
- Campisi, Judith. 2013. "Aging, Cellular Senescence, and Cancer." *Annual Review of Physiology* 75(1):685–705.
- Campisi, Judith, and Fabrizio D'Adda Di Fagagna. 2007. "Cellular Senescence: When Bad Things Happen to Good Cells." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(9):729–40.
- Carvalho, Sara, Susana Abreu Ribeiro, Miguel Arocena, Taciana Kasciukovic, Achim Temme, Katrin Koehler, Angela Huebner, and Eric R. Griffis. 2015. "The Nucleoporin ALADIN Regulates Aurora A Localization to Ensure Robust Mitotic Spindle Formation." *Molecular Biology of the Cell* 26(19):3424–38.
- Collins, Galen Andrew, and Alfred L. Goldberg. 2017. "The Logic of the 26S Proteasome." *Cell* 169(5):792–806.
- Conaway, R. C., C. S. Brower, J. W. Conaway, and H. D. Ulrich. 1999. "Aging and Sirtuins." *Trends Cell Biol Science Eukaryot. Cell Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 9(6):107–12.
- Dong, Yuqing, Sujay Guha, Xiaoping Sun, Min Cao, Xiaoxia Wang, and Sige Zou. 2012. "Nutraceutical Interventions for Promoting Healthy Aging in Invertebrate Models." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012.

- Furukawa, T., N. Kanai, H. O. Shiwak, N. Soga, A. Uehara, and A. Horii. 2006. "AURKA Is One of the Downstream Targets of MAPK1/ERK2 in Pancreatic Cancer." *Oncogene* 25(35):4831–39.
- Gorgoulis, Vassilis, Peter D. Adams, Andrea Alimonti, Dorothy C. Bennett, Oliver Bischof, Cleo Bishop, Judith Campisi, Manuel Collado, Konstantinos Evangelou, Gerardo Ferbeyre, Jesús Gil, Eiji Hara, Valery Krizhanovsky, Diana Jurk, Andrea B. Maier, Masashi Narita, Laura Niedernhofer, João F. Passos, Paul D. Robbins, Clemens A. Schmitt, John Sedivy, Konstantinos Vougas, Thomas von Zglinicki, Daohong Zhou, Manuel Serrano, and Marco Demaria. 2019. "Cellular Senescence: Defining a Path Forward." *Cell* 179(4):813–27.
- Griseri, Paola, Ornella Garrone, Alessandra Lo Sardo, Martino Monteverde, Marta Rusmini, Federica Tonissi, Marco Merlano, Paolo Bruzzi, Cristiana Lo Nigro, and Isabella Ceccherini. 2016. "Genetic and Epigenetic Factors Affect RET Gene Expression in Breast Cancer Cell Lines and Influence Survival in Patients." *Oncotarget* 7(18):26465–79.
- Gumeni, Sentiljana, Zoi Evangelakou, Vassilis G. Gorgoulis, and Ioannis P. Trougakos. 2017. "Proteome Stability as a Key Factor of Genome Integrity." *International Journal of Molecular Sciences* 18(10).
- Hipp, Mark S., Prasad Kasturi, and F. Ulrich Hartl. 2019. "The Proteostasis Network and Its Decline in Ageing." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20(7):421–35.
- Katayama, Hiroshi, William R. Brinkley, and Subrata Sen. 2003. "The Aurora Kinases: Role in Cell Transformation and Tumorigenesis." *Cancer and Metastasis Reviews* 22(4):451–64.
- Kaushik, Susmita, and Ana Maria Cuervo. 2015. "Proteostasis and Aging." *Nature Medicine* 21(12):1406–15.
- Klaips, Courtney L., Gopal Gunanathan Jayaraj, and F. Ulrich Hartl. 2018. "Pathways of Cellular Proteostasis in Aging and Disease." *Journal of Cell Biology* 217(1):51–63.
- Labbadia, Johnathan, and Richard I. Morimoto. 2015. "The Biology of Proteostasis in Aging and Disease." *Annual Review of Biochemistry* 84(1):435–64.
- Li, Andrew Y., Michael G. McCusker, Alessandro Russo, Katherine A. Scilla, Allison Gittens, Katherine Arensmeyer, Ranee Mehra, Vincenzo Adamo, and Christian Rolfo. 2019. "RET Fusions in Solid Tumors." *Cancer Treatment Reviews* 81(September):101911.
- Liao, Vivian Hsiu Chuan, Chan Wei Yu, Yu Ju Chu, Wen Hsuan Li, Yi Chen Hsieh, and Teng Ting Wang. 2011. "Curcumin-Mediated Lifespan Extension in *Caenorhabditis Elegans*." *Mechanisms of Ageing and Development*.

