



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη Βιοδραστικών Μορίων με Πιθανή Αντιγηραντική και/ή
αντικαρκινική Δράση

Δήμου Όλγα (Μοριακός Βιολόγος)

A.M.: 41802

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ιωάννης Π. Τρουγκάκος (Επιβλέπων)

Καθηγητής Βιολογίας Ζωϊκού Κυττάρου & Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ουρανία Τσιτσιλώνη

Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ισιδώρα Παπασιδέρη

Ομότιμη Καθηγήτρια Κυτταρικής & Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Περίληψη

Ως γήρανση ορίζεται η φυσιολογική, πολυπαραγοντική, μη αναστρέψιμη κατάσταση κατά την οποία αυξάνονται σταδιακά οι βλάβες των βιομορίων και των οργανιδίων των κυττάρων, με αποτέλεσμα τη μείωση της λειτουργικότητας του οργανισμού με την πάροδο του χρόνου. Οι βλάβες που προκαλούνται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες απομακρύνονται ή επιδιορθώνονται από τους μηχανισμούς συντήρησης της ομοιοδυναμικής του κυττάρου. Ωστόσο, η σταδιακή γήρανση του οργανισμού, για την ερμηνεία της οποίας έχουν αναπτυχθεί διάφορες θεωρίες, έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω συσσώρευση βλαβών σε συνδυασμό με την εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται με το γήρας. Σύμφωνα με τη θεωρία των ελεύθερων ριζών, η σταδιακή συσσώρευση ROS προκαλεί βλάβες στους οργανισμούς σε διάφορα επίπεδα και τα μιτοχόνδρια φαίνεται πως αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή ROS στα βιολογικά συστήματα. Ο παράγοντας PGC-1αεπάγει τη μιτοχονδριακή βιογένεση, προάγει την αναδιαμόρφωση του μυϊκού ιστού και συμμετέχει στη ρύθμιση του μεταβολισμού τόσο των υδατανθράκων όσο και των λιπιδίων και το μοναδικό ομόλογό του στο γονιδίωμα της *Drosophila* είναι το spargel, το οποίο έχει βρεθεί ότι λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο όσον αφορά στη βιογένεση, και ο ρόλος του οποίου είναι ιδιαίτερα σημαντικός στη ρύθμιση παροχής θρεπτικών στα μιτοχόνδρια και γενικότερα στο μεταβολισμό του κυττάρου. Ένα φάρμακο που παρουσιάζει αυξημένη αποτελεσματικότητα σε ποικίλες ασθένειες είναι η μετφορμίνη, η οποία αναστέλλει το, ζωτικής σημασίας για τη μεταφορά ηλεκτρονίων, μιτοχονδριακό σύμπλεγμα I, η οποία, πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι μπορεί να αλλάζει τα επίπεδα πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού, της γήρανσης και του καρκίνου. Το μονοπάτι λυσοσώματος - αυτοφαγίας και το σύστημα ουβικιτίνης - πρωτεασώματος, κύρια πρωτεολυτικά μονοπάτια του κυττάρου, συμμετέχουν στην απομάκρυνση οξειδωμένων και μη λειτουργικών πρωτεϊνών ή οργανιδίων, τα οποία δεν μπορούν να επιδιορθωθούν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου και φαίνεται να εμπλέκονται στη διαδικασία της γήρανσης και ρύθμισης της μακροβιότητας. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διαλεύκανση της λειτουργικής διασύνδεσης της μιτοχονδριακής βιογένεσης με τα κύρια πρωτεολυτικά συστήματα του οργανισμού μέσω της υπερέκφρασης του Spargel και η συμμετοχή του φαρμακολογικού παράγοντα μετφορμίνη στη διαδικασία της γήρανσης ύστερα από την υπερέκφραση στον οργανισμό – μοντέλο *Drosophila melanogaster*.

Abstract

Aging is defined as the normal, multifactorial, irreversible condition in which the damage to biomolecules and cell organelles gradually increases, resulting in a decrease in the body's functionality over time. Damages caused by endogenous and exogenous factors are removed or repaired by the homeodynamic maintenance mechanisms of the cell. However, the gradual aging of the organism, for the interpretation of which various theories have been developed, results in the further accumulation of damage in combination with the appearance of diseases associated with old age. According to the free radical theory, the gradual accumulation of ROS causes damage to organisms at various levels, and mitochondria appear to be the important source of ROS in biological systems. PGC-1 α induces mitochondrial biogenesis, promotes muscle tissue remodeling, and participates in the regulation of both carbohydrate and lipid metabolism, and its only homologue in the *Drosophila* genome is spargel, which has been found to function similarly in biogenesis, and whose role is particularly important in regulating mitochondrial nutrient supply and cell metabolism in general. A drug showing increased efficacy in a variety of diseases is metformin, which targets the mitochondrial complex I, vital for electron transport, which has recently been shown to alter the levels of proteins involved in a wide range of cellular processes, including metabolism. The lysosome-autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system, major proteolytic pathways of the cell, participate in the removal of oxidized and non-functional proteins or organisms, which cannot be repaired by the cell's repair mechanisms and the process of entanglement. The purpose of this work is to elucidate the functional interconnection of mitochondrial biogenesis with the main proteolytic systems of the organism through the overexpression of spargel and the participation of the pharmacological agent metformin in the aging process after spargel overexpression in the model-organism *Drosophila melanogaster*.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία υλοποιήθηκε χάρη στον Καθηγητή κύριο Ιωάννη Τρουγκάκο που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να αποτελέσω μέλος του εργαστηρίου του και χάρη στην πολύτιμη βοήθεια της Dr Ζωής Ευαγγέλου και τους ευχαριστώ ιδιαίτερω γι' αυτό.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κυρία Ουρανία Τσιτσιλώνη και την ομότιμη Καθηγήτρια κυρία Ισιδώρα Παपाσιδέρη που αποτελούν μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Dr Sentiljana Gumeni, Dr Ελένη-Δήμητρα Παπανάγνου, Dr Μαρία Μανωλά και υποψήφια διδάκτορα Δέσποινα Γιαννιού για το υπέροχο κλίμα που επικρατούσε στο εργαστήριο, καθώς και όλα τα μέλη του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής.

Τέλος, θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τις Κατερίνα Οικονομάκη, Σταυρούλα Σαμαρά, Ανδρομάχη Βαγενά, Κατερίνα Ρουμελιώτη, Κατσώνη Ελένη και Καλιγέρου Χρυσούλα, αγαπημένες συναδέλφους μου στο Τμήμα Γενωμικής του Ιδιωτικού Διαγνωστικού Εργαστηρίου «Genotypos Science Labs», στο οποίο εργάζομαι τα τελευταία 3 χρόνια ως Βιολόγος, την κυρία Χριστοπούλου Γεωργία, διευθύντρια του εργαστηρίου και τον κύριο Κωνσταντουλάκη Παντελεήμονα, Επιστημονικό Διευθυντή του εργαστηρίου για τη συμπαράστασή τους στην εργαστηριακή καθημερινότητα, την κατανόηση και την υποστήριξή τους κατά τη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Περιεχόμενα

Πίνακας συντομογραφιών.....	7
1. Εισαγωγή	10
1.1. Γήρανση	10
1.1.1. Αναδιπλασιαστική γήρανση	10
1.1.2. Θεωρίες γήρανσης.....	11
1.1.2.1. Θεωρία των ελεύθερων μορφών οξυγόνου - Οξειδωτικό στρες.....	11
1.2. Μιτοχόνδριο.....	12
1.2.1. Δομή.....	12
1.2.2. Γονιδίωμα	15
1.2.3. Προέλευση των μιτοχονδρίων.....	16
1.2.4. Λειτουργία	16
1.2.4.1. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος.....	17
1.2.4.2. Χημειωσμωτική σύζευξη	17
1.2.4.3. Επιπρόσθετες λειτουργίες των μιτοχονδρίων	19
1.3. PGC-1α - Spargel	20
1.4. Μετοφορμίνη	21
1.5. Κυτταρικά μονοπάτια πρωτεόλυσης	22
1.5.1. Μονοπάτι λυσοσώματος-αυτοφαγίας	22
1.5.1.1. Λυσοσώματα.....	21
1.5.1.2. Γήρανση και λυσοσώματα.....	22
1.5.1.3 Αυτοφαγία.....	22
1.5.2. Σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος.....	24
1.5.2.1. Η ουβικιτίνη.....	24
1.5.2.2. Το πρωτεάσωμα.....	26
1.5.2.3. Γήρανση και το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος.....	28
1.6. <i>Drosophila melanogaster</i>	30
1.6.1. Γενικά χαρακτηριστικά	30
1.6.2. Κύκλος ζωής της <i>D. melanogaster</i>	30
1.6.2.1. Ωογένεση	31
1.6.2.2. Εμβρυογένεση	31
1.6.2.3. Προνομφικά στάδια	32
1.6.2.4. Ενήλικο έντομο	32
1.6.3. Η <i>D. melanogaster</i> ως οργανισμός - μοντέλο	32
1.6.4. Το γονιδίωμα της <i>D. melanogaster</i>	33
2. Σκοπός.....	34
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	35

3.1 Υλικά.....	34
3.2 Μέθοδοι.....	38
3.2.1 Καλλιέργεια εντόμων.....	38
3.2.1.1 Επαγωγή της έκφρασης του διαγονιδίου με τη χορήγηση της ορμόνης RU486.....	38
3.2.2 Προσδιορισμός μακροβιότητας των διαγονιδιακών εντόμων <i>Drosophila melanogaster</i>	39
3.2.3 Ανατομία ωοθηκών και σπερματοθηκών του εντόμου <i>Drosophila melanogaster</i>	39
3.2.3.1 Ανατομία ωοθηκών.....	40
3.2.3.2 Ανατομία σπερματοθηκών.....	40
3.2.4 Απομόνωση πρωτεϊνών και προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης τους.....	40
3.2.4.1 Μέθοδος Bradford.....	40
3.2.4.1.1 Μέτρηση δειγμάτων.....	41
3.2.5 SDS – PAGE - Ανοσοστύπωμα Western.....	41
3.2.5.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε ομοιογενές πήκτωμα ακρυλαμίδης.....	41
3.2.5.2 Μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	42
3.2.5.3 Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνικών ζωνών.....	43
3.2.5.4 Αφαίρεση του αντισώματος από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Stripping)	45
3.2.6 Ανίχνευση οξειδωμένων πρωτεϊνών (OxyBlot)	46
3.2.7 Μέτρηση των δύο ενζυματικών ενεργοτήτων του πρωτεασώματος.....	47
3.2.8 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των καθεψινών B και L του λυσοσώματος.....	49
3.2.9 Μέτρηση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών οξυγόνου.....	50
3.2.10 Απομόνωση RNA.....	50
3.2.10.1 Σύνθεση cDNA.....	51
3.2.10.2 Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μέσω Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	51
3.2.11 Έλεγχος της ικανότητας αναρρίχησης (Climping assay) των εντόμων.....	52
3.2.12 Το σύστημα GAL4-UAS.....	53
3.2.12.1 Το σύστημα GAL4-UAS στη <i>Drosophila</i>	53
4 Αποτελέσματα.....	54
5. Συζήτηση.....	66
6. Βιβλιογραφία	69

Πίνακας συντομογραφιών

DNA	Deoxyribonucleic acid
ROS	Reactive Oxygen Species
ATP	Adenosine TriPhosphate
kDa	Kilodalton
TOM	Translocase of the Outer Membrane
ER	Endoplasmic Reticulum
MAM	Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes
TIM	Translocase of the Inner Membrane
Oxa1	Oxidase Assembly Protein1
HSC70	Heat shock cognate 71 kDa protein
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen
ακέτυλο - CoA	ακέτυλο-συνένζυμο A
FADH ₂	flavin adenine dinucleotide hydrogen
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
mtERs	Μιτοχονδριακοί υποδοχείς οιστρογόνων
PGC-1	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator
O ₂	οξυγόνο
NRF-1	Nuclear respiratory factor 1
NRF-2	Nuclear respiratory factor 2
ERRα	Estrogen-related receptor alpha
AMPK	AMP-activated protein kinase
SIRT1	Sirtuin 1
T2D	Type 2 diabetes
CVDs	Cardiovascular diseases
AMP	Adenosine monophosphate
CMA	Chaperone-Mediated Autophagy
UPS	Ubiquitin Proteasome System
Lys	Λυσίνη
Cys	Κυστεΐνη
Gly	Γλυκίνη
DUBs	deubiquitinating enzymes
Rpn	Ribophorin

CNC-bZIP

ARE

Keap1

cap-n-collar basic leucine zipper

Antioxidant Response Elements

Kelch-like ECH-associated protein 1

1. Εισαγωγή

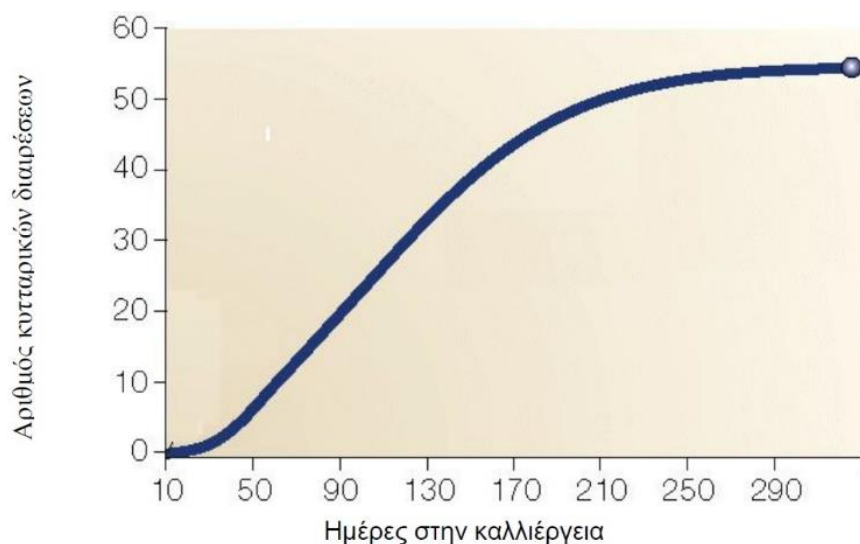
1.1. Γήρανση

Ως γήρανση ορίζεται η φυσιολογική, μη αναστρέψιμη κατάσταση κατά την οποία αυξάνονται σταδιακά οι βλάβες των βιομορίων και των οργανιδίων των κυττάρων, με αποτέλεσμα τη μείωση της λειτουργικότητας του οργανισμού με την πάροδο του χρόνου. Η διαδικασία της γήρανσης είναι πολυπαραγοντική και χαρακτηρίζεται από τη βαθμιαία ελάττωση της αντοχής του οργανισμού σε παράγοντες που προκαλούν στρες, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση δυσλειτουργικών πρωτεϊνών και άλλων τροποποιημένων βιομορίων, όπως λιπίδια και DNA. Η ομοιόσταση των κυττάρων επιτυγχάνεται, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, από ένα δίκτυο πρωτεολυτικών κι επιδιορθωτικών συστημάτων που αναλαμβάνουν την απομάκρυνση και αποκατάσταση των βλαβών (Rattan, 2005).

Οι βλάβες αυτές προκαλούνται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες. Στους ενδογενείς παράγοντες ανήκουν οι τροποποιήσεις του γονιδιώματος, όπως οι βλάβες του DNA και οι ανακατατάξεις της χρωματίνης, ενώ το περιβαλλοντικό στρες και ο τρόπος ζωής αποτελούν εξωγενείς παράγοντες που σχετίζονται με τη γήρανση (López-Otín et al., 2013; Trougakos et al., 2013). Οι βλάβες αυτές απομακρύνονται ή επιδιορθώνονται από τους μηχανισμούς συντήρησης της ομοιοδυναμικής του κυττάρου. Η σταδιακή γήρανση του οργανισμού οδηγεί σε δυσλειτουργία και τελικά απορρύθμιση των μηχανισμών αυτών, με αποτέλεσμα την περαιτέρω συσσώρευση βλαβών σε συνδυασμό με την εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται με το γήρας, όπως νευροεκφυλιστικές νόσους και καρκίνο (Niccoli and Partridge, 2012).

1.1.1. Αναδιπλασιαστική γήρανση

Ως αναδιπλασιαστική γήρανση ορίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα εμφανίζουν διαδοχικά μειωμένο δυναμικό κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η μεταφορά των φυσιολογικών ανθρώπινων κυττάρων σε καλλιέργεια οδηγεί σε σταδιακή μείωση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού τους, με αποτέλεσμα τη μη αντιστρεπτή παύση του πολλαπλασιασμού τους, αφού έχει προηγηθεί συγκεκριμένος αριθμός κυτταρικών διαιρέσεων (όριο Hayflick). Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε το 1960 από τους Leonard Hayflick και Paul Moorhead κι εκφράζεται με τη λογαριθμική καμπύλη Hayflick (**Εικόνα 1.1**), που αφορά την ανάπτυξη φυσιολογικών ινοβλαστών *in vitro* (Shay and Wright, 2000).



Εικόνα 1.1: Καμπύλη του Hayflick (Shay and Wright, 2000).

1.1.2. Θεωρίες γήρανσης

Οι θεωρίες που έχουν αναπτυχθεί ώστε να ερμηνεύσουν το φαινόμενο της γήρανσης διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις αναπτυξιακές-γενετικές και τις στοχαστικές (Kirkwood and Austad, 2000; Troen, 2003). Σύμφωνα με τις γενετικές θεωρίες, η γήρανση αποτελεί μέρος μιας γενετικά προγραμματισμένης διαδικασίας που αποτελείται από τη γέννηση, την ανάπτυξη, την ωρίμανση, τη γήρανση και το θάνατο. Η ρύθμιση της πραγματοποιείται μέσω επαγωγής ή καταστολής γονιδίων που σχετίζονται με τη διατήρηση της ομοιοδυναμικής του κυττάρου. Σύμφωνα με τις στοχαστικές θεωρίες, η γήρανση είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης βλαβών του οργανισμού που προκαλούνται από τυχαίους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η θεωρία του Medawar υποστηρίζει ότι οι μεταλλάξεις, που συμβαίνουν μετά την αναπαραγωγική περίοδο και δεν είναι ισχυρά επιλεγμένες αφού δεν θα μεταβιβαστούν στους απογόνους, συσσωρεύονται με το πέρασμα του χρόνου προκαλώντας βλάβες στο DNA ή τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Επιπλέον, η θεωρία των ελεύθερων ριζών, η δυσλειτουργία του μονοπατιού πρωτεασωμικής αποικοδόμησης μέσω ουβικιτίνης και οι δείκτες γήρανσης (λιποφουσκίνη, AGEs) αποτελούν ορισμένες από τις στοχαστικές θεωρίες της γήρανσης.

1.1.2.1. Θεωρία των ελεύθερων μορφών οξυγόνου - Οξειδωτικό στρες

Σύμφωνα με τη θεωρία των ελεύθερων ριζών, οι δραστικές ελεύθερες μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) συσσωρεύονται σταδιακά με το πέρασμα του χρόνου και προκαλούν βλάβες στους οργανισμούς σε διάφορα επίπεδα. Παρόλο που το O_2 είναι ένα

από τα σημαντικότερα αέρια για τους οργανισμούς, αποτελεί την κύρια αιτία παραγωγής ROS λόγω της ικανότητας του να ανάγεται από μονήρη ηλεκτρόνια. Επομένως, τα μιτοχόνδρια αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή ROS στα βιολογικά συστήματα, αφού μέσω της ρίζας σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet}$) που παράγουν οδηγούν στη συσσώρευση του οξειδωτικού στρες (Harman, 1981).

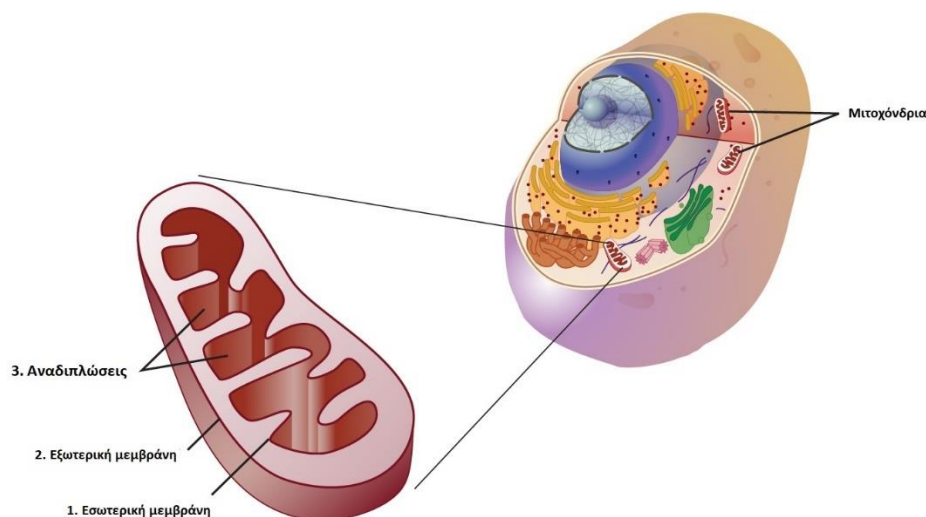
Οι αερόβιοι οργανισμοί χρησιμοποιούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων ώστε να παράγουν την ενέργεια που απαιτείται για την επιτέλεση των διαφόρων λειτουργιών τους. Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού μεταβολισμού παράγονται και οι ROS, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου στην εξωτερική στιβάδα τους, γεγονός που τις καθιστά ιδιαίτερα ασταθείς, με αποτέλεσμα να αντιδρούν με τα γειτονικά τους μόρια και να προκαλούν βλάβες. Η ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet}$) και η ρίζα υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$) αποτελούν τις δύο κύριες πηγές ROS. Η παραγωγή τους πραγματοποιείται μέσω ενζυμικών αντιδράσεων, που επιτελούνται εντός των οργανισμών, καθώς και των αντιδράσεων Fenton. Το οξειδωτικό στρες αποτελεί την κατάσταση κατά την οποία η ισορροπία ανάμεσα στο ρυθμό σχηματισμού και αποβολής ROS διαταράσσεται με αποτέλεσμα τη συσσώρευση τους στα κύτταρα. Το κύτταρο διαθέτει διάφορους μηχανισμούς ώστε να αντιμετωπίσει και να αποκαταστήσει τη συγκεκριμένη ανισορροπία. Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου, η ενίσχυση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, οι τροποποιήσεις στις βάσεις του DNA και η απώλεια της ενζυμικής ενεργότητας διαφόρων παραγόντων οδηγούν σε σημαντική οξειδωτική βλάβη, διαταράσσοντας την αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου και δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο (Finkel and Holbrook, 2000).

Σύμφωνα με μελέτες, οι πρωτεΐνες που έχουν υποστεί οξείδωση αυξάνονται με την ηλικία, με τη μεγαλύτερη τάση να παρατηρείται σε μετα-μιτωτικά και σε κύτταρα με μεγάλη διάρκεια ζωής (Sohal and Weindruch, 1996). Επιπλέον, πειράματα χορήγησης οξειδωτικών παραγόντων σε πειραματόζωα έδειξαν ότι αυξάνονται τα επίπεδα λιποφουσκίνης, που αποτελεί ένα σημαντικό βιοδείκτη γήρανσης (Tsakiri et al., 2013). Επιπροσθέτως, η χορήγηση αντιοξειδωτικών παραγόντων, καθώς και η υπερέκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων, οδηγούν σε σημαντική μείωση των επιπέδων ROS και βελτίωση του προσδόκιμου ζωής.

1.2. Μιτοχόνδριο

Τα μιτοχόνδρια παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1840 αλλά ταυτοποιήθηκαν ως ανεξάρτητα κυτταρικά οργανίδια το 1894. Περιβάλλονται από διπλή

μεμβράνη, βρίσκονται μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα και αποκαλούνται συχνά "εργοστάσια του κυττάρου" επειδή τα ένζυμά τους διενεργούν τα στάδια του αερόβιου μεταβολισμού τα οποία αποδίδουν ενέργεια (**Εικόνα 1.2**).



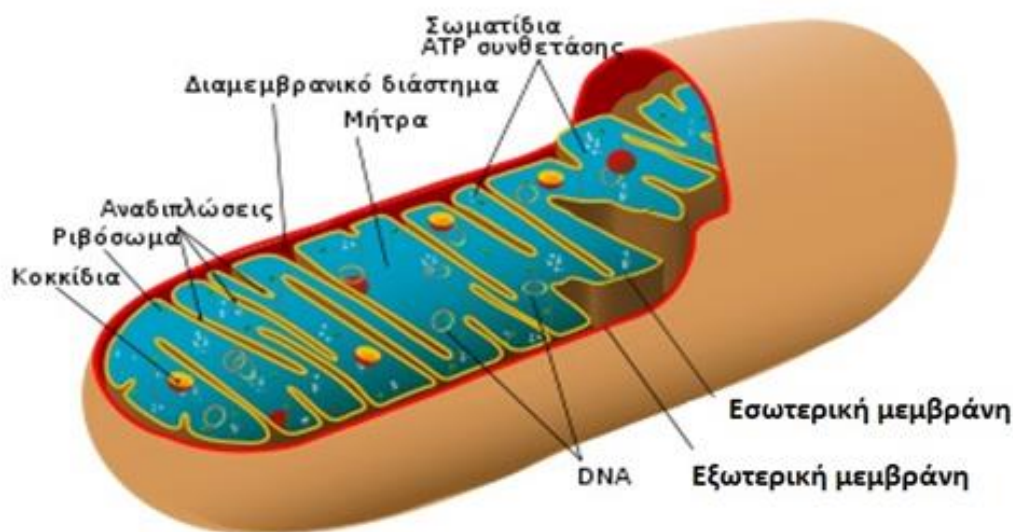
Εικόνα 1.2: Δομή μιτοχονδρίου: (1) Εσωτερική μεμβράνη, (2) Εξωτερική μεμβράνη, (3) Αναδιπλώσεις, (4) Μήτρα (Πηγή <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Mitochondria>).

Σε κύτταρα με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις τριφωφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP) π.χ. μυϊκά, νευρικά κύτταρα, κύτταρα των αισθητηρίων οργάνων, ωάρια, κ.λπ., τα μιτοχόνδρια εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα. Το ποσοστό μιτοχονδρίων που απαντάται στα μυϊκά κύτταρα της καρδιάς ισούται με 36%. Στην περίπτωση όπου τα ευκαρυωτικά κύτταρα θα χάσουν τα μιτοχόνδριά τους, δε μπορούν πλέον να αναζωογονηθούν. Ωστόσο, υπάρχουν και ευκαρυωτικά κύτταρα, π.χ. ορισμένα πρωτόζωα, που έχουν μειώσει ή τροποποιήσει τα μιτοχόνδρια τους. Σήμερα, ο μόνος ευκαρυωτικός οργανισμός που έχει βρεθεί να στερείται πλήρως μιτοχονδρίων είναι το *Monocercomonoides* (Karnkowska et al., 2016), ενώ μέχρι σήμερα, έχουν γίνει γνωστές περίπου 50 ασθένειες που οφείλονται σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Πρόκειται για τις Μιτοχονδριοπάθειες, οι οποίες συμπεριλαμβάνονται στα μεταβολικά νοσήματα.

1.2.1. Δομή

Το σχήμα των μιτοχονδρίων είναι επιμήκες, σφαιρικό ή ωοειδές. Περιβάλλονται από την εξωτερική και την εσωτερική μεμβράνη, οι οποίες αποτελούνται από διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων και διάφορες πρωτεΐνες (Alberts et al., 1994). Η εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων χαρακτηρίζεται από κυλινδρικό σχήμα και είναι λεία, ενώ στερείται

οξυσωμάτων. Περιέχει, ωστόσο, εξειδικευμένες πρωτεΐνες, τις πορίνες, οι οποίες επιτρέπουν τη διέλευση μεγάλων μορίων. Οι πορίνες σχηματίζουν κανάλια επιτρέποντας σε μόρια που δεν ξεπερνούν τα 5kDa να διαχυθούν από την μια πλευρά της μεμβράνης στην άλλη (Alberts et al., 1994). Πρωτεΐνες μεγαλύτερες των 5kDa μπορούν να εισαχθούν στο μιτοχόνδριο μόνο εάν μια σηματοδοτική αλληλουχία στο αμινοτελικό τους άκρο προσδεθεί σε ένα μεγάλο σύμπλοκο πρωτεϊνών, την τρανσλοκάση της εξωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Translocase of the Outer Membrane, TOM), το οποίο τις εισάγει μέσα στη μεμβράνη (Herrmann JM and Neupert W, 2000). Σε περίπτωση διάρρηξης της εξωτερικής μεμβράνης, οι πρωτεΐνες του διαμεμβρανικού χώρου μπορούν να διαχυθούν στο κυτοσόλιο γεγονός που θα οδηγούσε σε κυτταρικό θάνατο (Chipuk et al., 2006). Η μιτοχονδριακή εξωτερική μεμβράνη μπορεί να συνδεθεί με τη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (endoplasmic reticulum, ER), σε μια δομή που ονομάζεται MAM (Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes - σχετιζόμενη με μιτοχόνδρια ER-μεμβράνη). Αυτό είναι σημαντικό στη σηματοδότηση μέσω ασβεστίου και στη μεταφορά των λιπιδίων μεταξύ του ER και των μιτοχονδρίων (Hayashi et al., 2009). Σε αντίθεση με την εξωτερική μεμβράνη, η εσωτερική δε φέρει πορίνες κι ορισμένα μόνο μόρια μπορούν να μεταφερθούν διαμέσου αυτής. Σχεδόν όλα τα ιόντα και τα μόρια απαιτούν ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς για να εισέλθουν ή να εξέλθουν από τη μήτρα του μιτοχονδρίου. Οι πρωτεΐνες εισάγονται στη μήτρα μέσω του συμπλόκου της τρανσλοκάσης της εσωτερικής μεμβράνης (Translocase of the Inner Membrane, TIM) ή μέσω της Oxa1 (Oxidase Assembly Protein1) (Herrmann JM and Neupert W., 2000). Η εσωτερική μεμβράνη είναι αναδιπλωμένη, σχηματίζει πολυάριθμες δισκοειδείς ή δακτυλιοειδείς πτυχώσεις και φέρει οξυσώματα που αποτελούνται από πολυενζυμικά συστήματα τα οποία και ευθύνονται για τη οξειδωτική φωσφορυλίωση και την αναπνευστική αλυσίδα. Ο ενδιάμεσος χώρος μεταξύ των δύο μεμβρανών ονομάζεται διαμεμβρανικό διάστημα ή μεσομεμβρανικός χώρος του μιτοχονδρίου και περιέχει το υγρό, το οποίο χρησιμεύει στη λειτουργική επικοινωνία των δύο μεμβρανών. Ο χώρος που περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη ονομάζεται μήτρα ή στρώμα. Περιέχει το μιτοχονδριακό DNA, τα ριβοσώματα και τα πολυάριθμα ένζυμα που καταλύουν τις μεταβολικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο μιτοχόνδριο και διαφέρει σημαντικά από το κυτταρόπλασμα, από χημικής άποψης (**Εικόνα 1.3**).



Εικόνα 1.3: Αναλυτικότερη δομή ενός μιτοχονδρίου. Διακρίνονται η εσωτερική και η εξωτερική μεμβράνη, το στρώμα, οι ακρολοφίες, ο διαμεμβρανικός χώρος, το μιτοχονδριακό DNA, καθώς και τα ριβοσώματα και κοκκία του στρώματος (Πηγή commons.wikimedia.org).

1.2.2. Γονιδίωμα

Τα μιτοχόνδρια διαθέτουν δικό τους γονιδίωμα, το οποίο υπάρχει σε δύο έως δέκα αντίγραφα. Το DNA τους είναι κυκλικό, είναι τοποθετημένο στις εσοχές που δημιουργεί η εσωτερική μεμβράνη και διαθέτει έναν ανεξάρτητο κύκλο αναπαραγωγής με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ως ημιαυτόνομα οργανίδια. Κωδικοποιεί όμως, μόνο ένα μικρό υποσύνολο των πρωτεϊνών που χρειάζεται το μιτοχόνδριο για τη λειτουργία του (Aderson et al., 1981). Επίσης, υπάρχει ένα ολοκληρωμένο σύστημα έκφρασης των γονιδίων που περιλαμβάνει ριβοσώματα και άλλες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες γι' αυτή τη λειτουργία. Η είσοδος των πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός ειδικού σήματος από, συνήθως θετικά φορτισμένα, αμινοξικά κατάλοιπα και της κυτοσολικής συνοδού HSC70 (Heat shock cognate 71 kDa protein), η οποία αποτρέπει το πρώιμο δίπλωμα της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, προσδένεται στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο TOM κι έπειτα, στο σύμπλοκο TIM. Μόλις φτάσει στη μήτρα του μιτοχονδρίου, μια πεπτιδάση αφαιρεί το ειδικό σήμα διαλογής. Εάν όμως η πρωτεΐνη έχει στόχο να αγκυροβολήσει στις μεμβράνες του οργανιδίου, θα εμφανιστεί, μετά την αποκοπή του σήματος διαλογής, ένα άλλο ειδικό σήμα διαμεμβρανικής θέσης (Herrmann JM and Neupert W., 2000). Το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται μόνο από τη μητέρα (Kimball J.W., 2006) κι αυτό

συμβαίνει επειδή το μαστίγιο του σπερματοζωαρίου, το οποίο φέρει τη συντριπτική πλειονότητα των μιτοχονδρίων, δεν εισέρχεται στο ωάριο κατά τη γονιμοποίηση.

Το μιτοχονδριακό DNA του ανθρώπου περιλαμβάνει σχετικά λίγα γονίδια. Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που απαιτούνται για τη λειτουργία του οργανιδίου κωδικοποιείται από γονίδια του DNA του πυρήνα. Ωστόσο, σοβαρές ασθένειες οφείλονται σε παραλλαγές μιτοχονδριακών γονιδίων. Οι ασθένειες αυτές προκαλούν διάφορες μορφές μυϊκής δυστροφίας, αφού το μιτοχόνδριο, όπως αναφέρθηκε είναι το κέντρο παραγωγής ATP του κυττάρου. Τα μιτοχόνδρια είναι ημιавтоνόμα οργανίδια και διαθέτουν το δικό τους DNA, έτσι ώστε να μπορούν να αναπαράγονται χωρίς να χρειάζεται να διαιρεθεί το κύτταρο.

1.2.3. Προέλευση των μιτοχονδρίων

Η σχετική αυτοδυναμία των μιτοχονδρίων κάνει τους επιστήμονες να υποθέτουν πως τα μιτοχόνδρια προέρχονται από προκαρυωτικούς οργανισμούς, δηλαδή οργανισμούς χωρίς πυρήνα οι οποίοι ενσωματώθηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα συμβιώνοντας με αυτά. Το μιτοχονδριακό DNA παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με το DNA σύγχρονων βακτηρίων, των απογόνων των αρχέγονων προκαρυωτικών οργανισμών. επίσης, ο τρόπος πολλαπλασιασμού τους θυμίζει τη διαίρεση των βακτηρίων. Τέλος, το γεγονός ότι περιβάλλονται από διπλή μεμβράνη και συμμετέχουν ελάχιστα στη διακίνηση υλικών στο εσωτερικό του κυττάρου είναι το τρίτο σημείο που οδηγεί τους επιστήμονες στο να συγκλίνουν προς αυτή την υπόθεση.

1.2.4. Λειτουργία

Ο κύριος ρόλος των μιτοχονδρίων είναι η εξασφάλιση ενέργειας, μέσω της αναπνοής, και η ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού (Voet et al.,2006). Τα μιτοχόνδρια χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα για το μεταβολισμό των βιολογικών μακρομορίων που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί μέσω της τροφής. Συνεπώς, με τη βοήθεια των μιτοχονδρίων, τα κύτταρα διασπούν τους υδατάνθρακες και τα λίπη, συνθέτοντας μόρια ATP, μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η διαδικασία αυτή είναι αερόβια και συντελείται διαμέσου ενός πολύπλοκου διαμεμβρανικού ενζύμου που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και ονομάζεται ATP- συνθετάση.

Αρχικά, τα μόρια των τροφών, αφού διασπαστούν στα μονομερή τους, δηλαδή οι πολυσακχαρίτες σε μεμονωμένα σάκχαρα όπως η γλυκόζη, τα λίπη σε λιπαρά οξέα και οι πρωτεΐνες σε αμινοξέα, εισάγονται στα κύτταρα. Εκεί, τα λιπαρά οξέα εισάγονται κατευθείαν στα μιτοχόνδρια, ενώ τα σάκχαρα εισέρχονται σε μία ακολουθία δέκα

διαδοχικών αντιδράσεων, τη γλυκόλυση. Αποτέλεσμα της γλυκόλυσης είναι η παραγωγή ενός μορίου του πυροσταφυλικού, το οποίο εισάγεται στα μιτοχόνδρια, ενώ παράλληλα παράγονται μικρές ποσότητες ATP και ενός άλλου ενεργοποιημένου μορίου φορέα, του NADH (nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen). Εκεί, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται ενζυμικά σε ακέτυλο-συνένζυμο Α (ακέτυλο - CoA) και έτσι, ξεκινάει μια κυκλική αλληλουχία αντιδράσεων, ο κύκλος του κιτρικού οξέος (Voet et al., 2006).

1.2.4.1. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος

Το ακέτυλο-CoA που παράγεται τόσο από το πυροσταφυλικό όσο και από τα λιπαρά οξέα, προστίθεται στο οξαλοξικό οξύ και έτσι παράγεται το κιτρικό οξύ. Με αυτόν τον τρόπο ξεκινά ο κύκλος των οκτώ διαδοχικών αντιδράσεων που ξεκινά από το κιτρικό οξύ και καταλήγει επίσης στο κιτρικό οξύ. Παράλληλα, παράγονται τρία μόρια NADH, και ένα μόριο FADH₂ (Flavin Adenine Dinucleotide Hydrogen) και GTP (Guanosine-5'-triphosphate). Τα μόρια αυτά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ATP, του βασικού ενεργειακού νομίσματος του κυττάρου.

Καθεμιά από τις οκτώ αντιδράσεις καταλύεται από το δικό της ένζυμο (**Εικόνα 1.4**). Μόλις ολοκληρωθεί ο κύκλος, παράγεται οξαλοξικό οξύ και προκειμένου να ξεκινήσει πάλι η ίδια διαδικασία, γίνεται προσθήκη ενός νέου μορίου ακέτυλο-CoA. Όσον αφορά στα αμινοξέα που προσλαμβάνει το κύτταρο από την αποδόμηση των πρωτεϊνών της τροφής, το καθένα μπορεί να μετατραπεί ανάλογα με τη φύση του σε ένα από τα οκτώ ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου ή ακόμα και σε πυροσταφυλικό ή σε ακέτυλο-CoA. Ο κύκλος είναι γνωστός επίσης ως κύκλος του Κρεμπς (Stryer, 4^η έκδοση).

Ο βασικός ρόλος του μιτοχονδρίου είναι η παραγωγή ATP. Επομένως, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν τα υπόλοιπα ενεργοποιημένα μόρια – φορείς, που παράγονται κατά την διάρκεια του κύκλου, για να παραχθεί ATP. Το GTP παράγει εύκολα ATP μέσω της προσφοράς μιας εκ των τριών φωσφορικών ομάδων του στο ADP (Voet et al., 2006).

1.2.4.2. Χημειωσμωτική σύζευξη

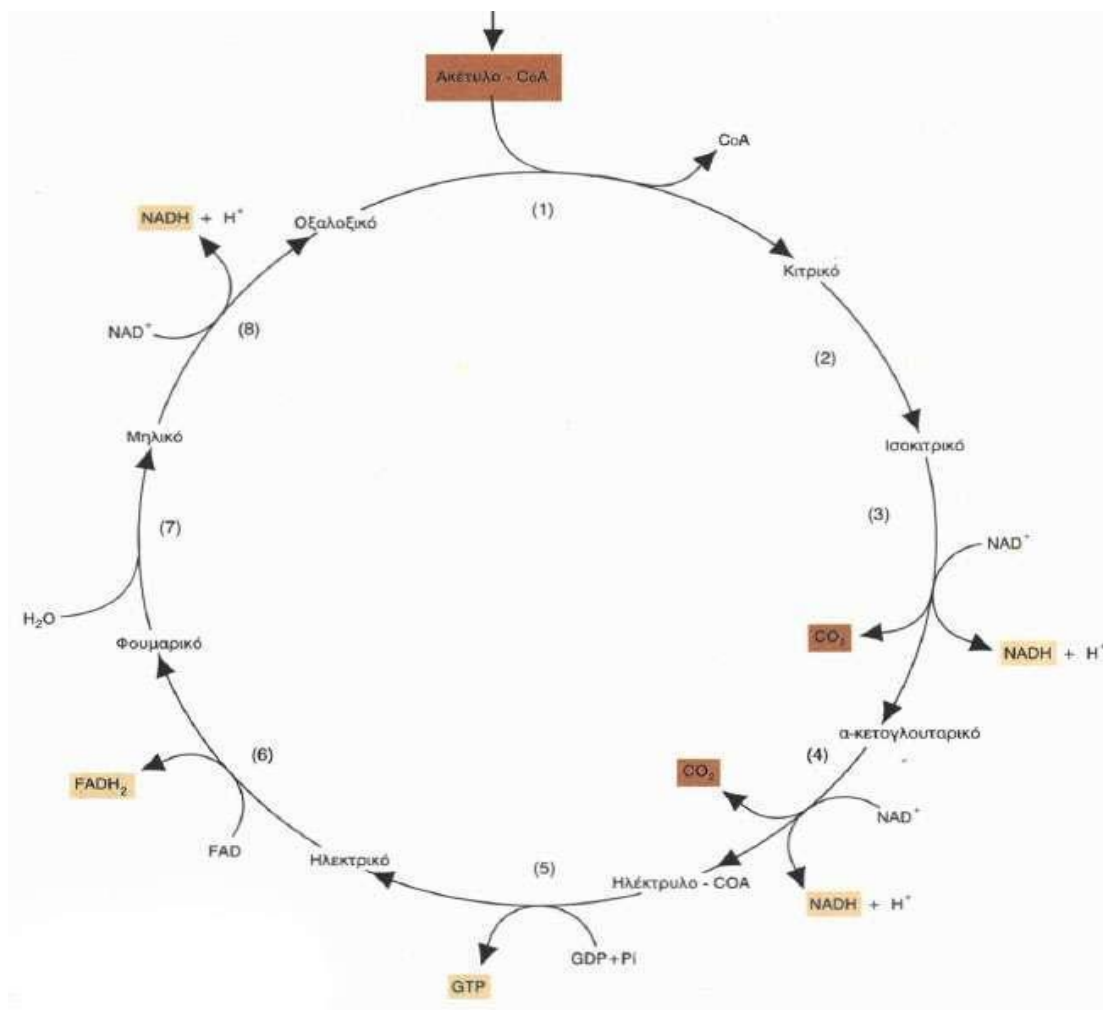
Το NADH και το FADH₂ λειτουργούν ως φορείς ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Αυτό, πρακτικά, σημαίνει ότι τείνουν να αποβάλλουν ένα ζεύγος δύο ηλεκτρονίων ώστε να μετατραπούν στην ανηγμένη μορφή τους, που χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη σταθερότητα. Αυτό, ακριβώς, το γεγονός εκμεταλλεύεται το κύτταρο για να προωθήσει την παραγωγή ATP. Μόλις αποβληθούν τα ηλεκτρόνια, εισάγονται σε μια αλυσίδα μορίων που το καθένα λειτουργεί διαδοχικά ως δέκτης και δότης ηλεκτρονίων. Η τάση μεταφοράς

οφείλεται στις διαδοχικά μικρότερες ενέργειες των ηλεκτρονίων κατά το πέρασμα τους από το ένα μόριο στο επόμενο.

Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, γνωστή και ως αναπνευστική αλυσίδα, είναι εγκατεστημένη στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Εκεί, βρίσκονται τρία διαμεμβρανικά σύμπλοκα ενζύμων, το σύμπλοκο αφυδρογονάσης του NADH, το σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων b-c₁ και το σύμπλοκο της οξειδάσης του κυτοχρώματος. Τα ηλεκτρόνια μετακινούνται διαδοχικά από το ένα σύμπλοκο στο επόμενο, καθοδηγούμενα από τις διαδοχικά χαμηλότερες ενέργειες τους. Η διαφορά ενέργειας αξιοποιείται για την άντληση πρωτονίων, δηλαδή κατιόντων υδρογόνου, από το στρώμα προς τον διαμεμβρανικό χώρο. Τελικός σταθμός των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αλυσίδας είναι το O₂ το οποίο προέρχεται από την αναπνοή. Τα ηλεκτρόνια ανάγουν το οξυγόνο και παράγεται νερό με τη βοήθεια του συμπλόκου της οξειδάσης του κυτοχρώματος. Έτσι, τα ηλεκτρόνια βρίσκονται στη χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη.

Η όλη διαδικασία απελευθερώνει την ενέργεια που απαιτείται για την άντληση των πρωτονίων. Επομένως, η συγκέντρωση πρωτονίων στο διαμεμβρανικό χώρο είναι περίπου δέκα φορές μεγαλύτερη σε σχέση με το στρώμα γι' αυτό και η διαδικασία της άντλησης απαιτεί ενέργεια και δεν είναι αυθόρμητη. Μόλις, λοιπόν, δοθεί η ευκαιρία, τα πρωτόνια τείνουν να εισέλθουν στο στρώμα. Αφού η συγκέντρωση πρωτονίων στο διαμεμβρανικό χώρο είναι πολύ μεγαλύτερη της εσωτερικής, τα πρωτόνια χρησιμοποιούν τη συνθετάση του ATP για να επανέλθουν, κινώντας τις υπομονάδες της πρωτεΐνης. Αυτή η αλλαγή διαμόρφωσης δίνει την ενέργεια που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στο ADP και να παραχθεί ATP (Stryer, 4^η έκδοση; Voet et al., 2006).

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας, που είναι γνωστή ως Χημειωσμωτική σύζευξη, τα σύμπλοκα ενζύμων αντλούν ξανά τα πρωτόνια προς τα έξω ώστε να συνεχίσει η λειτουργία της συνθετάσης του ATP. Το ATP παράγεται στο στρώμα αλλά στη συνέχεια, μεταφέρεται με τη βοήθεια πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα. Η διάσπαση του δεσμού υψηλής ενέργειας μεταξύ της δεύτερης και της τρίτης φωσφορικής ομάδας παρέχει την ενέργεια για να πραγματοποιηθεί σχεδόν κάθε αντίδραση του κυττάρου που δεν είναι ενεργειακά ευνοϊκή.



Εικόνα 1.5: Κύκλος του Κρέμψ και η οξειδωτική φωσφορυλίωση (Πηγή: <http://respirationresource.weebly.com/krebs-cycle.html>)

1.2.4.3. Επιπρόσθετες λειτουργίες των μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε πολλές άλλες μεταβολικές εργασίες, όπως την κυτταρική σηματοδότηση (Li et al., 2013), τη ρύθμιση του δυναμικού της μεμβράνης (Voet., 2006), την απόπτωση-προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Green DR., 1998), την σηματοδότηση ασβεστίου (Hajnóczky et al., 2006), τη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού (McBride et al., 2006), ορισμένες αντιδράσεις σύνθεσης αίμης (Oh-hama T., 1997), τη σύνθεση στεροειδών (Rossier MF., 2006) και την ορμονική σηματοδότηση (Klinge and Carolyn., 2008). Τα μιτοχόνδρια, επίσης, ανταποκρίνονται σε ορμόνες κυρίως μέσω της δράσης των μιτοχονδριακών υποδοχέων οιστρογόνων (mtERs). Διάφοροι τύποι ιστών και κυττάρων έχουν αυτούς τους υποδοχείς, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου (Alvarez-Delgado., 2010) και της καρδιάς (Pavon Natalia., 2012).

Ορισμένες μιτοχονδριακές λειτουργίες εκτελούνται μόνο σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων. Για παράδειγμα, τα μιτοχόνδρια στα ηπατικά κύτταρα περιέχουν ένζυμα που τους επιτρέπουν να αποτοξινώνουν την αμμωνία, ένα απόβλητο προϊόν του μεταβολισμού των πρωτεϊνών. Μια παραλλαγή στα γονίδια που ρυθμίζουν κάποια από τις αναφερθείσες μιτοχονδριακές λειτουργίες μπορεί να οδηγήσει σε μιτοχονδριακές ασθένειες.