- Ličina, Braho Z., Olgica D. Stefanović, Sava M. Vasić, Ivana D. Radojević, Milan S. Dekić, and Ljiljana R. Čomić. 2013. "Biological Activities of the Extracts from Wild Growing *Origanum Vulgare* L." *Food Control*.
- Loboda, Agnieszka, Milena Damulewicz, Elzbieta Pyza, Alicja Jozkowicz, and Jozef Dulak. 2016. "Role of Nrf2/HO-1 System in Development, Oxidative Stress Response and Diseases: An Evolutionarily Conserved Mechanism." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(17):3221–47.
- López-otín, Carlos, Maria A. Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, and Guido Kroemer. 2013. "The Hallmarks of Aging Longevity." *Cell* 153(6):1194–1217.
- Mehta, Jay, Srujana Rayalam, and Xinyu Wang. 2018. "Cytoprotective Effects of Natural Compounds against Oxidative Stress." *Antioxidants* 7(10):1–20.
- Morimoto, Richard I., and Ana Maria Cuervo. 2014. "Proteostasis and the Aging Proteome in Health and Disease." *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences* 69:S33–38.
- Morimoto, Richard I., Arnold J. M. Driessen, Ramanujan S. Hegde, and Thomas Langer. 2011. "The Life of Proteins: The Good, the Mostly Good and the Ugly." *Nature Structural and Molecular Biology* 18(1):1–4.
- Nakashima, Masahiro, Noboru Takamura, Hiroyuki Namba, Vladimir Saenko, Serik Meirmanov, Naomichi Matsumoto, Tomayoshi Hayashi, Shigeto Maeda, and Ichiro Sekine. 2007. "RET Oncogene Amplification in Thyroid Cancer: Correlations with Radiation-Associated and High-Grade Malignancy." *Human Pathology* 38(4):621–28.
- Niforou, Katerina, Christina Cheimonidou, and Ioannis P. Trougakos. 2014. "Molecular Chaperones and Proteostasis Regulation during Redox Imbalance." *Redox Biology* 2(1):323–32.
- Pan, Haihui, and Toren Finkel. 2017. "Key Proteins and Pathways That Regulate Lifespan." *292*(12):6452–60.
- Peyrat, Laure Anne, Nikolaos Tsafantakis, Katerina Georgousaki, Jamal Ouazzani, Olga Genilloud, Ioannis P. Trougakos, and Nikolas Fokialakis. 2019. "Terrestrial Microorganisms: Cell Factories of Bioactive Molecules with Skin Protecting Applications." *Molecules* 24(9).
- Posadas, Edwin M., Hikmat Al-ahmadie, Victoria L. Robinson, Ramasamy Jagadeeswaran, Kristen Otto, Kristen E. Kasza, Maria Tretiakova, Javed Siddiqui, Kenneth J. Pienta, M. Stadler, Carrie Rinker-schaeffer, and Ravi Salgia. 2010. "NIH Public Access." *103*(2):171–77.
- Riera, Celine E., Carsten Merkwirth, C. Daniel De Magalhaes Filho, and Andrew Dillin. 2016. "Signaling Networks Determining Life Span." *Annual Review of Biochemistry*

85(1):35–64.