1.3. PGC-1 α - Spargel

Η οικογένεια ρυθμιζόμενων συνενεργοποιητών PGC-1 (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator), που αποτελείται από τους παράγοντες PGC-1 α , PGC-1 β και PRC, παίζει κεντρικό ρόλο στο ρυθμιστικό δίκτυο που διέπει το μεταγραφικό έλεγχο της μιτοχονδριακής βιογένεσης και της αναπνευστικής λειτουργίας. Αυτοί οι συνενεργοποιητές στοχεύουν πολλαπλούς μεταγραφικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των NRF-1 (Nuclear respiratory factor 1), NRF-2 και του υποδοχέα ERR α (Estrogen-related receptor alpha). Επιπλέον, οι ίδιοι είναι στόχοι συμπλεγμάτων συνενεργοποιητών και συν-καταστολέων που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων μέσω της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Η έκφραση των μελών της οικογένειας PGC-1 ρυθμίζεται από εξωκυττάρια σήματα που ελέγχουν το μεταβολισμό, τη διαφοροποίηση ή την κυτταρική ανάπτυξη και σε ορισμένες περιπτώσεις οι δραστηριότητές τους είναι γνωστό ότι ρυθμίζονται από μετα-μεταφραστική τροποποίηση από τους αισθητήρες ενέργειας, οι 5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη — ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση, AMPK (AMP-activated protein kinase) και SIRT1 (Sirtuin 1). Πρόσφατες μελέτες, που χρησιμοποίησαν knock-out ή αποσιώπηση γονιδίων (gene silencing) της οικογένειας PGC-1, έδειξαν ότι η λειτουργία αυτών των παραγόντων δεν εμπλέκεται αποκλειστικά στη μιτοχονδριακή βιογένεση, παρόλα αυτά η οικογένεια PGC-1 κατέχει κεντρικό ρόλο στη μιτοχονδριακή βιογένεση και στην παραγωγή ενέργειας, διαδικασίες οι οποίες συνδέονται με διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες.

Το γονίδιο *PGC-1 α* ανήκει στην οικογένεια PGC-1 και δρα ως συνενεργοποιητής (transcription coactivator) που παίζει κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού του κυττάρου. Ενεργοποιείται από την έκθεση στο κρύο, συνδέοντας αυτό το περιβαλλοντικό ερέθισμα με την προσαρμοστική θερμογένεση. Ο παράγοντας PGC-1 α επάγει τη μιτοχονδριακή βιογένεση και προάγει την αναδιαμόρφωση του μυϊκού ιστού, καθιστώντας τον μεταβολικά πιο οξειδωτικό και λιγότερο γλυκολυτικό, και συμμετέχει στη ρύθμιση του μεταβολισμού τόσο των υδατανθράκων όσο και των λιπιδίων. Συνεπώς ο PGC-1 α μπορεί να κατέχει σημαντικό ρόλο σε διαταραχές όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης και η μυοκαρδιοπάθεια. Πιο συγκεκριμένα, λόγω του ρυθμιστικού του ρόλου στο μεταβολισμό

των λιπιδίων, η χρήση φαρμακευτικών μορίων που στοχεύουν τον συγκεκριμένο παράγοντα μπορούν να αποδειχθούν αποτελεσματικοί για τη θεραπεία της παχυσαρκίας και του διαβήτη τύπου 2 (Liang, 2006). Έχει επίσης βρεθεί ότι αλλαγές στη λειτουργικότητα του PGC-1α μπορούν να επηρεάζουν καταστάσεις όπως ο καρκίνος του νεφρού, οξεία νεφρική βλάβη και χρόνια νεφρική νόσος, καθώς ο PGC-1α εμπλέκεται στη φυσιολογική ανάπτυξη των νεφρών.

Στο γονιδίωμα της *Drosophila* υπάρχει μόνο ένα ομόλογο του *PGC-1*, το οποίο ονομάζεται *spargel* (*srl*) και έχει βρεθεί ότι λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο όσον αφορά τη βιογένεση. Η λειτουργία του *spargel* έχει εμπλακεί στην επαγωγή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και στη μεταγραφική ρύθμιση του μονοπατιού της ινσουλίνης, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που κωδικοποιούν για μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Επιπλέον, το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης επάγει την έκφραση του γονιδίου *spargel* και ο παράγοντας *spargel* ενεργοποιεί ένα βρόχο αρνητικής ανάδρασης στο συγκεκριμένο μονοπάτι. Συνεπώς, ο ρόλος του *spargel* είναι ιδιαίτερα σημαντικός στη ρύθμιση παροχής θρεπτικών στα μιτοχόνδρια και γενικότερα στο μεταβολισμό του κυττάρου (Tiefenböck, 2010).

1.4. Μετφορμίνη

Η μετφορμίνη είναι ένα διγουανίδιο με αντι-υπεργλυκαιμικές ιδιότητες και είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φάρμακα για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 (Type 2 diabetes, T2D) για περισσότερα από 60 χρόνια (Bailey CJ, 2017). Η γουανιδίνη βρέθηκε να έχει αντιδιαβητικές ιδιότητες σε ζώα το 1918, αλλά δυστυχώς, ήταν τοξική σε κλινικές δοκιμές (Duncan LJ, 1965). Αυτό ώθησε τους επιστήμονες να βρουν ασφαλέστερα υποκατάστατα. Στη δεκαετία του 1920, συντέθηκε η μετφορμίνη (υδροχλωρικό 1,1-διμεθυλδιγουανίδιο) κι έκτοτε, αποτέλεσε την πρώτη επιλογή για τη θεραπεία του T2D λόγω της αξιοσημείωτης ικανότητάς της να μειώνει τα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα (Witters LA, 2001; Papanagnou P, 2016; Blonde L, 2018). Μελέτες έδειξαν ότι η μετφορμίνη ασκεί ισχυρή επίδραση σε πολλούς καρκίνους (Gandini S, 2014), σε καρδιαγγειακές παθήσεις (Cardiovascular diseases, CVDs) (Lamanna C, 2011), σε ηπατικές παθήσεις (Bhat A, 2015), στην παχυσαρκία (Breining P, 2018), σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Patrone C, 2014) και σε νεφρικές παθήσεις (Neven E, 2018). Η αποκλειστική φαρμακευτική αγωγή ή η συνδυαστική θεραπεία με άλλα φάρμακα έχει αποδειχθεί αποτελεσματική για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών.

Η μετορμίνη αναστέλλει το μιτοχονδριακό σύμπλεγμα I (Batandier C., 2006; Viollet B, 2012), το οποίο οδηγεί σε ενεργοποίηση της κινάσης AMPK (Zhou G, 2001). Το μιτοχονδριακό σύμπλεγμα I είναι ζωτικής σημασίας για τη μεταφορά ηλεκτρονίων. Ως αποτέλεσμα, η παραγωγή του ATP μειώνεται και η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του ADP αυξάνεται. Κατά συνέπεια, τα κυτταρικά επίπεδα της μονοφωσφορικής αδενοσίνης, AMP (Adenosine monophosphate) αυξάνονται, ενεργοποιώντας τελικά την κινάση AMPK (Pryor R, 2015). Επιπλέον, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η μετορμίνη θα μπορούσε να ενεργοποιήσει την AMPK μέσω του λυσοσωμικού μονοπατιού, πιο συγκεκριμένα του μονοπατιού AXIN/LKB1-v-ATPase-Regulator (Zhang CS, 2016). Η AMPK είναι ένας βασικός ρυθμιστής πολλών μεταβολικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού της γλυκόζης, του μεταβολισμού των λιπιδίων και της ενεργειακής ομοιόστασης (Zhang CS, 2012). Επιπλέον, η μετορμίνη μπορεί να αλλάζει τη μεταβολική ομοιόσταση αναστέλλοντας τη σηματοδότηση της ινσουλίνης και του υποδοχέα IGF (Martin M, 2012). Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η μετορμίνη μπορεί να αλλάζει τα επίπεδα πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού, της γήρανσης και του καρκίνου (Stynen B, 2018). Οι υποκείμενοι μηχανισμοί της μετορμίνης στη ρύθμιση των ασθενειών, ωστόσο, δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητοί, για αυτό και χρειάζονται περαιτέρω μελέτες.

1.5. Κυτταρικά μονοπάτια πρωτεόλυσης

Τα κύρια πρωτεολυτικά μονοπάτια του κυττάρου, δηλαδή το μονοπάτι λυσοσώματος-αυτοφαγίας και το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, συμμετέχουν στην απομάκρυνση οξειδωμένων και μη λειτουργικών πρωτεϊνών ή οργανιδίων, τα οποία δεν μπορούν να επιδιορθωθούν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Σύμφωνα με πολυάριθμες μελέτες, τα συγκεκριμένα πρωτεολυτικά μονοπάτια εμπλέκονται στη διαδικασία της γήρανσης λόγω αλλαγών στην ενεργότητά τους και ρύθμισης της μακροβιότητας (Kirkin et al., 2009; Knecht et al., 2009).

1.5.1. Μονοπάτι λυσοσώματος-αυτοφαγίας

1.5.1.1. Λυσοσώματα

Τα λυσοσώματα είναι κυτταρικά οργανίδια που περιβάλλονται από μονή μεμβράνη και εμπεριέχουν μια σειρά πρωτεολυτικών ενζύμων με κύρια λειτουργία την αποικοδόμηση οξειδωμένων και μη λειτουργικών πρωτεϊνών, καθώς επίσης και ενδοκυτταρικών συστατικών, όπως οργανίδια και πρωτεϊνικά συσσωματώματα (aggregates). Οι υδρολάσες

είναι μια οικογένεια πενήντα περίπου πεπτιδικών ενζύμων που εντοπίζονται στην κοιλότητα του λυσοσώματος και ο ρόλος τους είναι η αποικοδόμηση του φορτίου που παραλαμβάνουν. Στο λυσόσωμα ανήκουν, επίσης, και τα μεμβρανικά ένζυμα, τα οποία απομακρύνουν τα προϊόντα της αποικοδόμησης προς το κυτοσόλιο και διατηρούν χαμηλό το pH στο εσωτερικό του οργανιδίου (De Duve, 1983).

Η λήψη, από το λυσόσωμα, των εσωτερικών και εξωτερικών υλικών προς αποικοδόμηση μπορεί να πραγματοποιηθεί από διάφορα μονοπάτια (Cuervo and Dice, 1998), όπως της ενδοκύττωσης, όπου οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες ενδοκυτταρώνονται ολοκληρωτικά από τη μεμβράνη του κυττάρου και παραμένουν στα ενδοσώματα μέχρι να συγχωνευτούν με τα λυσοσώματα, της κρινοφαγίας, όπου οι εκκριτικές πρωτεΐνες περικλείονται σε εκκριτικά κυστίδια που προέρχονται από το σύμπλεγμα Golgi και συγχωνεύονται με τα λυσοσώματα και της αυτοφαγίας, όπου κυτταροπλασματικά συστατικά περιβάλλονται από κυστίδια με διπλή μεμβράνη και αποικοδομούνται μέσω του λυσοσωμικού μονοπατιού.

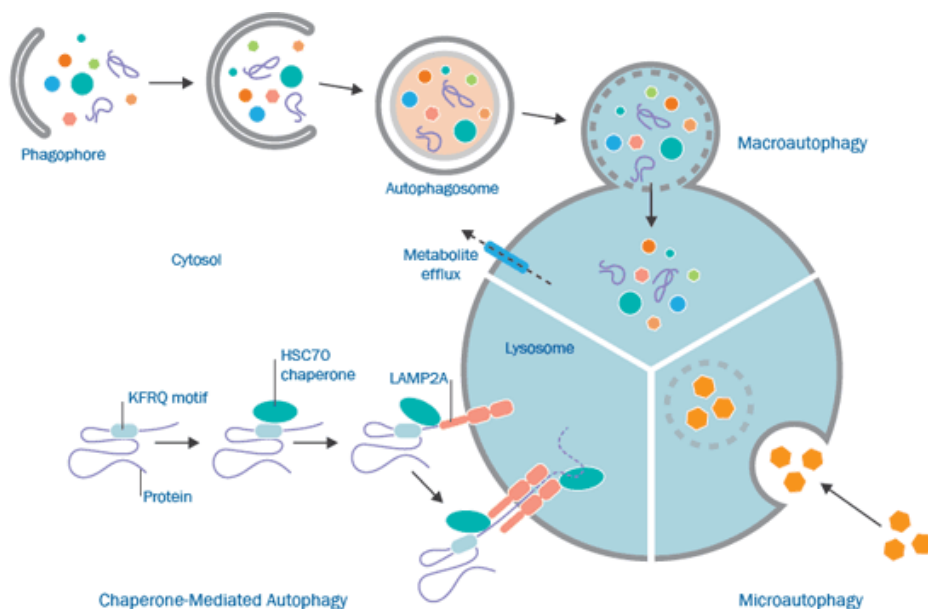
1.5.1.2. Γήρανση και λυσοσώματα

Η αύξηση της ηλικίας συνεπάγεται και αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων μη λειτουργικών πρωτεϊνών, σύμφωνα με μελέτες σε διάφορους οργανισμούς. Η λιποφουσκίνη αποτελεί έναν από τους βασικούς βιοδείκτες γήρανσης, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (Jung et al., 2007). Κατά τη γήρανση, ένα από τα χαρακτηριστικά των λυσοσωμάτων αποτελούν τα αυξημένα επίπεδα λιποφουσκίνης, τα οποία περιορίζουν την ικανότητα του οργανιδίου να αποικοδομεί μη λειτουργικούς και οξειδωμένους παραγόντες, με αποτέλεσμα την υπερσυσσώρευσή τους. Επιπλέον, μειώνεται η δυνατότητα σύντηξης των λυσοσωμάτων με δομές του αυτοφαγοσώματος λόγω της παρουσίας λιποφουσκίνης (Terman et al., 2007).

1.5.1.3. Αυτοφαγία

Η αυτοφαγία αποτελεί την ιδιότητα των κυττάρων να αποικοδομούν το κυτταροπλασματικό υλικό τους μέσω των λυσοσωμάτων. Είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση ισορροπίας μεταξύ της σύνθεσης και αποικοδόμησης των κυτταρικών συστατικών, συμβάλλοντας στην κυτταρική ανάπτυξη και τη διατήρηση της ομοιοδυναμικής του. Μέσω αυτοφαγίας μπορούν να αποικοδομηθούν ολόκληρα μη λειτουργικά οργανίδια, ολόκληροι οργανισμοί και δομές, καθώς και διάφορα βιομόρια. Πρόκειται για μια εξελικτικά συντηρημένη διαδικασία που αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η αυτοφαγία διακρίνεται σε τρεις τύπους, τη μακροαυτοφαγία, τη μικροαυτοφαγία και την αυτοφαγία μέσω μοριακών

συνοδών (Chaperone-Mediated Autophagy, CMA) (Εικόνα 5). Κοινό χαρακτηριστικό και των τριών τύπων αυτοφαγίας (Εικόνα 1.5) αποτελεί η τελική αποικοδόμηση των κυτταρικών συστατικών μέσω του λυσοσώματος (Cuervo, 2004).



Εικόνα 1.6: Τύποι αυτοφαγίας (Oh and Lee, 2012).

1.5.2. Σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος

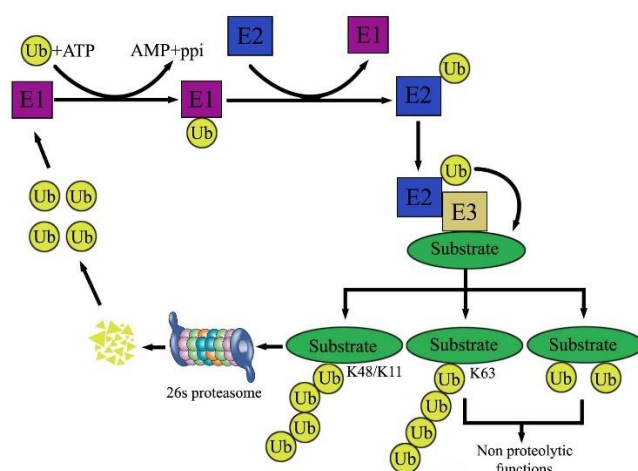
Το πρωτεάσωμα είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση οξειδωμένων και μη λειτουργικών πρωτεϊνών, καθώς και πρωτεϊνών με μικρή διάρκεια ζωής. Το σύστημα ουβικιτίνης - πρωτεασώματος (Ubiquitin Proteasome System, UPS) συγκροτείται από την ουβικιτίνη, το πρωτεάσωμα και ένζυμα που συμβάλλουν στην πρόσδεση της ουβικιτίνης στους πρωτεϊνικούς στόχους. Πρόκειται για ένα σύστημα που εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως η σηματοδότηση, ο μεταβολισμός και η ανάπτυξη. Η πρωτεόλυση περιλαμβάνει τη στόχευση της πρωτεΐνης από την ουβικιτίνη και την τελική αποικοδόμηση από το σύμπλοκο του πρωτεασώματος (Trouwakos et al., 2013).

1.5.2.1. Η ουβικιτίνη

Η ουβικιτίνη είναι ένα πεπτίδιο μικρού μεγέθους (76 αμινοξέα, 8.5 kDa), το οποίο συνδέεται ομοιοπολικά σε πρωτεΐνες-στόχους ως μονομερές ή μέσω της αλυσίδας πολύ-ουβικιτίνης. Μέσω του μηχανισμού αυτού, οι πρωτεΐνες αποτελούν υπόστρωμα αποικοδόμησης από τα τρία ένζυμα του συστήματος της ουβικιτινώσης (Εικόνα 1.6). Πρόκειται για μια εξαιρετικά συντηρημένη πρωτεΐνη μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών. Φέρει επτά κατάλοιπα Lys μέσω των οποίων συνδέεται και σχηματίζει διαφορετικές αλυσίδες. Επιπλέον, είναι δυνατή

η σύνδεση της αμινοτελικής μεθειονίνης μιας ουβικιτίνης με το καρβοξυτελικό άκρο μιας άλλης. Η ουβικιτινίωση είναι μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση που περιλαμβάνει την προσθήκη ενός ή περισσότερων μορίων ουβικιτίνης σε κατάλοιπα Lys της πρωτεΐνης -στόχου. Η προσθήκη του μορίου ουβικιτίνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πορεία της πρωτεΐνης-στόχου, καθώς μπορεί να την οδηγήσει σε πρωτεασωματική αποικοδόμηση, να επηρεάσει τη θέση ή ενεργότητα της, καθώς και τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της. Καθοριστικό ρόλο στην πορεία που θα ακολουθήσει η πρωτεΐνη που υφίσταται ουβικιτινίωση παίζει ο αριθμός των αλυσίδων ουβικιτίνης που φέρει. Η προσθήκη ενός μορίου ουβικιτίνης εμπλέκεται στη ρύθμιση ιστονών, στην ενδοκύττωση και την εκβλάστηση ρετροϊών από την πλασματική μεμβράνη. Αντιθέτως, υποστρώματα που πρόκειται να αποικοδομηθούν από το πρωτεάσωμα φέρουν αλυσίδες πολυουβικιτίνης (Ikeda et al., 2010).

Αρχικά, το ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικιτίνης E1 (ubiquitin-activating enzyme) συνδέεται με την ουβικιτίνη, μέσω υδρόλυσης ATP, με θειολεστερικό δεσμό υψηλής ενέργειας ανάμεσα σε ένα κατάλοιπο Cys και στο καρβοξυτελικό κατάλοιπο Gly της ουβικιτίνης. Ακολουθεί η μεταφορά της ενεργοποιημένης ουβικιτίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου σύζευξης της ουβικιτίνης E2 (ubiquitin-conjugating enzyme). Τέλος, οι E3 λιγάσες της ουβικιτίνης (ubiquitin-ligase) συνδέουν την καρβοξυλική ομάδα του καρβοξυτελικού άκρου του καταλοίπου Gly της ουβικιτίνης με την ε-αμινομάδα μιας Lys του υποστρώματος της πρωτεΐνης-στόχου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ισοπεπτιδικού δεσμού μεταξύ ουβικιτίνης και υποστρώματος (Park et al., 2020).



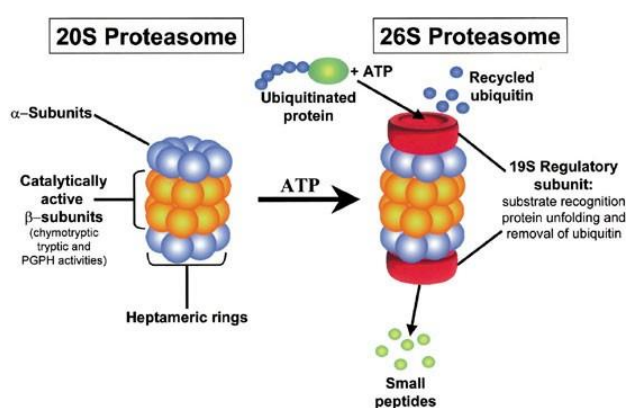
Εικόνα 1.7: Πρωτεϊνική αποικοδόμηση μέσω του συστήματος ουβικιτίνης - πρωτεασώματος (Gong et al., 2015).

Η αποδέσμευση της ουβικιτίνης από τις πρωτεΐνες-στόχους διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο για την αποικοδόμηση τους, καθώς και για τη βιοσύνθεση της ουβικιτίνης. Η διαδικασία

αυτή επιτελείται από τα ένζυμα από-ουβικιτινίωσης (deubiquitinating enzymes, DUBs), τα οποία καταλύουν την υδρόλυση μικρών αμιδίων και εστέρων στο καρβοξυτελικό άκρο της ουβικιτίνης. Με τον τρόπο αυτό, συμβάλλουν στη διαδικασία επεξεργασίας των ανενεργών ουβικιτινών, στην αποκατάσταση του συμπλέγματος ουβικιτίνης-πρωτεΐνης, στην απομάκρυνση της ουβικιτίνης από τις πρωτεΐνες και στην απομάκρυνση ανασταλτικών αλυσίδων ουβικιτίνης από το 26S πρωτεάσωμα (Amerik and Hochstrasser, 2004).

1.5.2.2. Το πρωτεάσωμα

Το πρωτεάσωμα είναι ένα μεγάλο και πολύπλοκο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα μοριακού βάρους της τάξης των 2.5 MDa, το οποίο επηρεάζει σημαντικά την κυτταρική ομοιοδυναμική και την πρωτεϊνική αποικοδόμηση σε διάφορους οργανισμούς. Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από το 20S καταλυτικό κέντρο και ένα ή δύο 19S ρυθμιστικά μόρια, που συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο (**Εικόνα 1.7**). Οι ουβικιτινωμένες πρωτεΐνες μικρής διάρκειας ζωής αποικοδομούνται από το 26S πρωτεάσωμα, ενώ το 20S πρωτεάσωμα αποικοδομεί οξειδωμένες και μη αναδιπλωμένες ή λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες και πεπτίδια (Tsakiri and Trougakos, 2015).



Εικόνα 1.8: Η δομή του 20S και 26S πρωτεασώματος (Almond and Cohen, 2002).

Το 20S καταλυτικό σύμπλοκο του πρωτεασώματος των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι μια κυλινδρική δομή που συγκροτείται από 28 α-τύπου και β-τύπου υπομονάδες οργανωμένες σε τέσσερις δακτυλίους. Οι εσωτερικοί δακτύλιοι αποτελούνται από τις β καταλυτικές υπομονάδες (β₁-β₇) και οι εξωτερικοί από α ρυθμιστικές υπομονάδες (α₁-α₇) (Groll et al., 1997; Jung et al., 2009). Στα αμινοτελικά άκρα των β υπομονάδων εντοπίζονται τα ενεργά κέντρα των τριών βασικών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων: της κασπάσης (LLE), της θρυψίνης (LRR) και της χυμοθρυψίνης (LLVY). Η β₁ υπομονάδα αποτελεί το ενεργό κέντρο της ενεργότητας της κασπάσης, η β₂ της θρυψίνης και η β₅ της χυμοθρυψίνης. Η πρωτεασωμική ενεργότητα κασπάσης πρωτολύνει έπειτα από όξινα αμινοξικά κατάλοιπα, η

ενεργότητα θρυψίνης έπεται από βασικά κατάλοιπα και η ενεργότητα χυμοθρυψίνης έπεται από υδρόφοβα κατάλοιπα (Arendt and Hochstrasser, 1997). Οι α υπομονάδες δε διαθέτουν πρωτεολυτική ενεργότητα και αποτελούν ρυθμιστικές υπομονάδες, καθώς ελέγχουν την είσοδο των μη διπλωμένων από-ουβικιτινιωμένων πολυπεπτιδίων στο κεντρικό πρωτεολυτικό σύμπλοκο (Kunjappu and Hochstrasser, 2014).

Η συναρμολόγηση του 20S αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει τη συμβολή μοριακών συνοδών και την ωρίμανση των β υπομονάδων (Kunjappu and Hochstrasser, 2014). Το αρχικό στάδιο είναι ο σχηματισμός των δακτυλίων που αποτελούνται από α υπομονάδες, με τη βοήθεια μοριακών συνοδών. Ακολουθεί ο σχηματισμός του β δακτυλίου με την προσθήκη της β2 υπομονάδας. Η σωστή είσοδος των β υπομονάδων στο δακτύλιο ελέγχεται από τα αμινοτελικά προπεπτίδια και τα καρβοξυτελικά άκρα. Οι β υπομονάδες φέρουν μια μοναδική αλληλουχία που τους επιτρέπει να αλληλεπιδρούν με τη γειτονική τους υπομονάδα μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων. Ο ημιτελής β δακτύλιος ολοκληρώνεται με την ενσωμάτωση των β1 και β7 υπομονάδων (Hirano et al., 2008). Η τελική δομή α-β-β-α του 20S πρωτεασώματος σχηματίζεται με τη ένωση των α-β και β-α μέσω της διαμεσολάβησης των καρβοξυτελικών άκρων των β7 υπομονάδων και των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων του β δακτυλίου. Στο τελικό στάδιο, η συναρμολόγηση του 20S ολοκληρώνεται με την αυτόλυση των προπεπτιδίων των β υπομονάδων. Η πύλη του 20S πρωτεασώματος παραμένει κλειστή από τα αμινοτελικά άκρα των α υπομονάδων και ανοίγει μέσω της πρόσδεσης του 19S ρυθμιστικού τμήματος (Groll et al., 1997, 2000).

Το 19S ρυθμιστικό σωματίδιο αναγνωρίζει τους πρωτεϊνικούς στόχους που έχουν σημαθεί με ουβικιτίνη και τις μεταφέρει στο εσωτερικό το 20S πρωτεασώματος προς αποικοδόμηση. Συγκροτείται από 19 υπομονάδες που οργανώνονται σε δύο υποσύμπλοκα, τη βάση και το κάλυμμα. Η βάση αποτελείται από έξι υπομονάδες με δράση ATPάσης τύπου AAA (Rpt1-6) και τα ρυθμιστικά μόρια Rpn1, Rpn2 και Rpn13. Το κάλυμμα αποτελείται από εννέα υπομονάδες που δεν ανήκουν στις ATPάσες, με διακριτή αλληλουχία, δομή και λειτουργία (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12, Rpn15). Το 19S ρυθμιστικό σωματίδιο σχηματίζεται από την ένωση της βάσης με το κάλυμμα μέσω του παράγοντα Rpn10. Οι υπομονάδες Rpn10 και Rpn13 λειτουργούν ως υποδοχείς ουβικιτίνης, ενώ η υπομονάδα Rpn11 διαθέτει ενεργότητα από-ουβικιτινάσης. Αντιθέτως, ο ATP-ανεξάρτητος πρωτεολυτικός μηχανισμός λειτουργεί χωρίς την παρουσία ουβικιτίνης και συμμετέχει στην αποικοδόμηση οξειδωμένων παραγόντων (Glickman et al., 1998; Mao, 2021).

Τα πρωτεασωματικά γονίδια ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες Nrf1 (NF-E2-related factor-1) και Nrf2 (NF-E2-related factor-2) υπό την επίδραση στρες, όπως προκύπτει από *in vitro* μελέτες. Οι Nrf1 και Nrf2 κατατάσσονται στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων CNC-bZIP (cap-n-collar basic leucine zipper), οι οποίοι, παρουσία διαφόρων ειδών οξειδωτικού στρες, μπορούν να ρυθμίσουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω πρόσδεσης στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης ARE (Antioxidant Response Elements) στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων, μεταξύ των οποίων και τα πρωτεασωματικά γονίδια (Sykiotis and Bohmann, 2010). Σύμφωνα με *in vitro* μελέτες σε κύτταρα θηλαστικών, μερική αναστολή του πρωτεασώματος οδηγεί σε πρόσδεση του Nrf1 στους υποκινητές των πρωτεασωματικών γονιδίων και κατ' επέκταση ρύθμιση τους (Radhakrishnan et al., 2010). Κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες, η ρύθμιση και του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 είναι ιδιαίτερα αυξημένη και συγκεκριμένα, αποσυνδέεται από τον αρνητικό ρυθμιστή του Kead1 και μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου επάγει την έκφραση των πρωτεασωματικών γονιδίων (Grimberg et al., 2011).

Η ρύθμιση του πρωτεασώματος εμφανίζεται ιστοειδικό χαρακτήρα. Μελέτες στη *Drosophila melanogaster* έδειξαν διαφορετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και της ενεργότητας σε ωοθήκες και σωματικούς ιστούς. Ωστόσο, διαφορές στη ρύθμιση του πρωτεασώματος παρατηρούνται τόσο ανάμεσα σε διαφορετικά είδη, όσο και από άτομο σε άτομο. Συγκεκριμένα, διαφορετικά έντομα *Drosophila melanogaster* εμφάνιζαν διαφορετική πρωτεασωματική ενεργότητα (Fredriksson et al., 2012; Hansen et al., 2012).

1.5.2.3. Γήρανση και το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος

Σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, η πρωτεασωματική ενεργότητα ελαττώνεται κατά τη διαδικασία γήρανσης των κυττάρων. Συγκεκριμένα, μελέτη σε γηρασμένα κύτταρα ανθρώπου έδειξε ότι η έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας του 20S πρωτεασώματος και της υπομονάδας του 19S ρυθμιστικού μορίου μειώθηκε, γεγονός που σχετίζεται με την ελαττωμένη πρωτεασωματική ενεργότητα και την αυξημένη παρουσία πρωτεϊνών που έχουν υποστεί οξείδωση ή ουβικιτινίωση. Επιπλέον, η μελέτη της πρωτεασωματικής ενεργότητας σε ηλικιωμένα άτομα έδειξε ότι υπάρχουν απροσδόκητα παρόμοια επίπεδα με αυτά των νεαρών ατόμων (Chondrogianni et al., 2003). Ακόμη, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη *Drosophila melanogaster* δείχνουν ότι, κατά τη διάρκεια της γήρανσης, η ενεργότητα του πρωτεασώματος μειώνεται και η συγκέντρωση των ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών αυξάνεται. Επομένως, η ελάττωση της πρωτεασωματικής ενεργότητας, κατά τη γήρανση, σχετίζεται με τη μειορρύθμιση του πρωτεασώματος (Vernace et al., 2007).

Σύμφωνα με *in vitro* μελέτες, οι ROS μπορούν να αναστείλουν τη πρωτεασωματική ενεργότητα, ενώ η συσσώρευση τους, λόγω της γήρανσης, μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική δυσλειτουργία του πρωτεασώματος, είτε άμεσα, μέσω τροποποίησης των πρωτεασωματικών υπομονάδων, είτε έμμεσα, μέσω τροποποίησης λιπιδίων και πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να αποικοδομηθούν και επομένως να συσσωρευθούν (Reinheckel et al., 1998). Τα συγκεκριμένα τροποποιημένα λιπίδια και πρωτεΐνες απαντώνται κυρίως σε μεταμιτωτικά κύτταρα, όπως οι νευρώνες, που παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στην παρουσία αυτών των συσσωματωμάτων (aggregates), επηρεάζοντας διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου, ανάμεσα στα οποία και το πρωτεολυτικό μονοπάτι (Grune et al., 1997).

Η μειωμένη λειτουργία του πρωτεασώματος σχετίζεται, επίσης, με ασθένειες του γήρατος όπου παρατηρείται μειωμένη πρωτεασωματική ενεργότητα, όπως η νόσος του Parkinson και η νόσος του Alzheimer. Κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης, η πρωτεασωματική έκφραση και ενεργότητα είναι σημαντικά αυξημένες. Η αυξορρύθμιση του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος σε διάφορους τύπους καρκίνου μπορεί να συνδέεται με τις προσπάθειες των καρκινικών κυττάρων να προσαρμοστούν σε μια κατάσταση υψηλού πρωτεοτοξικού στρες. Συνεπώς, το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος αποτελεί σημαντικό στόχο για την ανάπτυξη φαρμακευτικών προσεγγίσεων με αντικαρκινική δράση (Takalo et al., 2013; Trougakos et al., 2013).

1.6. *Drosophila melanogaster*

1.6.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, χρησιμοποιήθηκε ως οργανισμός-μοντέλο το έντομο *Drosophila melanogaster*, το οποίο ταξινομείται συστηματικά ως εξής:

Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Αρθρόποδα
Κλάση	Έντομα
Υπέρταξη	Ολομετάβολα
Τάξη	Δίπτερα
Οικογένεια	Drosophilidae
Γένος	<i>Drosophila</i>
Είδος	<i>melanogaster</i>

Πίνακας 1.1: Συστηματική ταξινόμηση της *Drosophila melanogaster*.

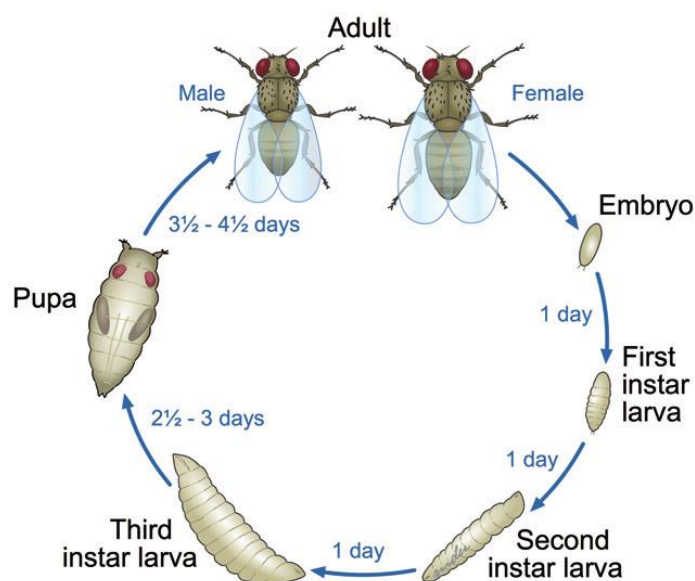
Πρόκειται για ένα φυτοφάγο έντομο με μυζητικά στοματικά εξαρτήματα. Το συγκεκριμένο είδος είναι γνωστό και ως μύγα των φρούτων ή μύγα του ξυδιού ή μύγα του κρασιού. Η *Drosophila melanogaster* έχει διάρκεια ζωής που κυμαίνεται από 40-120 μέρες, που καθορίζεται από τη διατροφή και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το γονιδίωμα της αποτελείται πάνω από 15.000 γονίδια οργανωμένα σε 4 ζεύγη χρωμοσωμάτων, εκ των οποίων το πρώτο αποτελεί το φυλετικό.

Η *D. melanogaster* αγρίου τύπου χαρακτηρίζεται από κόκκινους οφθαλμούς και καφέ-κίτρινο σώμα, ενώ η κοιλιακή χώρα φέρει μαύρους εγκάρσιους δακτυλίους. Ένα από τα χαρακτηριστικά της είναι ο φυλετικός διμορφισμός. Τα θηλυκά έντομα έχουν μήκος 2,5 mm, ενώ τα αρσενικά έχουν μικρότερο μήκος και χαρακτηρίζονται από σκουρόχρωμη ραχιαία πλευρά. Επιπλέον, τα αρσενικά έντομα φέρουν μια μαύρη κηλίδα στην κοιλιά τους και μια συστοιχία σκουρόχρωμων βλεφαρίδων στον ταρσό του πρώτου ζεύγους ποδιών.

1.6.2. Κύκλος ζωής της *D. melanogaster*

Η *D. melanogaster* ανήκει στα ολομετάβολα έντομα, λόγω της ικανότητας της να μεταμορφώνεται μέσα στο ίδιο της το περίβλημα και των διαφορετικών σταδίων του κύκλου

ζωής της (**Εικόνα 1.8**). Η διάρκεια ζωής της μπορεί να φτάσει έως και 65-75 ημέρες κάτω από ιδανικές συνθήκες καλλιέργειας, ενώ περιορίζεται σημαντικά υπό δυσμενείς συνθήκες.



Εικόνα 1.9: Ο κύκλος ζωής της *Drosophila melanogaster* (Ong et al., 2015).

1.6.2.1. Ωογένεση

Η ωογένεση ξεκινά με τη διαίρεση του γαμετικού κυττάρου 4 φορές και το σχηματισμό 16 κυττάρων, εκ των οποίων το ένα εξελίσσεται σε ωοκύτταρο και τα υπόλοιπα 15 σε τροφοκύτταρα. Το ωοθυλάκιο είναι μια δομή που αποτελείται από το σύμπλοκο ωοκυττάρου-τροφοκυττάρων, που είναι περιβεβλημένα από θυλακοκύτταρα των ωοθηκών, σχηματίζοντας τη δομή που ονομάζεται ωοθηλάκιο (Trougakos and Margaritis, 2002). Τα θυλακοκύτταρα προέρχονται από τις γονάδες. Συνεπώς προέρχονται από τη σωματική και όχι από τη γαμετική σειρά (Slack, 2006).

1.6.2.2. Εμβρυογένεση

Η γονιμοποίηση, που λαμβάνει χώρα στη μήτρα, ξεκινά με την είσοδο του σπερματοζωαρίου από το εμπρόσθιο άκρο του ωοθυλακίου. Το θηλυκό έντομο μπορεί να γεννήσει έως και 800 ωοθυλάκια (έμβρυα), μεγέθους 0.5mm, και περίπου 5 κάθε φορά, τα οποία εναποθέτει σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Το γονιμοποιημένο ωοκύτταρο αναπτύσσεται αρχικά σε έμβρυο και στη συνέχεια, μεταμορφώνεται μέσα σε 24 ώρες σε προνύμφη (larva). Το αρχικό στάδιο της εμβρυογένεσης, η αυλάκωση, χαρακτηρίζεται από γρήγορες πυρηνικές διαιρέσεις και το έμβρυο σχηματίζει ένα συγκύτιο που αποτελείται από κύτταρα με κοινό κυτταρόπλασμα. Ακολουθεί ο σχηματισμός των πολικών κυττάρων από τα οποία προέρχονται τα γαμετικά κύτταρα. Στη συνέχεια, προκύπτει το συγκυτιακό

βλαστόδερμα που θα διαφοροποιηθεί σε κυτταρικό βλαστόδερμα μετά το διαχωρισμό των πυρήνων. Στο στάδιο της γαστριδίωσης, σχηματίζονται οι τρεις βλαστικές στιβάδες από τις οποίες θα προέλθουν τα όργανα του εντόμου (Slack, 2006).

1.6.2.3. Προνυμφικά στάδια

Το στάδιο της προνύμφης διακρίνεται σε τρία επιμέρους στάδια. Το 1^ο προνυμφικό στάδιο ξεκινά αμέσως μετά την εκκόλαψη της προνύμφης και την έξοδο της από το αυγό. Στο στάδιο αυτό, η προνύμφη τρέφεται αποκλειστικά από την επιφάνεια της τροφής. Μετά το πέρας 24 ωρών μεταμορφώνεται σε προνύμφη 2^{ου} σταδίου και διαθέτει πλέον την ικανότητα να εισχωρεί στο εσωτερικό της τροφής. Η μετάβαση της στο 3^ο προνυμφικό στάδιο πραγματοποιείται μέσα σε 24 ώρες και συνεχίζει να θρέφεται από το εσωτερικό της τροφής. Στα τρία αυτά προνυμφικά στάδια, η προνύμφη τρέφεται από τα σάκχαρα της τροφής, καθώς και με μικροοργανισμούς που αποικοδομούν την τροφή. Μετά από περίπου 48 ώρες στο εσωτερικό της τροφής, η προνύμφη εξέρχεται σχηματίζοντας ένα κουκούλι, μέσα στο οποίο μεταμορφώνεται σε ένα διάστημα 48 ωρών σε νύμφη (pupa).

1.6.2.4. Ενήλικο έντομο

Στο στάδιο αυτό, η νύμφη εξακολουθεί να βρίσκεται μέσα στο κουκούλι και σταδιακά μεταμορφώνεται σε τέλειο έντομο, διαδικασία που διαρκεί 4 ημέρες. Ως τέλειο έντομο, το ζώο εξέρχεται από το κουκούλι, ενώ ακόμα δεν έχει ολοκληρωθεί πλήρως η ανάπτυξη του, καθώς χαρακτηρίζεται από διπλωμένα και κολλημένα στο σώμα φτερά, λευκό χρώμα σώματος και αναπαραγωγική ανωριμότητα στα θηλαστικά. Μέσα σε 3 ώρες, τα φτερά αναπτύσσονται πλήρως και το έντομο αποκτά το τελικό χρώμα σώματος και οφθαλμών.

1.6.3. Η *D. melanogaster* ως οργανισμός - μοντέλο

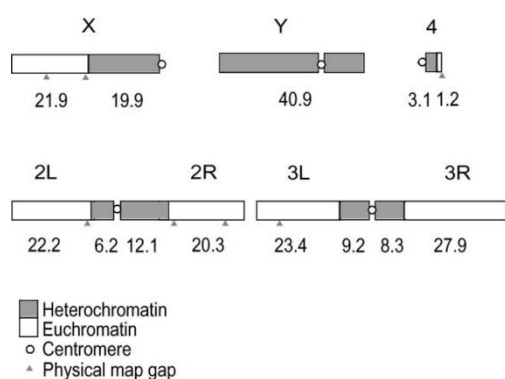
Η *D. melanogaster* είναι ένας οργανισμός με πολλά πλεονεκτήματα και επομένως, χρησιμοποιείται εκτεταμένα ως οργανισμός-μοντέλο, κυρίως στους τομείς της Γενετικής και της Αναπτυξιακής βιολογίας. Ο μικρός κύκλος ζωής, το μικρό μέγεθος, η εύκολη ανάπτυξη της καλλιέργειας της σε εργαστηριακές συνθήκες, η χρονική ακρίβεια των σταδίων ανάπτυξης της υπό σταθερές συνθήκες, ο μεγάλος αριθμός απογόνων, και η καλή γνώση της γονιδιακής, εμβρυικής και μεταεμβρυικής ανάπτυξης της, αποτελούν τα βασικότερα πλεονεκτήματα που καθιστούν τη *D. melanogaster* ιδανικό οργανισμό-μοντέλο. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της είναι το γεγονός ότι το γονιδίωμα της έχει χαρτογραφηθεί πλήρως και έχει βρεθεί πάνω από 50% ομολογία με τα γονίδια του ανθρώπου. Η *D. melanogaster* χρησιμοποιείται ως οργανισμός-μοντέλο για διάφορες ανθρώπινες ασθένειες,

όπως η νόσος του Parkinson και του Alzheimer, ενώ πολυάριθμες μελέτες πραγματοποιούνται για την εύρεση γονιδίων που επηρεάζουν τη γήρανση και την πρωτεόλυση.

Η *D. melanogaster* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οργανισμός - μοντέλο σε κάθε στάδιο του κύκλου ζωής της (προνύμφη, νύμφη, ενήλικο έντομο). Επιπλέον, το ενήλικο έντομο διαθέτει εξελιγμένα και πολύπλοκα οργανικά συστήματα, με δομές που μιμούνται τις αντίστοιχες λειτουργίες των θηλαστικών. Επίσης, ο εγκέφαλος της *D. melanogaster* αποτελείται από περισσότερους από 100.000 νευρώνες που ελέγχουν τον κirkάδιο ρυθμό και τις διαδικασίες της πλοήγησης, της σίτισης, της μνήμης και της ερωτοτροπίας. Είναι αξιοσημείωτο ότι το νευρικό σύστημα της αντιδρά στην επίδραση διαφόρων φαρμάκων με τρόπο παρόμοιο με αυτόν των θηλαστικών.

1.6.4. Το γονιδίωμα της *D. melanogaster*

Το γονιδίωμα της *D. melanogaster* αποτελείται από περίπου 15.600 γονίδια, οργανωμένα σε τέσσερα ζεύγη χρωμοσωμάτων, εκ των οποίων τα τρία είναι αυτοσωμικά και το ένα φυλετικό (**Εικόνα 1.9**). Το 60% των γονιδίων αυτών δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά εμπλέκεται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Το ζεύγος των φυλετικών χρωμοσωμάτων αποτελείται από τα χρωμοσώματα X και Y. Η αναλογία αυτοσωμικών και φυλετικών χρωμοσωμάτων καθορίζει το φύλο στη *D.melanogaster*, σε αντίθεση με τον άνθρωπο όπου το φύλο καθορίζεται από την παρουσία του Y χρωμοσώματος. Το χρωμόσωμα Y του εντόμου αποτελείται από 16 γονίδια σε μορφή ετεροχρωματίνης, τα οποία δεν συμμετέχουν στον καθορισμό του φύλου (Celniker and Rubin, 2003).



Εικόνα 1.10: Η δομή των χρωμοσωμάτων της *D.melanogaster* (Celniker and Rubin, 2003)..

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διαλεύκανση της λειτουργικής διασύνδεσης της μιτοχονδριακής βιογένεσης με τα κύρια πρωτεολυτικά συστήματα του οργανισμού και η συμμετοχή του φαρμακολογικού παράγοντα μετοφορμίνη στην μακροβιότητα του οργανισμού.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Υλικά

Ως πειραματόζωα χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαγονιδιακά στελέχη του δίπτερου εντόμου *Drosophila melanogaster* που εκφράζουν:

- υπερέκφραση του γονιδίου *srL*, υπό τον έλεγχο του UAS
- τον επαγόμενο (μέσω RU486) μεταγραφικό παράγοντα GAL4 υπό τον έλεγχο του υποκινητή της τουμπουλίνης (Driver).

Τα έντομα καλλιεργήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες καλλιέργειας (*Bioline*, 17101). Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 23-25° C, με υγρασία 60% και με δωδεκάωρη εναλλαγή φωτισμού.

Τα μηχανήματα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

Μηχάνημα	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
Φυγόκεντρος	<i>Biofuge stratus</i>	
Συσκευή ηλεκτροφόρησης	<i>Biorad</i>	
Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη	<i>Biorad</i>	
Συσκευή PikoReal 96 Real-Time PCR System	<i>Thermo</i>	TCR0096
Φθορισμόμετρο	<i>Biorad</i>	170-2402
Φασματοφωτόμετρο	<i>Biorad</i>	170-2501
Επωαστήρας	<i>ProBlot Labnet</i>	
Συσκευή σύνθεσης cDNA (Minicycler PTC-150)	<i>MJ Research</i>	
Σπεκτόμετρο <i>spekol un vis</i>	<i>Zeiss</i>	

Αντιδραστήριο	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
2-mercaptoethanol	Merck	15433
Acetic acid	Merck	K39105963
Acrylamide	Research Organics	9502A
Agar	Fluka	05040
Ammonium persulfate (APS)	Research Organics	9530A
Biorad protein assay	Biorad	500-0006
Bovine Albumin		
Bromophenol blue	Sigma	B-6896
Calcium chloride	Sigma	429759
ClCH ₂ COONa	Fluka	24610
cDNA synthesis kit for RT-qPCR,	Thermo	K1641
Coomassie brilliant blue R-250	Fluka	27816
Developer D-19	Kodak	146 4593
DMSO	Sigma	270431
DTT	Sigma	248531
ECL	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2048
EDTA Molecular biology grade	Research organics	9572E
Ethanol	Merck	1.00983.2511
Fixer Fix-100	Agfa	G382B
Glycerol	Sds	6023516
Glycine	Serva	23390
HCl 37%	Merck	K37471017
Hepes	Sigma	H-0891
Methanol	Merck	1.06009.2511
Mifepristone	Sigma	M8046
NaHCO ₃	Fluka	24610-250G
NP-40		
OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit	Chemicon	S7150
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)	Sigma	P-1379
Potassium Chloride	Sigma	P-9333

Prestained protein ladder	Fermentas	SM0671
Propionic acid	Merck	8.00605.1000
Proteasome Substrate I (Fluorogenic)	Enzo	
Proteasome Substrate II (Fluorogenic)	Enzo	260-086-M005
Proteasome Substrate III (Fluorogenic)	Enzo	260-070-M005
RNAzol	Molecular Research Center, Inc. (MRC)	MRC-RN190-100
SDS	Serva	20765
ROS reagent/ probe	Life technologies	C6827
Sodium chloride	Merck	1.06404.1000
Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix	Thermo scientific	FER-K0222
Tetramethylethylenediamine	Merck	1107320100
Tris	Research Organics	9680T
Triton X-100	BDH	30632

Αντισώματα	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
Πρωτογενή αντισώματα ειδικά για τη <i>Drosophila melanogaster</i>		
26S proteasome α7 subunit	Santa Cruz	Sc-65755
26S proteasome p54 (Rpn10)	Santa Cruz	Sc-65746
ATP5A	Abcam	ab14748
GAPDH	Sigma Aldrich	G9545
ref(2)p/p62	Enzo Life Sciences	BML-PW9860
dfoxo	Cosmo Bio LTD	CAC-THU-A-DFOXO
ubiquitin	Santa Cruz	Sc-8017
Δευτερογενή αντισώματα		
Anti-Go-IgG/HRP	Santa Cruz	Sc-2020
Anti-Mo-IgG/HRP	Santa Cruz	Sc-2005
Anti-Rb-IgG/HRP	Santa Cruz	Sc-2004

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Καλλιέργεια εντόμων

Η καλλιέργεια των εντόμων πραγματοποιήθηκε στην εξής τροφή (για μία δόση):

- 4 g άγαρ
- 13 g μαγιά
- 16 g ζάχαρη
- 25 g τοματοπολτό
- 32 g ριζάλευρο
- 2 ml αιθανόλη 100%
- 2 ml προπιονικό οξύ
- 450 ml H₂O

Διαδικασία:

Ογκομετρούνται 450 ml H₂O. Λαμβάνεται λίγη ποσότητα νερού από τα 450 ml, στην οποία διαλύεται η μαγιά και ο τοματοπολτός. Έπειτα, στο υπόλοιπο H₂O που εξακολουθεί να βράζει προστίθενται το άγαρ, η διαλυμένη μαγιά και η ζάχαρη. Αφού το υγρό πάρει ακόμη μία βράση, προστίθεται ο τοματοπολτός, ενώ παράλληλα απομακρύνεται το μίγμα από τη φωτιά. Στη συνέχεια, προστίθεται αιθανόλη (EtOH), προπιονικό οξύ και τέλος, τοποθετείται το ριζάλευρο και πραγματοποιείται καλή ανάδευση. Μετά τη στερεοποίηση της τροφής στα πλαστικά σωληνάκια καλλιέργειας, σε θερμοκρασία δωματίου, σε κάθε σωληνάκι προστίθεται μία σταγόνα αιθανόλης και μία σταγόνα προπιονικού οξέος.