- Saito, Yoshihito D., Ana R. Jensen, Ravi Salgia, and Edwin M. Posadas. 2010. “Fyn: A Novel Molecular Target in Cancer.” *Cancer* 116(7):1629–37.
- Sala, Ambre J., Laura C. Bott, and Richard I. Morimoto. 2017. “Shaping Proteostasis at the Cellular, Tissue, and Organismal Level.” *Journal of Cell Biology* 216(5):1231–41.
- Schmidt, Marion, and Daniel Finley. 2014. “Regulation of Proteasome Activity in Health and Disease.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1843(1):13–25.
- Schriner, Samuel E., Niki S. Katoozi, Kevin Q. Pham, Maral Gazarian, Asghar Zarban, and Mahtab Jafari. 2012. “Extension of Drosophila Lifespan by Rosa Damascena Associated with an Increased Sensitivity to Heat.” *Biogerontology* 13(2):105–17.
- Shehzad, Adeeb, Taewook Ha, Fazli Subhan, and Young Sup Lee. 2011. “New Mechanisms and the Anti-Inflammatory Role of Curcumin in Obesity and Obesity-Related Metabolic Diseases.” *European Journal of Nutrition* 50(3):151–61.
- Shen, Li Rong, Laurence D. Parnell, Jose M. Ordovas, and Chao Qiang Lai. 2013. “Curcumin and Aging.” *BioFactors* 39(1):133–40.
- Shen, Li Rong, Fa Xiao, Peng Yuan, Ying Chen, Qi Kang Gao, Laurence D. Parnell, Mohsen Meydani, Jose M. Ordovas, Duo Li, and Chao Qiang Lai. 2013. “Curcumin-Supplemented Diets Increase Superoxide Dismutase Activity and Mean Lifespan in Drosophila.” *Age* 35(4):1133–42.
- Shu, Shao Kun, Qiyuan Liu, Domenico Coppola, and Jin Q. Cheng. 2010. “Phosphorylation and Activation of Androgen Receptor by Aurora-A.” *Journal of Biological Chemistry* 285(43):33045–53.
- Sklirou, Aimilia, Eleni Dimitra Papanagnou, Nikolas Fokialakis, and Ioannis P. Trougakos. 2018. *Cancer Chemoprevention via Activation of Proteostatic Modules*. Vol. 413. Elsevier B.V.
- Tong, Tong, Yali Zhong, Jianping Kong, Lijia Dong, Yongmei Song, Ming Fu, Zhihua Liu, Mingrong Wang, Liping Guo, Shixin Lu, Ming Wu, and Qimin Zhan. 2004. “Overexpression of Aurora-A Contributes to Malignant Development of Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma.” 10:7304–10.
- Trougakos, Ioannis P., Fabiola Sesti, Eleni Tsakiri, and Vassilis G. Gorgoulis. 2013. “Non-Enzymatic Post-Translational Protein Modifications and Proteostasis Network Deregulation in Carcinogenesis.” *Journal of Proteomics* 92:274–98.
- Tsakiri, Eleni N., and Ioannis P. Trougakos. 2015. *The Amazing Ubiquitin-Proteasome System: Structural Components and Implication Inaging*. Vol. 314. Elsevier Ltd.
- Vilchez, David, Isabel Saez, and Andrew Dillin. 2014. “The Role of Protein Clearance Mechanisms in Organismal Ageing and Age-Related Diseases.” *Nature*

Communications 5:1–13.

- Wedel, Sophia, Maria Manola, Maria Cavinato, Ioannis P. Trougakos, and Pidder Jansen-Drr. 2018. “Targeting Protein Quality Control Mechanisms by Natural Products to Promote Healthy Ageing.” *Molecules* 23(5).
- Wolff, Suzanne, Jonathan S. Weissman, and Andrew Dillin. 2014. “Differential Scales of Protein Quality Control.” *Cell* 157(1):52–64.
- Wood, Jason G., Blanka Rogina, Siva Lavu, Kontad Ilowitz, Stephen L. Helfand, Marc Tatar, and David Sinclair. 2004. “Erratum: Sirtuin Activators Mimic Caloric Restriction and Delay Ageing in Metazoans (Nature (2004) 430 (686-689)).” *Nature* 430(7004):107.
- Xu, Jie, Xing Wu, Wei hua Zhou, An wen Liu, Jian bing Wu, Jin yun Deng, Cai feng Yue, Shao bing Yang, Jing Wang, Zhong yu Yuan, and Quentin Liu. 2013. “Aurora-A Identifies Early Recurrence and Poor Prognosis and Promises a Potential Therapeutic Target in Triple Negative Breast Cancer.” *PLoS ONE* 8(2):1–11.
- Zhang, Zhong Rong, Wing Nang Leung, Ho Yee Cheung, and Chun Wai Chan. 2015. “Osthole: A Review on Its Bioactivities, Pharmacological Properties, and Potential as Alternative Medicine.” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015.