3.2.1.1. Επαγωγή της έκφρασης του διαγονιδίου με τη χορήγηση της ορμόνης RU486

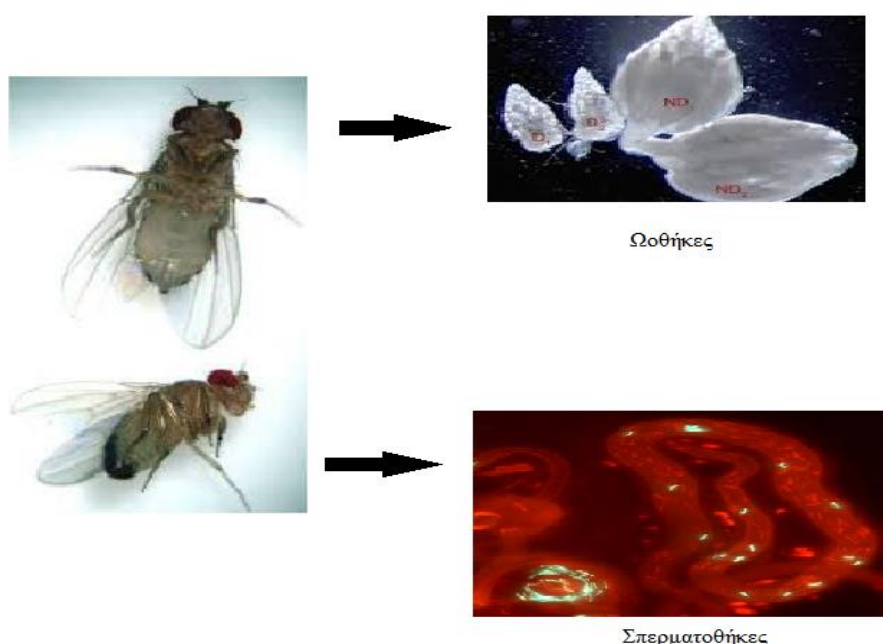
Προκειμένου να επάγουμε την έκφραση του διαγονιδίου, προσθέτουμε την ορμόνη RU486 στην τροφή των εντόμων σε τελική συγκέντρωση 320 μM. Δεδομένου ότι η ορμόνη διαλύεται σε EtOH (80%), στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας τροφή που περιείχε 80% EtOH.

3.2.2. Προσδιορισμός μακροβιότητας των διαγονιδιακών εντόμων *Drosophila melanogaster*

Στο πλαίσιο της πειραματικής διαδικασίας, καλλιεργήθηκαν 40 θηλυκά και 40 αρσενικά έντομα σε σωληνάκια με τροφή που περιείχε 80% EtOH, που αποτέλεσαν τα έντομα μάρτυρες, ή 320 μ M Mifepristone (RU486). Οι καλλιέργειες ανανεώνονταν με φρέσκια τροφή κάθε 4-5 μέρες με καθημερινή καταγραφή των θανάτων. Ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη στατιστική ανάλυση Kaplan-meier.

3.2.3. Ανατομία ωοθηκών και σπερματοθηκών του εντόμου *Drosophila melanogaster*

Για όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας (μέτρηση της πρωτεασωμικής, καθεψινικής ενεργότητας κ.α.) χρειάστηκε να αφαιρέσουμε το αναπαραγωγικό σύστημα κάθε φύλου, τις **ωοθήκες** (ovaries-O) και τις **σπερματοθήκες** (spermatheca-S) (**Εικόνα 3.1**). Όπως έχει αναφερθεί ήδη, στο αναπαραγωγικό σύστημα, τα πρωτεολυτικά συστήματα φαίνεται να ρυθμίζονται διαφορετικά σε σχέση με τον υπόλοιπο σωματικό ιστό. Επομένως, αποφασίστηκε η παρούσα εργασία να εστιαστεί στις αναλύσεις μόνο από σωματικούς ιστούς.



Εικόνα 3.1: Θηλυκό και αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα. Ωοθήκες και σπερματοθήκες του δίπτερου εντόμου *Drosophila melanogaster*.

3.2.3.1. Ανατομία ωοθηκών

Συλλέχθηκαν θηλυκά έντομα από κάθε ομάδα και αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα. Με τη βοήθεια ειδικών λαβίδων ανατομίας, πιέζουμε τη μύγα ακριβώς κάτω από τον θώρακα και την τοποθετούμε σε τρυβλίο το οποίο περιέχει διάλυμα Ringer's. Το διάλυμα Ringer's αποτελείται από 0,75% NaCl, 0,02% CaCl, 0,01% KCl και 0,02% NaHCO₃ διαλυμένα σε αποσταγμένο νερό. Είναι ένα ισότονο διάλυμα για την αποφυγή ωσμωτικών φαινομένων και φυλάσσεται στους 4°C. Με μία άλλη λαβίδα πιάνουμε την άκρη της κοιλιάς του εντόμου και τραβάμε με λεπτές κινήσεις ώστε να βγουν οι ωοθήκες.

3.2.3.2. Ανατομία σπερματοθηκών

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την ανατομία των ωοθηκών των θηλυκών εντόμων.

3.2.4. Απομόνωση πρωτεϊνών και προσδιορισμός της ολικής συγκέντρωσης τους

Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρακάτω διαδικασία πραγματοποιείται σε πάγο.

Για την απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από το σωματικό ιστό (αφαίρεση αναπαραγωγικού συστήματος) αρσενικών ή θηλυκών ατόμων ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Ομογενοποίηση σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης NP-40 (φυλάσσεται στους 4° C) που αποτελείται από:
 - ✓ 150 mM
 - ✓ 1% NP-40
 - ✓ 50 mM Tris pH 8.0
- Φυγοκέντρηση σε 13.300 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C.

Στη συνέχεια, συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες, εφαρμόζεται η μέθοδος Bradford για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και τέλος, τα δείγματα φυλάσσονται στους -80 °C.

3.2.4.1. Μέθοδος Bradford

Η μέθοδος Bradford (Bradford, 1976) βασίζεται στην παρατήρηση ότι η μέγιστη απορρόφηση της χρωστικής Coomassie brilliant blue R-250 μετατοπίζεται από τα 465nm

στα 595nm κατά το σχηματισμό του αντιδραστηρίου Bradford με τις πρωτεΐνες σταθερού συμπλόκου κυανού χρώματος (για περίπου 1 ώρα).

Πρώτα, δημιουργείται η πρότυπη ευθεία αναφοράς, η οποία κατασκευάζεται από γνωστές κλιμακούμενες συγκεντρώσεις αλβουμίνης ορού βοός (bovine serum albumin, BSA). Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις BSA που χρησιμοποιήθηκαν είναι 0 µg/ml (τυφλό), 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg/ml.

3.2.4.1.1. Μέτρηση δειγμάτων

Κάθε δείγμα περιέχει τελικό όγκο 1 ml 1X αντιδραστηρίου Bradford, στο οποίο προστίθεται 1-2 µl άγνωστης συγκέντρωσης πρωτεΐνη, εκτός από ένα δείγμα μάρτυρα (τυφλό) που αντί για πρωτεΐνη περιέχει διάλυμα λύσης. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά σε RT και ακολουθεί φωτομέτρηση.

3.2.5. SDS – PAGE - Ανοσοστύπωμα Western

3.2.5.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε ομοιογενές πήκτωμα ακρυλαμίδης

Για την ηλεκτροφορητική ανάλυση προστέθηκε σε κάθε πρωτεϊνικό δείγμα 2x Laemmli διάλυμα (2xLSB) (Laemmli, 1970) και DTT (DL-Dithiothreitol) διάλυμα με αναλογία →5 μέρη 2xLSB: 4 μέρη πρωτεϊνικό διάλυμα : 1 μέρος 1 M DTT.

Ακολούθησε βράσιμο των δειγμάτων για 5 λεπτά και κατόπιν παρασκευάστηκε πήκτωμα ακρυλαμίδης με ομοιογενή συγκέντρωση 10%.

Το πήκτωμα αποτελείται από τη φάση πακεταρίσματος (stacking gel) και τη φάση διαχωρισμού (separating gel). Η σύσταση του πηκτώματος πακεταρίσματος είναι η εξής:

- 12 % ακρυλαμίδη
- 0.5 % SDS
- 0.126 M Trisma base (Tris) pH 6.8
- 0.05 % Υπερθειϊκό αμμώνιο (Amonium persulfate-APS)
- 0.1 % TEMED.

Ενώ, η σύσταση του πηκτώματος διαχωρισμού είναι:

- 12 % ακρυλαμίδη
- 0.5 % SDS

- 0.375 M Tris pH 8.8
- 0.1 % APS
- 0.04 % TEMED.

Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος ακολούθησε η προσθήκη των δειγμάτων στα πηγαδάκια του πηκτώματος. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (10x) αποτελείται από:

- 250 mM Tris
- 2,5 M γλυκίνη
- 0.1 % SDS

Το pH του διαλύματος, μετά την προσθήκη των συστατικών, κυμαίνεται συνήθως από 8.30-8.63. Γενικά, αποφεύγουμε τη ρύθμιση του pH με HCl, διότι τα ιόντα Cl⁻ μειώνουν την αναλυτική ικανότητα της μεθόδου. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4° C.

Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 1x. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι 20 mA, με τις πρωτεΐνες οι οποίες έχουν αρνητικό φορτίο λόγω του SDS, να μετακινούνται προς το θετικό πόλο με καθοριστικό παράγοντα το μοριακό τους βάρος μέχρι η χρωστική των δειγμάτων να φτάσουν στο τέλος του πηκτώματος διαχωρισμού, χωρίς όμως να φύγει από το πήκτωμα.

3.2.5.2. Μεταφορά πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Η τεχνική της μεταφοράς των ηλεκτροφορημένων πρωτεϊνικών μορίων σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και η ανίχνευση της υπό μελέτης πρωτεΐνης στη συνέχεια με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων παρέχει πληροφορίες για τη σχετική έκφραση της υπό μελέτης πρωτεΐνης στο δείγμα αν όλα τα δείγματα είναι ισοφορτωμένα, δηλαδή περιέχουν ίδια ποσότητα ολικής πρωτεΐνης (Towbin et al., 1979). Έτσι, μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα για τη συγκριτική μελέτη της έκφρασης ίδιων πρωτεϊνών σε διαφορετικούς δείγματα.

Η μέθοδος που εφαρμόσαμε για τη μεταφορά των πρωτεϊνών, είναι η υγρή μεταφορά των πρωτεϊνών. Στην υγρή μέθοδο τα χαρτιά Whatman (3mm), με μέγεθος 0.6 x 0.6 cm μεγαλύτερα του πηκτώματος, αρχικά τοποθετούνται μαζί με τα ειδικά σφουγγάρια, στο διάλυμα μεταφοράς για περίπου 20-25 λεπτά ώστε να ενυδατωθούν. Τοποθετούμε το

πήκτωμα με τη νιτροκυτταρίνη, ανάμεσα σε στρώσεις από χαρτιά Whatman και τα ειδικά σφουγγάρια, προσπαθώντας να διώξουμε τυχόν φυσαλίδες.

Το διάλυμα μεταφοράς αποτελείται από:

- 40 mM γλυκίνη
- 50 mM Tris
- 15 % μεθανόλη

Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε σε σταθερή τάση 350 mA για δυο μισή ώρες στους 4 °C.

3.2.5.3. Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνικών ζωνών

Με τη μέθοδο του ανοσοστυπώματος πρωτεϊνών επιτυγχάνεται η ανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, χάρη στη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων-ελέγχου.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Επώαση της μεμβράνης με διάλυμα Blocking για 50 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Το διάλυμα Blocking είναι ένα πρωτεϊνικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων. Περιέχει 5% σκόνη γάλακτος με χαμηλά λιπαρά σε διάλυμα πλύσης TBS-T (Tris Base Saline-Tween 20). Το TBS-T παρασκευάστηκε ως εξής:

- ✓ Παρασκευή 20x TBS

- 20 mM Tris
- 137 mM NaCl

Με pH 7.6. φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου

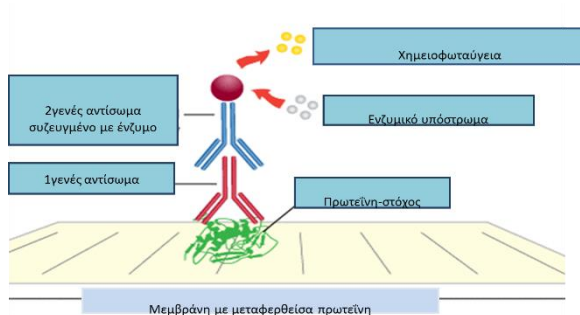
- ✓ Παρασκευή 1x TBS

- Αραίωση του 20x TBS σε 1x TBS σε dH₂O. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

- ✓ Παρασκευή διάλυμα πλύσης TBS-T

- 1x TBS
- 0.1% Tween-20

- Επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα διαλυμένο σε διάλυμα Blocking (1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση).
- Πλύσιμο της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBS-T, 3 γρήγορες και 3 δεκάλεπτες πλύσεις), υπό ανάδευση.
- Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα διαλυμένο σε διάλυμα Blocking (1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση).
- Πλύσιμο της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης TBS-T, 3 γρήγορες και 3 δεκάλεπτες πλύσεις), υπό ανάδευση.
- Η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου (υπό μελέτη πρωτεΐνη)-αντισώματος έγινε με τη χρήση του διαλύματος ECL, το οποίο περιέχει δύο αντιδραστήρια, το Α και το Β. Το Α περιέχει υπεροξείδιο (υπόστρωμα για το ένζυμο υπεροξειδάση του ραπανακιού) και το Β περιέχει λουμινόλη και ενισχυτή χημειοφωταύγειας. 125 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ μεμβράνης από κάθε αντιδραστήριο (περίπου 1+1 ml για μια μεμβράνη που περιέχει 10 δείγματα) αναμιγνύονται σε ένα σωληνάριο universal και προστίθενται στην επιφάνεια της μεμβράνης για 1 λεπτό αυστηρά.
- Στεγνώνουμε ελαφρώς τη μεμβράνη από το ECL και τη τοποθετούμε σε ειδική κασέτα καλυμμένη με μια λεπτή διαφανή μεμβράνη και άμεση έκθεση σε φιλμ ακτίνων X σε σκοτεινό θάλαμο για χρόνο (δευτερόλεπτα έως και 1 ώρα) ανάλογο με την ένταση της ζώνης του συμπλόκου και η οποία σχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης καθώς και με τα επίπεδα συγγένειας της πρωτεΐνης με το πρωτογενές αντίσωμα. Η εμφάνιση του φιλμ γίνεται με μεταφορά του σε διάλυμα εμφάνισης (developer) για περίπου 1 έως 5 λεπτά, ξέπλυμα σε H_2O βρύσης και μονιμοποίηση σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) για 5 έως 10 λεπτά. Τέλος ξεπλένουμε πολύ καλά με H_2O βρύσης **(Εικόνα 3.2)**.



Εικόνα 3.2: Μέθοδος του ανοσοστυπώματος Western. Με τη μέθοδο αυτή, επιτυγχάνεται η ανίχνευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών στις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης χάρη στη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων-ελέγχου. Το πρωτογενές αντίσωμα προσδένεται με τη μεταβλητή του περιοχή στην πρωτεΐνη που αναγνωρίζει και είναι ειδικό για αυτή, ενώ το δευτερογενές αντίσωμα ανιχνεύει και αναγνωρίζει τη σταθερή περιοχή του πρωτογενούς αντισώματος, στην οποία και συνδέεται με τη δική του μεταβλητή περιοχή. Στη σταθερή περιοχή του δευτερογενούς αντισώματος βρίσκεται προσκολλημένο κάποιο ένζυμο το οποίο με το κατάλληλο υπόστρωμα, αντιδρά και φθορίζει μέσω της αντίδρασης χημειοφωταύγειας (www.leinco.com).

Οι μεμβράνες επαναχρησιμοποιούνται, αφού αφαιρεθούν τα αντισώματα από αυτές με τη μέθοδο stripping που περιγράφεται αμέσως μετά, ενώ επαναλαμβάνονται όλα τα στάδια ενός νέου ανοσοστυπώματος Western, όπως περιγράφηκαν παραπάνω. Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων, ανιχνεύσαμε τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης β-ακτίνης και GAPDH.

3.2.5.4. Αφαίρεση του αντισώματος από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Stripping)

Η διαδικασία της αφαίρεσης του αντισώματος είναι χρήσιμη όταν τα υπό μελέτη δείγματα είναι σπάνια και δε μπορούν να δημιουργηθούν πολλές πανομοιότυπες μεμβράνες λόγω περιορισμένης ποσότητας δειγμάτων. Επίσης, χρησιμοποιείται για οικονομία και εξοικονόμηση χρόνου, διότι είναι αρκετά χρονοβόρο κάθε διαφορετικό πρωτογενές αντίσωμα να χρειάζεται «φρέσκια» μεμβράνη για να μελετηθεί.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Γρήγορο ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS-T
- Επώση της μεμβράνης σε διάλυμα stripping στους 60° C για 45 λεπτά. Το διάλυμα stripping αποτελείται από:
 - ✓ 50 mM Tris
 - ✓ 2% SDS

Το pH ρυθμίζεται στο 7.0 και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν από κάθε χρήση, προστίθεται στον όγκο που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί 50 mM DTT ώστε να επιτευχθεί η αποκόλληση των αντισωμάτων.

- Ξέπλυμα της μεμβράνης, 3 γρήγορα και 3 δεκάλεπτα πλυσίματα με διάλυμα πλύσης TBS-T.
- Καλό στέγνωμα της μεμβράνης και φύλαξη στους 4°C (είτε άμεση χρήση) έως ότου ξαναχρησιμοποιηθεί.

3.2.6. Ανίχνευση οξειδωμένων πρωτεϊνών (OxyBlot)

Η ανίχνευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με το OxyBlot® Kit (Chemicon International). Το kit αυτό ανιχνεύει καρβονυλικές ομάδες τις οποίες απέκτησαν οι πρωτεΐνες μετά την οξείδωσή τους. Πιο αναλυτικά, οι καρβονυλομάδες στις πλευρικές αλυσίδες των οξειδωμένων πρωτεϊνών αντιδρούν με 2,4-δινιτροφαινυλοϋδραζίνη (DNPH) δίνοντας 2,4-δινιτροφαινυλοϋδραζόνη (DNP). Οι τροποποιημένες αυτές πρωτεΐνες ανιχνεύονται με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων (anti-DNP), με τη μέθοδο ανοσοστυπώματος Western.

Συγκεκριμένα:

- ✓ Χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένη ποσότητα πρωτεΐνης, έστω σε X όγκο και προστέθηκε ίσος όγκος (X) SDS 12%, για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών.
- ✓ Έπειτα προστέθηκε 2 X όγκος 10x 2,4 δινιτροφαινυλοϋδραζίνης (DNPH).
- ✓ Πραγματοποιήθηκε επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την επώαση προκύπτουν τα παράγωγα των πρωτεϊνών τα οποία θα ανιχνευτούν αργότερα από ειδικό αντίσωμα.
- ✓ Προστέθηκε 1,5 X όγκος διαλύματος εξουδετέρωσης για τη διακοπή της αντίδρασης.
- ✓ Τέλος προστέθηκε 5 % β-μερκαπτοαιθανόλη για την εκτεταμένη αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

Τα υπόλοιπα στάδια ανάλυσης των πρωτεϊνών είναι ίδια με τα αντίστοιχα της ανάλυσης με ανοσοστυπώμα Western. Το πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα περιλαμβάνονται μέσα στο ειδικό kit και είναι ειδικά για τη συγκεκριμένη μέθοδο.

3.2.7. Μέτρηση των δύο ενζυματικών ενεργοτήτων του πρωτεασώματος

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη μέτρηση των ενεργοτήτων του πρωτεασώματος, αποτελεί η επαρκής ποσότητα πρωτεΐνης κάθε δείγματος (τουλάχιστον 60μg/ δείγμα), που ποσοτικοποιείται με τη χρήση μεθόδου Bradford (δείγματα εις διπλούν-duplicated).

Αρχικά, οι σωματικοί ιστοί που απομονώθηκαν από την ανατομία, τοποθετήθηκαν σε eppendorfs που περιείχαν 150 μl 26S lysis buffer (απομόνωση 26S πρωτεασώματος). Ακολουθεί ομογενοποίηση και επώαση στους 4°C, με αργή περιστροφή στη ρόδα. Κατόπιν τα δείγματα φυγοκεντρώνται (4°C 13.300 rpm για 10 λεπτά), ενώ στο τέλος συλλέγουμε το υπερκείμενο.

- **Διάλυμα λύσης για το 26S πρωτεάσωμα 20 mM Tris pH 7.6**

- ❖ 5 mM ATP
- ❖ 10 % γλυκερόλη
- ❖ 20 mM KCl
- ❖ 1 mM EDTA
- ❖ 1 mM DTT
- ❖ 0.2 % NP-40 (Φυλάσσεται στους 4°C)

Εν συνεχεία, προστίθενται 195μl από το διάλυμα ενεργοτήτων σε νέα σωληνάκια. Πρόκειται για ένα ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο διατηρεί σταθερή την ενεργότητα του πρωτεασώματος.

- **Διάλυμα ενεργοτήτων για το 26S πρωτεάσωμα (Hepes)**

- ❖ 100 mM Hepes pH 7.3 (Φυλάσσεται στους 4°C)

Έπειτα, προσθέτουμε την υπολογισθείσα ποσότητα πρωτεΐνης (10 μg) για κάθε αντίδραση, εκτός από τα «τυφλά» δείγματα, τα οποία χρησιμοποιούνται για να μηδενιστεί το φθορισμόμετρο. Έπειτα, γίνεται η προσθήκη των δύο φθοροπεπτιδίων (5 μl από το stock των 2 mM) σε τελική συγκέντρωση 50 μM:

- ❖ LLVY (ενεργότητα χυμοθρυψίνης – υπομονάδα β5)
- ❖ LLE (ενεργότητα κασπάσης – υπομονάδα β1)

Τα φθοροπεπτίδια είναι πεπτίδια σημασμένα με ένα φθορίζον μόριο, το οποίο όταν βρίσκεται συνδεδεμένο με το πεπτίδιο δεν φθορίζει. Καθένα από τα τρία φθοροπεπτίδια

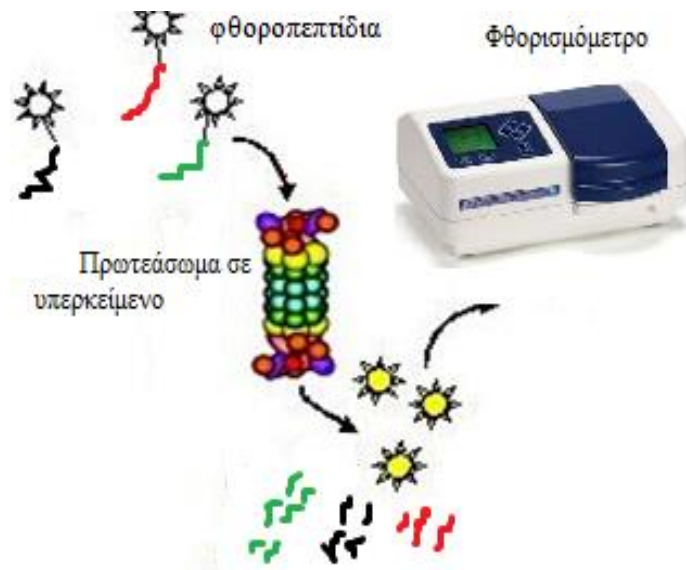
είναι υπόστρωμα για μια από τις τρεις ενεργότητες του πρωτεασώματος. Το φθορίζον μόριο θα ενεργοποιηθεί και θα φθορίζει, όταν το φθοροπεπτίδιο αναγνωριστεί από την θέση που εντοπίζεται η ενεργότητα του πρωτεασώματος και θα αρχίσει η αποικοδόμησή του (**Εικόνα 3.3**).

Τα δείγματα μετά την προσθήκη των φθοροπεπτιδίων επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης, προσθέτουμε 300μl από το διάλυμα τερματισμού (stop solution), το οποίο σταματά την αντίδραση.

- **Διάλυμα τερματισμού (Stop solution)**

- ❖ 30 mM CH₃COONa
- ❖ 70 mM CH₃COOH
- ❖ 100 mM ClCH₂COONa pH 4.3(Φυλάσσεται στους 4 °C)

Τέλος, προσθέτουμε 1ml ddH₂O σε κάθε δείγμα και μετράμε τον φθορισμό στο φθορισμόμετρο (Εικόνα 21). Για τα συγκεκριμένα φθοροπεπτίδια χρησιμοποιήθηκαν ειδικά κατασκευασμένα φίλτρα με μήκος κύματος διέγερσης (Excitation) 350nm και μήκος κύματος εκπομπής (Emission) 440nm.



Εικόνα 3.3: Μέτρηση των τριών πρωτεασωματικών ενζυματικών ενεργοτήτων.

Για τη μέτρηση των ενεργοτήτων του πρωτεασώματος χρησιμοποιήθηκαν φθοροπεπτίδια ειδικά για τις τρεις πρωτεασωματικές ενεργότητες [χυμοθρυψίνης (LLVY), κασπάσης (LLE) και θρυψίνης (LRR)]. Τα φθοροπεπτίδια ενεργοποιούνται και φθορίζουν μετά την αποικοδόμησή τους από το πρωτεάσωμα.

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

Και εδώ βασική προϋπόθεση για την μέτρηση της ενεργότητας των καθεψινών B και L, αποτελεί η απομόνωση κατάλληλης συγκέντρωσης πρωτεΐνης από κάθε δείγμα (μέθοδος Bradford- δείγματα duplicated).

Αρχικά, οι σωματικοί ιστοί που απομονώθηκαν από την ανατομία τοποθετήθηκαν σε eppendorfs που περιείχαν 200 μ l διάλυμα λύσης (απομόνωση λυσοσώματος). Ακολουθεί ομογενοποίηση, φυγοκέντρωση (4°C 14.000g για 20 λεπτά) και τέλος συλλογή υπερκείμενου.

- **Διάλυμα λύσης για το λυσόσωμα pH 4.0**

- ❖ 50 mM Tris
- ❖ 1 mM DTT (Φυλάσσεται στους 4°C)

Κατόπιν, τοποθετούμε 196 μ l από το διάλυμα ενεργοτήτων σε νέα σωληνάκια., το οποίο είναι και αυτό ένα ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο διατηρεί την ενεργότητα των λυσοσωμικών ενζύμων, διότι παρομοιάζει τις συνθήκες που επικρατούν στο οργανίδιο (χαμηλό pH).

- **Διάλυμα ενεργοτήτων για λυσόσωμα**

- ❖ 50 mM CH_3COONa
- ❖ 8 mM L-Cysteine Hydrochloride
- ❖ 1 mM EDTA pH 4.0 (Φυλάσσεται στους 4°C)

Στη συνέχεια, μεταφέρεται η καθορισμένη ποσότητα πρωτεΐνης (20 μ g) στα σωληνάκια που αντιστοιχούν στο κάθε πρωτεϊνικό δείγμα και όχι στο «τυφλό» δείγμα (με το οποίο μηδενίζεται το φθορισμόμετρο). Έπειτα, προστίθεται το φθοροπεπτίδιο καθεψίνης B και L σε τελική συγκέντρωση 10 μ M. Η λειτουργία του φθοροπεπτιδίου περιγράφηκε αναλυτικά στην προηγούμενη παράγραφο (πρωτεασωμικά φθοροπεπτίδια) και λειτουργεί αντίστοιχα και εδώ. Τα δείγματα μετά την προσθήκη των φθοροπεπτιδίων επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης, προσθέτουμε 1 ml ddH₂O και καταγράφουμε το φθορισμό. Συγκεκριμένα για το φθοροπεπτίδιο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα με μήκος κύματος διέγερσης (Excitation) 350 nm και μήκος κύματος εκπομπής (Emission) 440 nm (όμοια όπως στο πρωτεάσωμα).

3.2.9. Μέτρηση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών οξυγόνου

Αρχικά, στην ανατομία προχωράμε σε αφαίρεση σπερματοθηκών και ωοθηκών, ενώ οι σωματικοί ιστοί τοποθετούνται σε eppendorf που περιέχουν 200 μ l PBS (duplicate). Ακολουθεί αφαίρεση του PBS, προσθήκη 200 μ l φρέσκου PBS με 1 μ l ειδικής χρωστικής για τη μέτρηση των ROS (CM-H₂DCF σε τελική συγκέντρωση 10 μ M, φυλάσσεται στους -20°C) καλή ανάδευση και επώαση για 30 λεπτά σε σκότος σε θερμοκρασία δωματίου (RT).

Κατόπιν, αφαιρούμε το διάλυμα PBS-χρωστικής, προσθέτουμε άλλα 200 μ l PBS, αναδεύουμε και αφήνουμε τον ιστό να επανέλθει σε σκότος για 15 λεπτά (RT).

Στη συνέχεια, ξεπλένουμε δύο φορές με φρέσκο PBS, ενώ πάντα κάνουμε καλή ανάδευση μετά από κάθε στάδιο. Έπειτα, προσθέτουμε 200 μ l NP-40 lysis buffer και ομογενοποιούμε. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (4°C, 13.300 rpm για 10 λεπτά), συλλογή υπερκείμενου (170 μ l) και ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τέλος σε κάθε σωληνάκι προστίθενται 830 μ l ddH₂O. Για το συγκεκριμένο ανιχνευτή, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά κατασκευασμένα φίλτρα με μήκος κύματος διέγερσης (Excitation) 490 nm και μήκος κύματος εκπομπής (Emission) 520 nm. Για το μηδενισμό του φθορισμόμετρου, χρησιμοποιήθηκε δείγμα χωρίς την προσθήκη πρωτεΐνης. Κατόπιν, γίνεται κανονικοποίηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων ως προς την ποσότητα πρωτεΐνης.

3.2.10. Απομόνωση RNA

Συλλέγουμε ~6-10 σωματικούς ιστούς από ίσο αριθμό θηλυκών και αρσενικών εντόμων σε 300 μ l RNazol (αποθήκευση RT), είτε συλλέγουμε τα δείγματα σε αποστειρωμένα άδεια σωληνάκια, τα τοποθετούμε σε υγρό άζωτο (αποθήκευση στους -80 °C) και προσθέτουμε κατόπιν 300 μ l RNazol.

Ακολουθεί ομογενοποίηση με ξεχωριστό και αποστειρωμένο ομογενοποιητή για κάθε δείγμα, προσθήκη επιπλέον 200 μ l RNazol, 200 μ l ddH₂O και ήπια ανάδευση. Επωάζουμε για ~15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT), φυγοκεντρούμε (12,000g, 15 λεπτά, 4°C) και συλλέγουμε ~660 μ L υπερκείμενου σε νέα αποστειρωμένα σωληνάκια. Έπειτα, προσθέτουμε αντίστοιχη ποσότητα 100% ισοπροπανόλης και αναδεύουμε ήπια. Επωάζουμε πάλι σε RT για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε (12,000g, 10 λεπτά, 4°C). Η ισοπροπανόλη βοηθά το RNA να καθιζάνει, οπότε στη φάση αυτή πετάμε το υπερκείμενο (το ίζημα είναι το RNA). Απ' αυτό το βήμα και στο εξής δουλεύουμε σε πάγο. Ξεπλένουμε δύο φορές με 400 μ l 75% αιθανόλη, ενώ ανάμεσα σε κάθε στάδιο μεσολαβεί φυγοκέντρηση (4,000g, 3 λεπτά, 4°C x2 φορές).

Κατόπιν, αφαιρούμε πολύ καλά την αιθανόλη (δεν αφήνει το RNA να διαλυθεί) από κάθε δείγμα και επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα σε 20-60 μL ddH₂O, ανάλογα με το μέγεθος του ιζήματος. Συνεχίζουμε, με φωτομέτρηση των δειγμάτων έτσι ώστε να ποσοτικοποιηθεί η συγκέντρωση του RNA και να ελεγχθεί η καθαρότητά του. Το RNA φυλάσσεται στους -80 °C.

3.2.10.1. Σύνθεση cDNA

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε 1 μg RNA από κάθε δείγμα. Για μία αντίδραση με τελικό όγκο 20 μL ισχύει:

- ❖ dH₂O του kit (cDNA synthesis kit for RT-qPCR) μέχρι 20 μL
- ❖ 5x μίγμα αντίδρασης 4 μL
- ❖ Αντίστροφη μεταγραφάση 1 μL
- ❖ RNA, ο όγκος που αντιστοιχεί σε ποσότητα 1 μg

Οι αντιδράσεις στη συνέχεια είναι ως εξής:

- ❖ 5 λεπτά στους 25°C
- ❖ 30 λεπτά στους 42°C
- ❖ 5 λεπτά στους 85°C
- ❖ Συντήρηση στους 4°C

3.2.10.2. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης μέσω Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Από την απομόνωση του συνολικού RNA και τη σύνθεση του cDNA που έχει προηγηθεί, προκύπτει 1 μg / μL τελική συγκέντρωση cDNA (από αρχική ποσότητα RNA 1 μg). Επειδή, όμως, η μέγιστη ποσότητα DNA που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για RT-PCR είναι 500 ng, αραιώνουμε το cDNA προκειμένου να έχουμε 200-500ng/ μL DNA.

Για μία αντίδραση με τελικό όγκο 10 μL ισχύει:

- ❖ dH₂O του kit (Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix) μέχρι 2,8 μL
- ❖ Μίγμα αντίδρασης 5 μL
- ❖ F εκκινητής 0,6 μL (τελική συγκέντρωση 0,3 μM)
- ❖ R εκκινητής 0,6 μL (τελική συγκέντρωση 0,3 μM)

❖ DNA 1 μ L

Εισάγουμε το plate της αντίδρασης στο μηχανήμα της RT-PCR (Piko Real Time, Thermo Scientific) και επιλέγουμε τις εξής ρυθμίσεις:

- ✓ Θερμοκρασία προθέρμανσης, 95°C → 10:00
- ✓ Θερμοκρασία ξεδιπλώματος των δύο κλώνων, 95°C → 00:15
- ✓ Θερμοκρασία σύνδεσης εναρκτηρίων τμημάτων σε κάθε αλυσίδα των δύο κλώνων, 60°C 00:30 →
- ✓ Θερμοκρασία επιμήκυνσης, 72°C → 00:30
- ✓ Καμπύλη τήξεως, 58-95°C
- ✓ Λήξη αντίδρασης, ψύξη, 20°C → 00:10

Το πρόγραμμα εξελίσσεται για σαράντα κύκλους.

Η θερμοκρασία στην οποία το 50% του DNA αποδιατάσσεται, είναι γνωστή ως σημείο τήξεως (**T_m**). Η καμπύλη τήξεως, μας δίνει μια εκτίμηση των διαστάσεων και των χαρακτηριστικών της διπλής έλικας. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, η διπλή έλικα αρχίζει να διαχωρίζεται, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της απορρόφησης του DNA (φαινόμενο υπερχρωμικότητας). Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο για τον έλεγχο τόσο των εκκινητών όσο και του προϊόντος. Συγκεκριμένα, η χρωστική SYBR Green είναι ικανή να ανιχνεύσει οποιαδήποτε δίκλωνο DNA (ακόμα και διμερή εκκινητών), μολύνοντας έτσι το PCR προϊόν. Τα διμερή των εκκινητών ή οποιοδήποτε άλλο παραπροϊόν της αντίδρασης θα εμφανιστεί στην καμπύλη ως μια πρόσθετη κορυφή.

3.2.11. Έλεγχος της ικανότητας αναρρίχησης (Climping assay) των εντόμων

Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε για τον έλεγχο της κινητικότητας του εντόμου είναι σύμφωνα με την αναφορά του Vernace et al., 2007. Ειδικότερα, 40 έντομα (20 θηλυκά και 20 αρσενικά) που πρόκειται να εξεταστούν αναισθητοποιούνται με αιθέρα και τοποθετούνται μέσα σε ένα ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml κλεισμένο ελαφρώς με ένα βαμβάκι. Αφήνουμε τα έντομα να αποκτήσουν πλήρως τις αισθήσεις τους (περίπου 20 λεπτά) και έπειτα με ένα ελαφρύ χτύπημα κατεβάζουμε τα έντομα στον πάτο του κυλίνδρου και μετράμε πόσα άτομα θα περάσουν το όριο των 66ml σε χρόνο 20 δευτερολέπτων. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία για 4 φορές και αναλύουμε τα αποτελέσματα.

3.2.12. Το σύστημα GAL4-UAS

Το GAL4-UAS σύστημα είναι μία γενετική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης και λειτουργίας σε οργανισμούς όπως η *D. melanogaster* (Brand and Perrimon, 1993). Το σύστημα αυτό αποτελείται από δύο τμήματα. Το γονίδιο GAL4, που κωδικοποιεί για ένα μεταγραφικό παράγοντα της ζύμης (ενεργοποιητής) και μια ανοδική αλληλουχία ενεργοποίησης, UAS (Upstream Activation Sequence). Η αλληλουχία UAS λειτουργεί σαν ενισχυτής στην οποία προσδένεται εξειδικευμένα ο GAL4.

3.2.12.1. Το σύστημα GAL4-UAS στη *Drosophila*

Αναλυτικότερα, οι γενετιστές δημιούργησαν σε διάφορους οργανισμούς μοντέλα, όπως είναι το δίπτερο έντομο *D. melanogaster*, στελέχη GAL4, κάθε ένα από τα οποία εκφράζει το GAL4 στο σύνολο των ιστών ή ιστοειδικά. Λόγου χάρη, κάποιες σειρές εντόμων μπορούν να εκφράσουν το GAL4 μόνο στα μυϊκά κύτταρα ή μόνο στα νευρικά. Έτσι στις σειρές που δημιουργήθηκαν, αυτός ο ενεργοποιητικός μεταγραφικός παράγοντας τοποθετήθηκε υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή-οδηγού γονιδίου (driver) που εκφράζεται καθολικά στον οργανισμό ή ιστοειδικά αντίστοιχα.

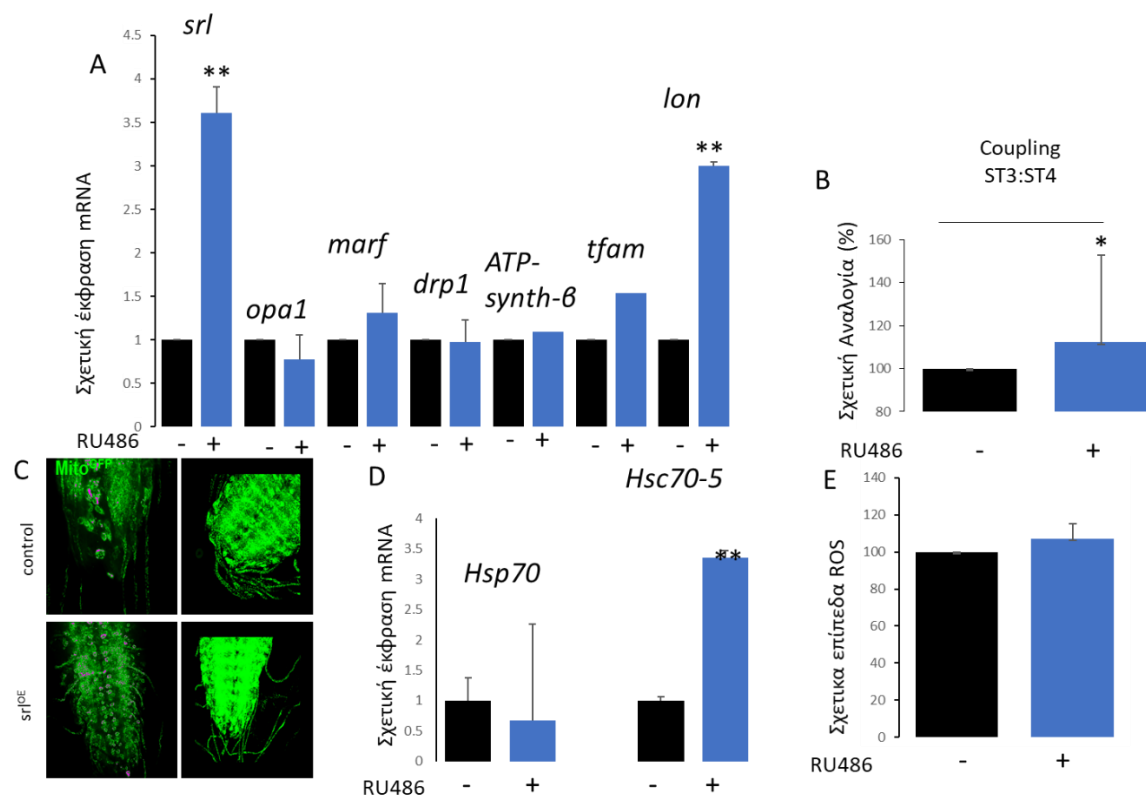
Όπως προαναφέρθηκε, προκειμένου να ρυθμιστεί γενετικά η έκφραση ορισμένων γονιδίων σε πρότυπα μοντέλα οργανισμούς, όπως η *Drosophila*, έντομα που εκφράζουν καθολικά ή ιστοειδικά τον επαγόμενο GAL4 (στη συγκεκριμένη περίπτωση), η έκφραση του οποίου εξαρτάται από τη προσθήκη στην τροφή των εντόμων της στεροειδούς ορμόνης Mifepristone (RU486), διασταυρώθηκαν με διαγονιδιακά στελέχη που φέρουν την UAS περιοχή ανοδικά από το διαγονίδιο. Συγκεκριμένα, τα διαγονιδιακά στελέχη αυτά μπορεί να φέρουν καταρροικά την φυσιολογικού τύπου κωδικοποιούσα αλληλουχία προκειμένου να υπερεκφραστεί η πρωτεΐνη που μελετάται κάθε φορά. Από την παραπάνω διασταύρωση θα προκύψει η F1 γενιά η οποία θα έχει της UAS περιοχή ανοδικά από το επιθυμητό διαγονίδιο, καθώς και τον GAL4 μεταγραφικό παράγοντα ανενεργό. Η ενεργοποίηση της έκφρασης του διαγονιδίου θα πραγματοποιηθεί μετά από την πρόσληψη της ορμόνης από τα έντομα. Η ορμόνη ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα GAL4 ο οποίος με τη σειρά του προκαλεί την έκφραση του διαγονιδίου με τη πρόσδεση του στη UAS περιοχή.

4. Αποτελέσματα

Το *spargel* (*srl*) ανήκει στο γονιδίωμα της *Drosophila* και είναι ομόλογο του *PGC-1*, το οποίο έχει βρεθεί ότι παίζει κεντρικό ρόλο στο ρυθμιστικό δίκτυο που διέπει τον μεταγραφικό έλεγχο της μιτοχονδριακής βιογένεσης και της αναπνευστικής λειτουργίας. Το *PGC-1* εμπλέκεται στην επαγωγή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και στη μεταγραφική ρύθμιση του μονοπατιού της ινσουλίνης, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που κωδικοποιούν μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Επιπλέον, το σηματοδοτικό μονοπάτι της ινσουλίνης επάγει την έκφραση του γονιδίου *PGC-1* και ο παράγοντας *PGC-1* ενεργοποιεί έναν βρόχο αρνητικής ανάδρασης στο συγκεκριμένο μονοπάτι. Συνεπώς, επιλέχθηκε το *spargel* καθώς παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση παροχής θρεπτικών στα μιτοχόνδρια και γενικότερα, στο μεταβολισμό του κυττάρου. Παρόλα αυτά, παραμένει σχετικά άγνωστο αν το *spargel* έχει παρόμοιες λειτουργίες στη *Drosophila* καθώς και αν εμπλέκεται στην ρύθμιση του δικτύου της πρωτεόστασης.

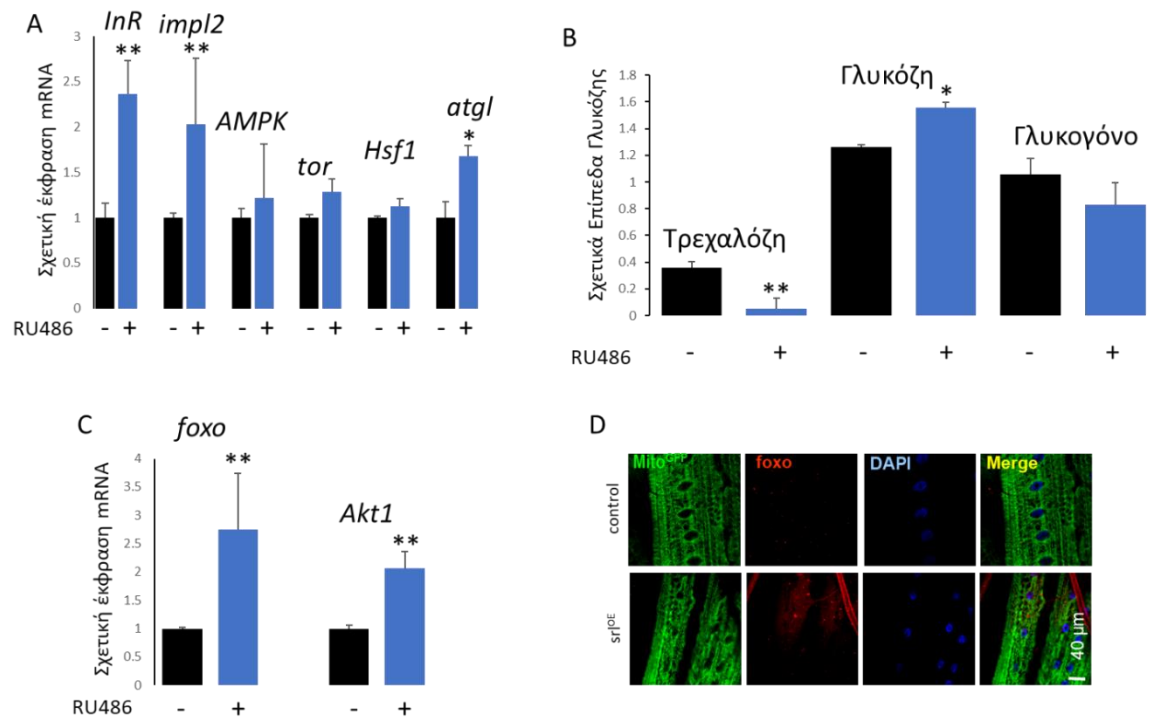
Για να διαλευκάνουμε το ρόλο του σε όσα προαναφέρθηκαν το υπερεκφράσαμε γενετικά σε 3 διαφορετικά ηλικιακά group εντόμων *Drosophila* (νεαρά, μέσης ηλικίας και γηρασμένα). Αρχικά, θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε ότι το *spargel* λειτουργεί σαν συν-παράγοντας για τη μιτοχονδριακή βιογένεση. Τα αρχικά μας αποτελέσματα όσο αφορούν τα νεαρά άτομα δείχνουν: στην εικόνα (**Εικόνα 4.1A**) παρατηρείται αύξηση στο *tfam* το οποίο είναι γονίδιο που ρυθμίζει τα αντίγραφα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και της *Ion* που είναι μια πρωτεάση των μιτοχονδρίων, ενώ παρατηρείται και μια τάση για αύξηση των μιτοχονδριακών γονιδίων το οποίο συνοδεύεται από τάση για αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων, όπως παρατηρείται στην εικόνα (**Εικόνα 4.1B**). Στη σχετική αναλογία όπου φαίνεται η ικανότητα των μιτοχονδρίων να παράγουν ενέργεια μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας του ETC, παρατηρείται τάση για βελτίωση στην παραγωγή ενέργειας μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων το οποίο επίσης μπορεί να προκαλείται μέσω της αύξησης του συνολικού αριθμού των μιτοχονδρίων ή της βελτίωσης της λειτουργικότητας τους (**Εικόνα 4.1C**). Στην οπτικοποίηση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού των μιτοχονδρίων μέσω του ειδικού για τα μιτοχόνδρια, οδηγού στελέχους MitoGFP στο νευρικό σύστημα των διαγονιδιακών λαμβών, παρατηρείται μια τάση για αύξηση στον παραγόμενο φθορισμό οπότε πιθανά υπαρξή παραπάνω μιτοχονδρίων, επιβεβαιώνοντας ότι επάγεται βιογένεση και καλύτερη λειτουργικότητα σε αυτά τα μιτοχόνδρια. Αυτό φαίνεται να προκαλεί αύξηση στην έκφραση μοριακών συνοδών, οι οποίες συμβάλλουν στη εκκαθάριση των ROS εφόσον τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή αυτών (**Εικόνα 4.1D**).

Ωστόσο, δεν παρατηρείται μείωση στα επίπεδα ROS (Εικόνα 4.1E), τα οποία φαίνεται να παραμένουν σε ήδη χαμηλά επίπεδα.



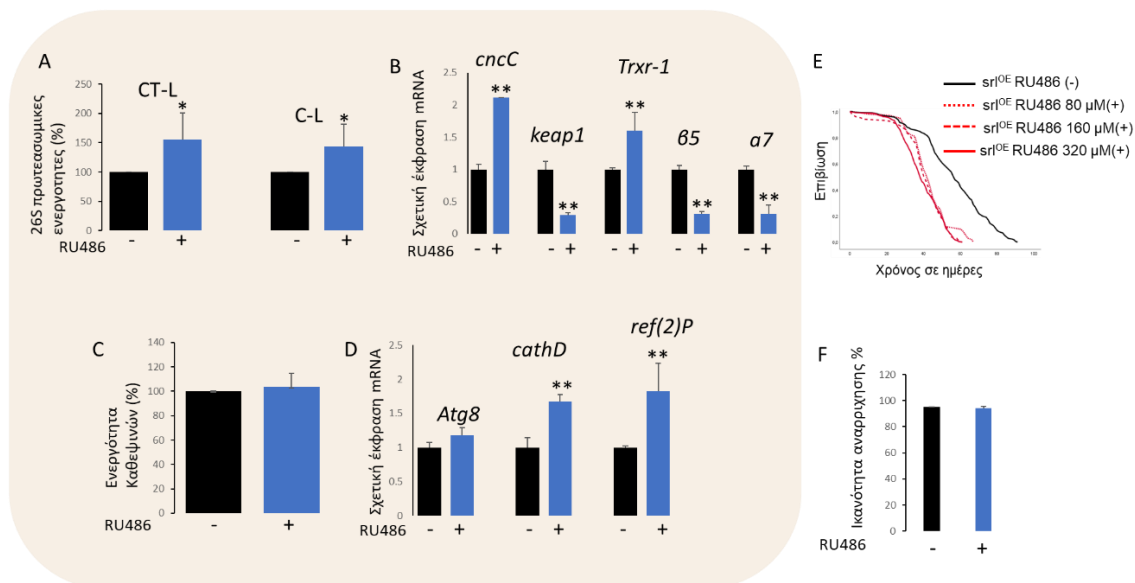
Εικόνα 4.1: (A) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των μιτοχονδριακών γονιδίων (*srl*, *Opa1*, *Marf*, *Drp1*, *ATPsynth-β*, *TFAM*, *lon*). (B) Σχετική αναλογία (%) μιτοχονδριακής αναπνοής. Το ST3:ST4 υποδηλώνει την αποτελεσματικότητα της μιτοχονδριακής αναπνοής. (C) Οπτικοποίηση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού των μιτοχονδρίων μέσω του ειδικού για τα μιτοχόνδρια οδηγού MitoGFP στο νευρικό σύστημα των διαγονιδιακών λαρβών. (D) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των μικρών μοριακών συνοδών (*Hsp70*, *Hsc70-5*). (E) Σχετικά (%) επίπεδα ROS σε σωματικούς ιστούς των διαγονιδιακών εντόμων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε νεαρά έντομα (7-10 ημερών). Το γονίδιο *trp49* χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση αφορά $\pm$ SD*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Λαμβάνοντας υπόψιν την τάση των μιτοχονδρίων για αύξηση και καλύτερη λειτουργικότητα τους κι εφόσον τα μιτοχόνδρια είναι τα εργοστάσια παραγωγής ενέργειας των κυττάρων, αναρωτηθήκαμε εάν η υπερέκφραση του *spargel* προκαλεί αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ των συγκεκριμένων εντόμων. Με την υπερέκφραση του *spargel* παρατηρήθηκε αύξηση στα γονίδια τα οποία ρυθμίζουν τον μεταβολισμό (Εικόνα 4.2A). Αυτή η ενεργοποίηση φαίνεται να προκάλεσε μείωση της τρεχαλόξης (Εικόνα 4.2B) στην κυκλοφορία των εντόμων, η οποία συνοδεύτηκε από αύξηση της γονιδιακής (Εικόνα 4.2C) και πρωτεϊνικής (Εικόνα 4.2D) έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων *foxo* και *Akt1* (Εικόνα 4.2C), οι οποίοι ρυθμίζουν μεταβολικά μονοπάτια.



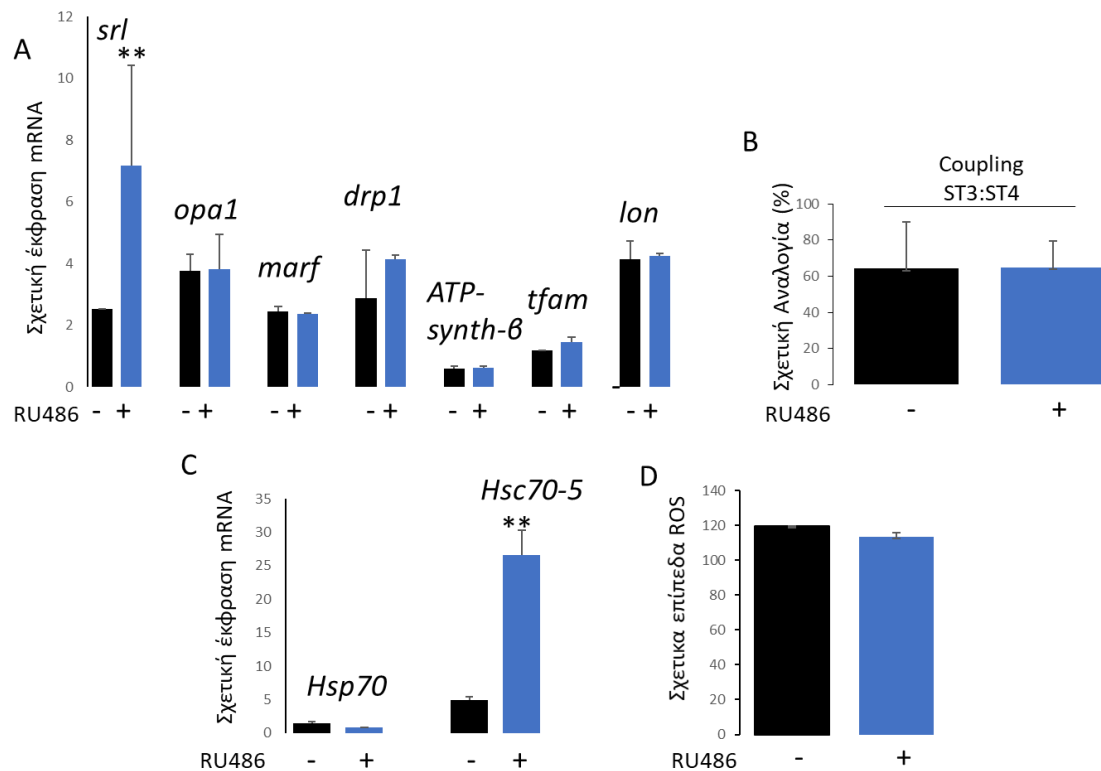
Εικόνα 4.2: (A) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *InR*, *Impl2*, *AMPK*, *tor*, *Hsf1* και *atgl* ύστερα από υπερέκφραση του *srl*. (B) Σχετικά επίπεδα τρεχαλόζης, γλυκόζης και γλυκογόνου σε σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων. (C) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *foxo*, *Akt1* ύστερα από υπερέκφραση του *srl* και (D) Οπτικοποίηση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού της κατανομής των μιτοχονδρίων (MitoGFP) και του *foxo* (χρώση ανοσοφθορισμού) στον μύ των διαγονιδιακών λαρβών. Οι πυρήνες χρωματίστηκαν με DAPI. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε νεαρά έντομα (7-10 ημερών). Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση αφορά $\pm SD$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Ύστερα από την παρατήρηση της ενεργοποίησης του *foxo*, τόσο σε επίπεδο γονιδίου όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης, αναρωτηθήκαμε αν η υπερέκφραση του *srl* προκαλεί αλλαγές ή ρυθμίζει και το δίκτυο της πρωτεόστασης. Ύστερα από υπερέκφραση του στα νεαρά άτομα, παρατηρήσαμε αύξηση στην ενεργότητα του πρωτεασώματος (**Εικόνα 4.3A**) και αύξηση στην έκφραση κυρίως του μεταγραφικού παράγοντα *cncC* και των γονιδίων του *Trxr-1* (**Εικόνα 4.3B**). Παράλληλα, παρατηρήθηκε τάση για αύξηση στην ενεργότητα στις καθεψίνες του λυσοσώματος (**Εικόνα 4.3C**) και αύξηση στην έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζουν το μονοπάτι αυτοφαγίας- λυσοσώματος (**Εικόνα 4.3D**), υποδηλώνοντας μια γενικευμένη ενεργοποίηση των πρωτεολυτικών συστημάτων του οργανισμού. Παρόλα αυτά, όσον αφορά τη μακροβιότητα η υπερέκφραση του *spargel* δε φαίνεται να είναι ευεργετική για τη ζωή των εντόμων όπως παρατηρούμε στις καμπύλες μακροβιότητας (**Εικόνα 4.3E**).



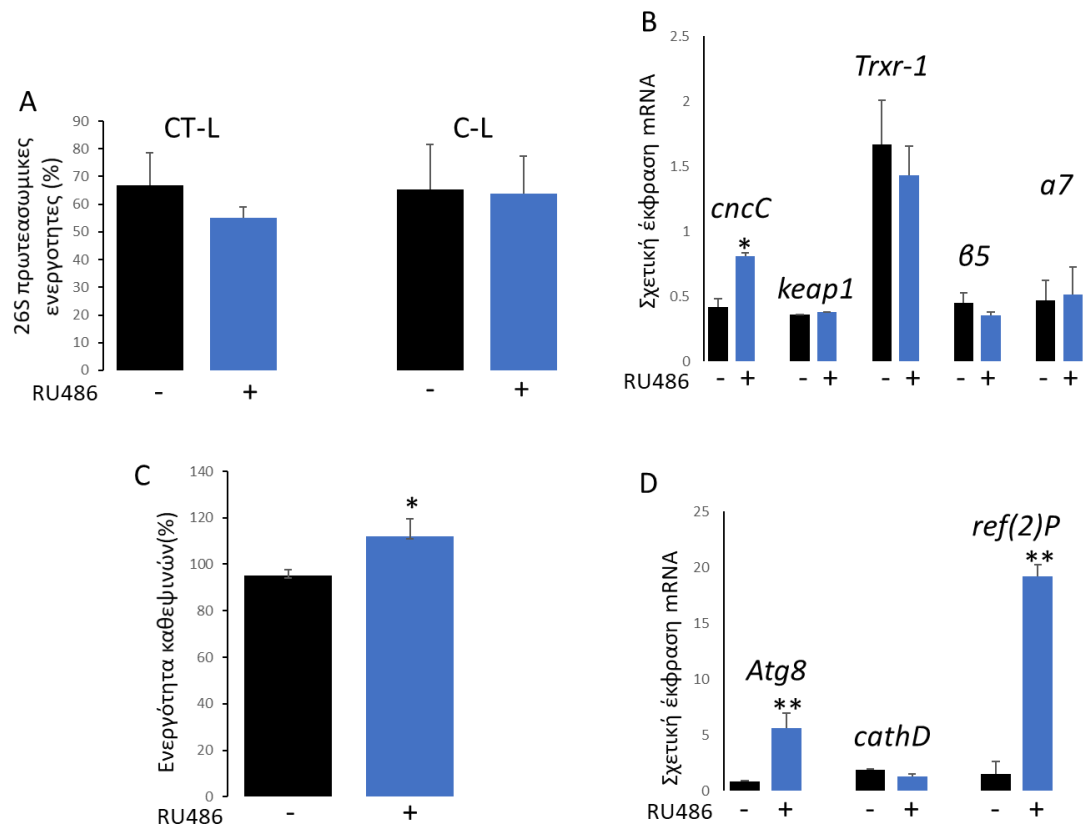
Εικόνα 4.3: (A) Σχετικές (%) 26S πρωτεασωμικές ενεργότητες χυμοθρυψίνης (CT-L) και κασπάσης (C-L) σε σωματικούς ιστούς των διαγονιδιακών εντόμων. (B) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι *cncC/keap1* (*cncC*, *keap1*, *Trxr-1*, *Prosβ5*, *Prosa7*). (C) Σχετική (%) ενεργότητα καθελυγών σε σωματικούς ιστούς νεαρών ατόμων (D) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των αυτοφαγικών γονιδίων [*Atg8*, *cathD*, *ref(2)p*] σε σωματικούς ιστούς νεαρών εντόμων. (E) Αντιπροσωπευτικές καμπύλες μακροβιότητας των διαγονιδιακών εντόμων απουσία [RU486 (-)] ή παρουσία [RU486 (+)] της ορμόνης RU486 στις τρεις χορηγηθείσες συγκεντρώσεις. Η επαγωγή του διαγονιδίου παρουσιάζεται με κόκκινο βέλος. (F) Ικανότητα αναρρίχησης % των διαγονιδιακών εντόμων ύστερα από χορήγηση 160 μM (μεσαία συγκέντρωση) της ορμόνης RU486. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε νεαρά έντομα (7-10 ημερών). Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. Στο διάγραμμα η τυπική απόκλιση αφορά $\pm SD$ *, $P < 0.05$.

Στα άτομα μέσης ηλικίας, δεν παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των μιτοχονδριακών γονιδίων, με μόνη εξαίρεση την έκφραση της *drp1* (**Εικόνα 4.4A**) που είναι η κύρια πρωτεΐνη που ρυθμίζει την σχάση των μιτοχονδρίων. Παρόλα αυτά όλα τα γονίδια φάνηκαν να εμφανίζουν αυξημένη έκφραση ακόμα και σε επίπεδα διαρροής του διαγονιδίου (transgene leakage) σε σχέση με τα νεαρά έντομα. Επιπρόσθετα, στα έντομα μέσης ηλικίας δε φαίνεται να υπάρχει διαφορά στην ικανότητα των μιτοχονδρίων να παράγουν ενέργεια μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας του ETC, οπότε δεν παρατηρείται τάση για βελτίωση στην παραγωγή ενέργειας μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (**Εικόνα 4.4B**). Ωστόσο, υπάρχει αύξηση στην έκφραση μοριακών συνοδών οι οποίες συμβάλλουν στη εκκαθάριση των ROS (**Εικόνα 4.4C**) αλλά μια τάση για μείωση των επιπέδων ROS (**Εικόνα 4.4D**) των εντόμων.



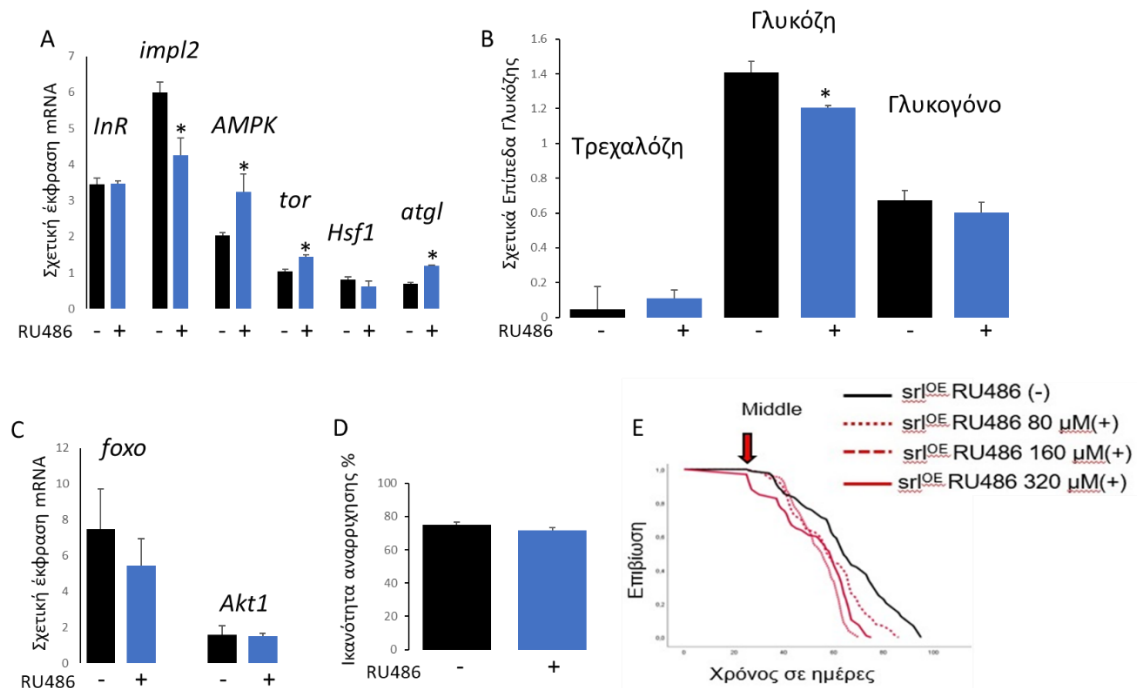
Εικόνα 4.4: (A) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των μιτοχονδριακών γονιδίων (*srl*, *Opa1*, *Marf*, *Drp1*, *ATPsynth-β*, *TFAM*, *lon*). (B) Σχετική αναλογία (%) μιτοχονδριακής αναπνοής. Το ST3:ST4 υποδηλώνει την αποτελεσματικότητα της μιτοχονδριακής αναπνοής. (C) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των μικρών μοριακών συνοδών (*Hsp70*, *Hsc70-5*). (D) Σχετικά (%) επίπεδα ROS σε σωματικούς ιστούς των διαγονιδιακών εντόμων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε έντομα μέσης ηλικίας (27-30 ημερών). Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. Στα διαγράμματα, η τυπική απόκλιση αφορά $\pm SD$ *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Ακόμα, ύστερα από την υπερέκφραση του *srl*, στα άτομα μέσης ηλικίας, δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ενεργότητα του πρωτεασώματος (**Εικόνα 4.5A**) αλλά παρόμοια με τα νεαρά έντομα, αύξηση στην έκφραση, κυρίως, του μεταγραφικού παράγοντα *cncC* (**Εικόνα 4.5B**). Παράλληλα, παρατηρήθηκε τάση για αύξηση στις ενεργότητες των καθεψινών του λυσοσώματος (**Εικόνα 4.5C**) και αύξηση στην έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζουν το μονοπάτι της αυτοφαγίας-λυσοσώματος (**Εικόνα 4.5D**), υποδηλώνοντας και πάλι ενεργοποίηση του δικτύου της πρωτεόστασης αλλά αυτή την φορά μόνο του βρόγχου της αυτοφαγίας.



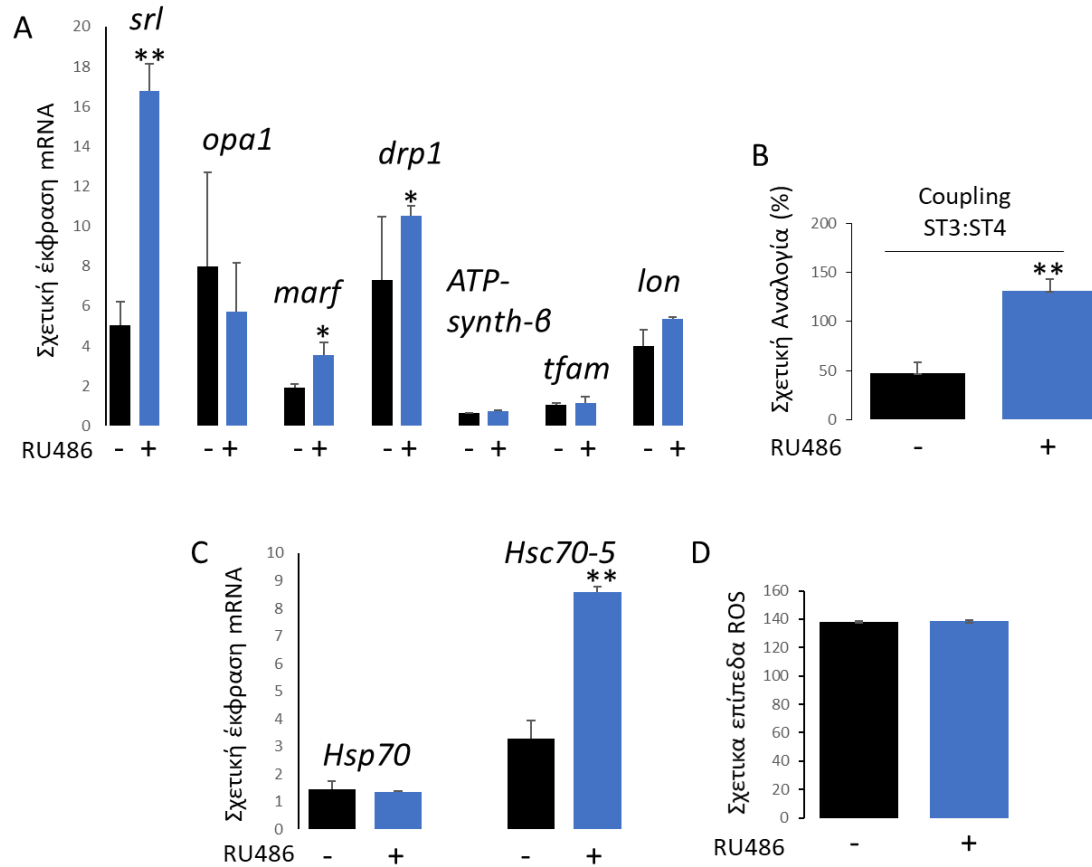
Εικόνα 4.5: (Α) Σχετικές (%) 26S πρωτεασωμικές ενεργότητες χυμοθρυψίνης (CT-L) και κασπάσης (C-L) σε σωματικούς ιστούς των διαγονιδιακών εντόμων. (Β) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι *cncC/keap1* (*cncC*, *keap1*, *Trxr-1*, *Prosβ5*, *Prosa7*). (C) Σχετική (%) ενεργότητα καθεψινών σε σωματικούς ιστούς ατόμων μέσης ηλικίας (D) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των αυτοφαγικών γονιδίων [*Atg8*, *cathD*, *ref(2)p*] σε σωματικούς ιστούς εντόμων μέσης ηλικίας. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε έντομα μέσης ηλικίας (27-30 ημερών). Το γονίδιο *trp49* χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. Στο διάγραμμα η τυπική απόκλιση αφορά $\pm SD$ *, $P < 0.05$.

Σε σχέση με το μεταβολισμό των συγκεκριμένων εντόμων, ύστερα από υπερέκφραση του *spargel*, το άτομα μέσης ηλικίας έχουν παρόμοια απόκριση με αυτή των νεαρών ατόμων καθώς παρατηρείται αύξηση στην έκφραση μεταβολικών γονιδίων, τα βασικά επίπεδα των οποίων βρίσκονται και πάλι αυξημένα σε σχέση με τα νεαρά έντομα ακόμα και σε επίπεδα διαρροής του διαγονιδίου (Εικόνα 4.6Α). Επίσης, παρατηρείται αύξηση της τρεχαλόζης (Εικόνα 4.6Β) και μείωση των μεταγραφικών παραγόντων *foxo* και *Akt1* (Εικόνα 4.6C). Όσον αφορά τη μακροβιότητα, η υπερέκφραση του *spargel* δε φαίνεται, και πάλι, να είναι ευεργετική για τη ζωή των εντόμων, όπως παρατηρούμε στις καμπύλες μακροβιότητας (Εικόνα 4.6Ε).



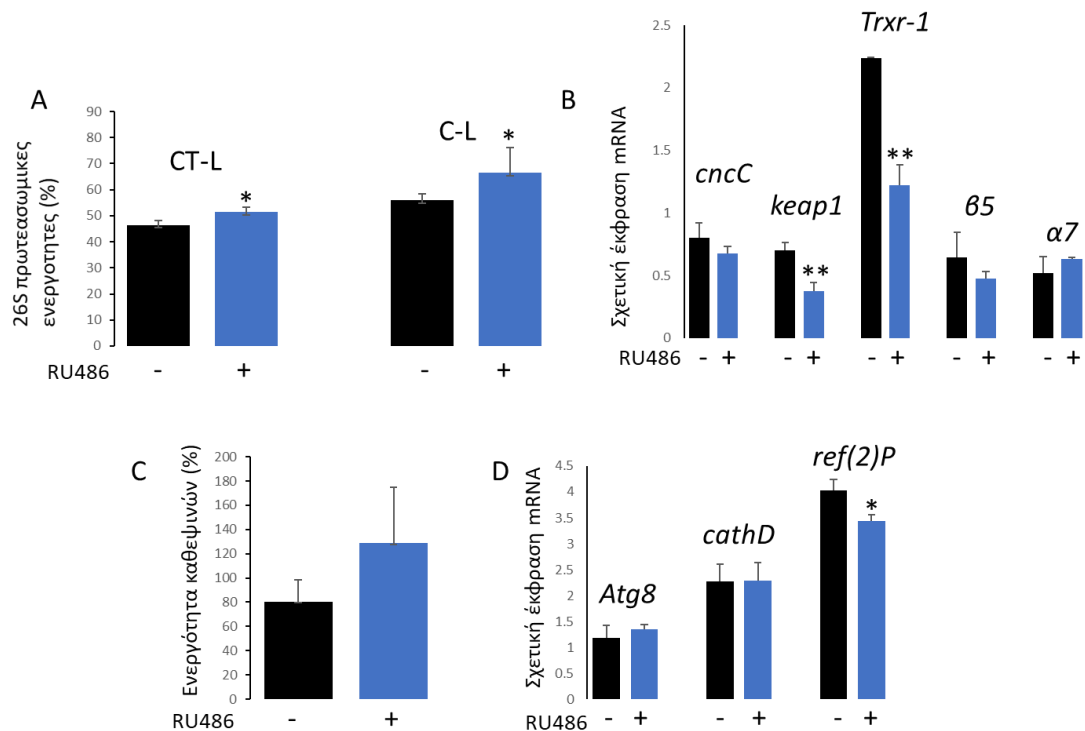
Εικόνα 4.6: (A) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *InR*, *Impl2*, *AMPK*, *tor*, *Hsf1* και *atgl* ύστερα από υπερέκφραση του *srl*. (B) Σχετικά επίπεδα τρεχαλόζης, γλυκόζης και γλυκογόνου σε σωματικούς ιστούς εντόμων μέσης ηλικίας. (C) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *foxo*, *Akt1* ύστερα από υπερέκφραση του *srl* και (D) Ικανότητα αναρρίχησης % των διαγονιδιακών εντόμων ύστερα από χορήγηση 160 μM (μεσαία συγκέντρωση) της ορμόνης RU486 (E) Αντιπροσωπευτικές καμπύλες μακροβιότητας των διαγονιδιακών εντόμων απουσία [RU486 (-)] ή παρουσία [RU486 (+)] της ορμόνης RU486 στις τρεις χορηγηθείσες συγκεντρώσεις. Η επαγωγή του διαγονιδίου παρουσιάζεται με κόκκινο βέλος. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε έντομα μέσης ηλικίας (27-30 ημερών). Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση αφορά $\pm SD$ *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Όπως και στα άτομα μέσης ηλικίας, στα γηρασμένα άτομα παρατηρείται αύξηση στη *dpr1* που είναι η κύρια πρωτεΐνη που ρυθμίζει την σχάση των μιτοχονδρίων (Εικόνα 4.7A). Ωστόσο, φαίνεται να υπάρχει διαφορά στην ικανότητα των μιτοχονδρίων να παράγουν ενέργεια μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (Εικόνα 4.7B). Οπότε, αυτή η βελτίωση στο δίκτυο της μιτόστασης οδηγεί και σε αύξηση στην έκφραση μοριακών συνοδών, οι οποίες συμβάλλουν στην εκκαθάριση των ROS (Εικόνα 4.7C) αλλά και πάλι παρόμοια με τα νεαρά και τα μέσης ηλικίας έντομα δεν παρατηρείται διαφοροποίηση στα επίπεδα ROS (Εικόνα 4.7D).



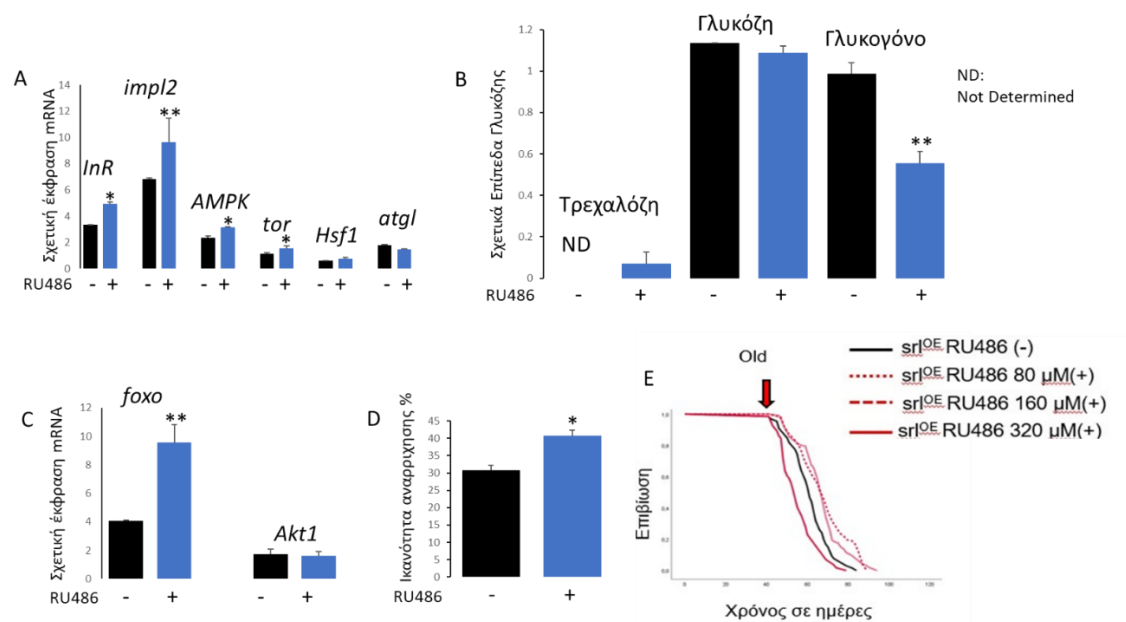
Εικόνα 4.7: Η υπερέκφραση του *spargel* σε γηρασμένα άτομα επάγει την έκφραση μιτοχονδριακών γονιδίων και βελτιώνει τη λειτουργικότητά τους. (A) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των μιτοχονδριακών γονιδίων (*srl*, *Opa1*, *Marf*, *Drp1*, *ATPsynth-β*, *TFAM*, *lon*). (B) Σχετική αναλογία (%) μιτοχονδριακής αναπνοής. Το ST3:ST4 υποδηλώνει την αποτελεσματικότητα της μιτοχονδριακής αναπνοής. (C) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των μικρών μοριακών συνοδών (*Hsp70*, *Hsc70-5*). (D) Σχετικά (%) επίπεδα ROS σε σωματικούς ιστούς των διαγονιδιακών εντόμων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε γηρασμένα έντομα (57-60 ημερών). Το γονίδιο *gp49* χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση αφορά $\pm SD$ *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Ύστερα από υπερέκφραση του *srl* στα γηρασμένα άτομα, επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση στην ενεργότητα του πρωτεασώματος (**Εικόνα 4.8A**) αλλά χωρίς διαφορές στην έκφραση γονιδίων από αφορούν την πρωτεόσταση (**Εικόνα 4.8B**). Παράλληλα, παρατηρήθηκε τάση για αύξηση στην ενεργότητα των καθεψινών του λυσοσώματος (**Εικόνα 4.8C**) και μείωση στην έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζουν το μονοπάτι της αυτοφαγίας- λυσοσώματος όπως είναι ο *ref(2)p* (**Εικόνα 4.8D**).



Εικόνα 4.8: (A) Σχετικές (%) 26S πρωτεασωμικές ενεργότητες χυμοθρυψίνης (CT-L) και κασπάσης (C-L) σε σωματικούς ιστούς των διαγονιδιακών εντόμων. (B) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι *cncC/keap1* (*cncC*, *keap1*, *Trxr-1*, *Prosβ5*, *Prosa7*). (C) Σχετική (%) ενεργότητα καθεψινών σε σωματικούς ιστούς γηρασμένων ατόμων (D) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των αυτοφαγικών γονιδίων [*Atg8*, *cathD*, *ref(2)p*] σε σωματικούς ιστούς γηρασμένων εντόμων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε γηρασμένα έντομα (57-60 ημερών). Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. Στο διάγραμμα η τυπική απόκλιση αφορά $\pm SD$ *, $P < 0.05$.

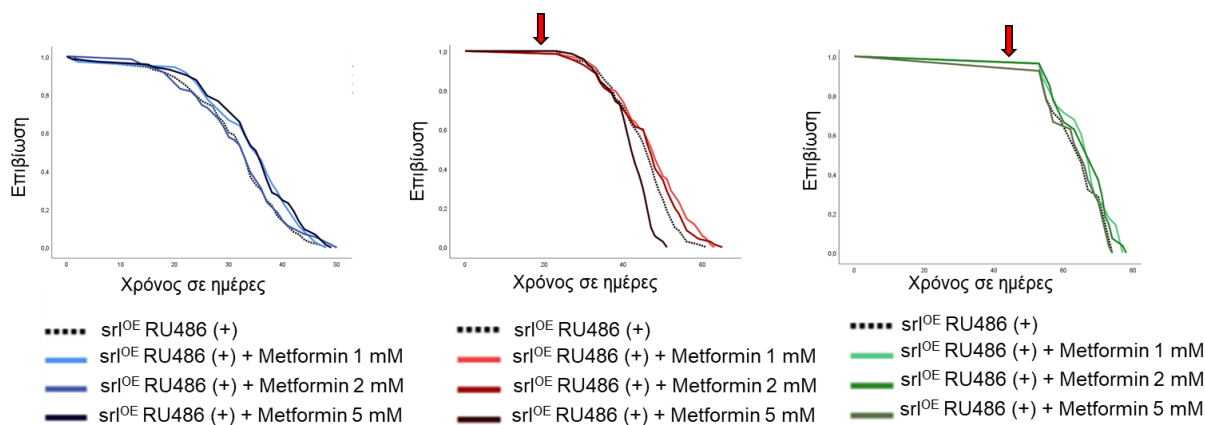
Τέλος, παρόμοια με τα νεαρά και τα μέσης ηλικίας άτομα, παρατηρήθηκε και στα γηρασμένα άτομα ότι η υπερέκφραση του *spargel* προκάλεσε αύξηση στα γονίδια τα οποία ρυθμίζουν τον μεταβολισμό (Εικόνα 4.9A), η οποία συνοδεύτηκε και από μείωση των επιπέδων του γλυκογόνου (Εικόνα 4.9B). Επίσης, παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *foxo* (Εικόνα 4.9C). Παρόλα αυτά, και σε αντίθεση με τα νεαρά και μέσης ηλικίας έντομα, η ηπιότερη υπερέκφραση του *spargel* στα γηρασμένα έντομα φάνηκε να είναι ευεργετική για τη ζωή των εντόμων, όπως παρατηρούμε στις καμπύλες μακροβιότητας (Εικόνα 4.9E).



Εικόνα 4.9: (A) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *inR*, *Impl2*, *AMPK*, *tor*, *Hsf1* και *atgl* ύστερα από υπερέκφραση του *srl*. (B) Σχετικά επίπεδα τρεχαλόζης, γλυκόζης και γλυκογόνου σε σωματικούς ιστούς γηρασμένων εντόμων. (C) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *foxo*, *Akt1* ύστερα από υπερέκφραση του *srl* και (D) Ικανότητα αναρρίχησης % των διαγονιδιακών εντόμων ύστερα από χορήγηση 160 μM (μεσαία συγκέντρωση) της ορμόνης RU486 (E) Αντιπροσωπευτικές καμπύλες μακροβιότητας των διαγονιδιακών εντόμων απουσία [RU486 (-)] ή παρουσία [RU486 (+)] της ορμόνης RU486 στις τρεις χορηγηθείσες συγκεντρώσεις. Η επαγωγή του διαγονιδίου παρουσιάζεται με κόκκινο βέλος. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε γηρασμένα έντομα (57-60 ημερών). Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τον έλεγχο του ισοφορτώματος. Στα διαγράμματα η τυπική απόκλιση αφορά $\pm SD$ *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Παρά την παρατηρηθείσα ενεργοποίηση του δικτύου της πρωτεόστασης ύστερα από την επαγωγή του μεταγραφικού συνενεργοποιητή spargel ο γενετικός χειρισμός φάνηκε να μην έχει ευεργετικές ιδιότητες σε σχέση με την μακροβιότητα των νεαρών και των μέσης ηλικίας εντόμων. Γνωρίζοντας επίσης ότι η υπερέκφραση του spargel προκαλεί μεταβολικό αναπρογραμματισμό και μείωση των επιπέδων των σακχάρων των εντόμων, αναρωτηθήκαμε εάν αυτό συμβάλλει στην μείωση της μακροβιότητας. Για να ελέγξουμε την υπόθεση μας αυτή χορηγήσαμε στα διαγονιδιακά έντομα *D. Melanogaster* τον φαρμακολογικό παράγοντα μετφορμίνη ο οποίος φυσιολογικά χορηγείται σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 για την μείωση των επιπέδων σακχάρου. Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν ότι η μετφορμίνη δρα ως αντιγηραντικός παράγοντας και ρυθμίζει τη μικροχλωρίδα, προάγοντας την υγεία (Pryor and Cabreiro, 2015). Η χορήγηση μετφορμίνης πραγματοποιήθηκε και στις τρεις ηλικιακές ομάδες διαγονιδιακών εντόμων σε τρεις

διαφορετικές συγκεντρώσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις φάνηκε ότι η χορήγηση της μετφορμίνης προκάλεσε αύξηση της μακροβιότητας των εντόμων αλλά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (**Εικόνα 4.10**)



Εικόνα 4.10: Αντιπροσωπευτικές καμπύλες μακροβιότητας των διαγονιδιακών εντόμων παρουσία [RU486 (+)] της ορμόνης RU486 στις τρεις χορηγηθείσες συγκεντρώσεις μετφορμίνης. Η επαγωγή του διαγονιδίου παρουσιάζεται με κόκκινο βέλος. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε νεαρά, μέσης ηλικίας και γηρασμένα έντομα.

Συγκεκριμένα, στα νεαρά έντομα η μεγαλύτερη συγκέντρωση μετφορμίνης επέφερε τα καλύτερα αποτελέσματα, ενώ στα μέσης ηλικίας και γηρασμένα η μεσαία και η μικρότερη συγκέντρωση αυτής.

Με βάση αυτές μας τις παρατηρήσεις η επαγωγή γλυκόλυσης ύστερα από την έκφραση του spargel δεν είναι ο κύριος λόγος μείωσης της μακροβιότητας των εντόμων και περισσότερα πειράματα απαιτούνται για την διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης του spargel στο δίκτυο της πρωτεόστασης και στον κυτταρικό μεταβολισμό στη *D. melanogaster*.

5. Συζήτηση

Το *srl* πιστεύεται ότι είναι ο κύριος διαμεσολαβητής της μιτοχονδριακής βιογένεσης. Είναι γνωστό ότι ενεργοποιείται από πολλούς παράγοντες, όπως οι ROS και τα αντιδραστικά είδη αζώτου (RNS), ύστερα από νηστεία, ύστερα από άσκηση αντοχής, από την πρωτεϊνική κινάση B/Akt η οποία πιστεύεται ότι μειορυθμίζει το *PGC-1α* και μέσω της SIRT1 που δεσμεύει και ενεργοποιεί το *PGC-1α* μέσω αποακετυλίωσης, προκαλώντας γλυκονεογένεση χωρίς να επηρεάζει τη μιτοχονδριακή βιογένεση. Καθίσταται, λοιπόν, σαφής ο ρόλος του *srl* όχι μόνο ως ένα γονίδιο-ρυθμιστής της μιτοχονδριακής βιογένεσης αλλά και ως κύριος τελεστής του κυτταρικού μεταβολισμού με πιθανή δράση και στο δίκτυο της πρωτεόστασης. Τα αποτελέσματα μας υποδηλώνουν την εμπλοκή του *srl* στη ρύθμιση μιτοστατικών και πρωτεοστατικών αποκρίσεων.

Συγκεκριμένα, ύστερα από υπερέκφραση του *srl* σε νεαρά έντομα παρατηρήθηκε αυξορύθμιση στην έκφραση μιτοχονδριακών γονιδίων, ήπια βελτίωση της μιτοχονδριακής αναπνοής αλλά όχι σημαντική αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων ή μείωση των επιπέδων ROS του οργανισμού. Παράλληλα, η υπερέκφραση του *srl* στα νεαρά έντομα προκάλεσε μεταβολικό αναπρογραμματισμό, μέσω μείωσης της τρεχαλόξης και του γλυκογόνου από την κυκλοφορία των εντόμων και ταυτόχρονη ενεργοποίηση του *foxo* και της *Akt1*. Τέλος, βρέθηκε ενεργοποίηση του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος σε επίπεδο ενζυμικής ενεργότητας, με παράλληλη μείωση της γονιδιακής έκφρασης των β5 και α7 πρωτεασωμικών υπομονάδων, πιθανά ως ένας μηχανισμός ανάδρασης. Παρόμοια με τα δικά μας ευρήματα, η ρεσβερατρόλη έχει δείχθει ότι μπορεί να αυξήσει την έκφραση του *PGC-1α* στα ποντίκια και ταυτόχρονα να αυξήσει την ενεργότητα του πρωτεασώματος (Nishigaki A., 2020), ενώ η μειορύθμιση του *PGC-1α* έχει φανεί ότι μειώνει την πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L) (Miller KN, 2019). Ως προς το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος, παρατηρήθηκε μια τάση για αύξηση της ενεργότητας των καθεψινών με μια παράλληλη ενεργοποίηση του μεταγραφικού ρυθμού των αυτοφαγικών γονιδίων *cathD* και *ref(2)P*. Όπως έχει δείχθει και σε προηγούμενες εργασίες, η υπερέκφραση του *PGC-1α* αυξάνει την έκφραση των λυσοσωμικών και μιτοφαγικών υποδοχέων πιθανά μέσω του μεταγραφικού παράγοντα EB (TFEB) (Kang C, 2015). Συνολικά, όμως, η αυξημένη ενεργοποίηση του *srl* σε νεαρά- υγιή έντομα δεν επέφερε ευεργετικά αποτελέσματα στην μακροβιότητα και την ικανότητα αναρρίχησης των οργανισμών. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με την παρατήρηση ότι υπερέκφραση του *srl* σε όλο το σώμα προκαλεί μείωση της μακροβιότητας (Merzetti, 2015)

Σε έντομα μέσης ηλικίας, η υπερέκφραση του *srl* δεν προκάλεσε αλλαγές στην έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων, ή της μιτοχονδριακής αναπνοής, ενώ παρατηρήθηκε μια τάση για μείωση των ROS των εντόμων. Ως προς το δίκτυο της πρωτεόστασης σε αντίθεση με τα νεαρά έντομα βρέθηκε μείωση των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων αλλά παρομοίως με τα νεαρά, αύξηση της ενεργότητας των καθεψινών του λυσοσώματος και της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *chcC* και των αυτοφαγικών γονιδίων *atg8* και *ref(2)P*. Επιπρόσθετα, παρόμοια με τα νεαρά έντομα, η γλυκόζη της κυκλοφορίας, καθώς και το αποθηκευτικό σάκχαρο - γλυκογόνο φάνηκαν να μειώνονται προκαλώντας και πάλι μεταβολικές αλλαγές και μείωση της μακροβιότητας.

Στα γηρασμένα έντομα, η υπερέκφραση του *srl* προκάλεσε μια τάση για ενεργοποίηση της έκφρασης των μιτοχονδριακών γονιδίων και στατιστικά σημαντική βελτίωση της μιτοχονδριακής αναπνοής, χωρίς και πάλι να παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα ROS του οργανισμού. Ως προς το δίκτυο της πρωτεόστασης παρατηρήθηκε αύξηση των ενεργοτήτων του πρωτεασώματος και των καθεψινών του λυσοσώματος. Σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης παρατηρήθηκε τάση για αύξηση μόνο της $\alpha 7$ πρωτεασωμικής υπομονάδας. Επιπρόσθετα, παρόμοια με τα νεαρά και τα μέσης ηλικίας έντομα παρατηρήθηκε μεταβολικός αναπρογραμματισμός με μείωση του γλυκογόνου και αύξηση της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα *foxo*. Τέλος, διαπιστώθηκε πως έντονη ενεργοποίηση του *srl* προκάλεσε μείωση της μακροβιότητας ενώ ηπιότερη υπερέκφραση προκάλεσε στατιστικά σημαντική αύξηση αυτής καθώς και βελτίωση της ικανότητας αναρρίχησης των εντόμων.

Συνολικά, λοιπόν, φάνηκε ότι το *srl* ρυθμίζει το δίκτυο της πρωτεόστασης με τρόπο ηλικιο-εξαρτώμενο και πιθανά μέσω της ρύθμισης των μεταγραφικών παραγόντων *chcC* και *foxo*. Σε νεαρά αλλά και μέσης ηλικίας άτομα τόσο η έντονη όσο και ηπιότερη ενεργοποίηση του *srl* προκαλούν αλλαγές στην φυσιολογία του οργανισμού με αποτέλεσμα την μείωση της μακροβιότητας. Δεδομένης της ισχύος του *srl*, η δραστηριότητά του θα πρέπει να ελέγχεται αυστηρά σύμφωνα με τις ενεργειακές ανάγκες και τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών. Πράγματι, η χρόνια υπερέκφραση του *PGC-1 α* στην καρδιά έχει φανεί να οδηγεί σε τοξικότητα που προκαλεί μυοκαρδιοπάθεια λόγω του έντονου πολλαπλασιασμού των μιτοχονδρίων (Oka SI, 2020). Αντιθέτως, σε γηρασμένα άτομα όπου η λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων έχει αρχίσει να μειώνεται, ήπια ενεργοποίηση του *srl* προκαλεί αύξηση της μακροβιότητας. Σε αντίθεση, βέβαια, με την πεποίθηση ότι το *srl* λειτουργεί ως επαγωγέας της βιογένεσης των μιτοχονδρίων, αυτό δεν επιβεβαιώθηκε από την μελέτη μας. Πιθανόν

αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε έναν υγιή-νεαρό οργανισμό η μιτοχονδριακή βιογένεση λαμβάνει χώρα ήδη και αυξημένη ενεργοποίηση του *srl* δε μπορεί να επάγει περαιτέρω βιογένεση.

6. Βιβλιογραφία

1. Alberts, B. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland.
2. Aldridge, A.C., Benson, L., Siegenthaler, M.M., Whigham, B.T., Stowers, R.S. and Hales, K.G. (2007). Roles for Drp1, a Dynamin-related Protein, and Milton, a Kinesin-associated Protein, in Mitochondrial Segregation, Unfurling, and Elongation During *Drosophila* Spermatogenesis. *Fly*, 1(1), pp.38–46. doi:10.4161/fly.3913.
3. Alirol, E., James, D., Huber, D., Marchetto, A., Vergani, L., Martinou, J.-C. and Scorrano, L. (2006). The Mitochondrial Fission Protein hFis1 Requires the Endoplasmic Reticulum Gateway to Induce Apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, 17(11), pp.4593–4605. doi:10.1091/mbc.e06-05-0377.
4. Almond, J. and Cohen, G. (2002). The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, [online] 16(4), pp.433–443. doi:10.1038/sj.leu.2402417.
5. Alvarez-Delgado C, Mendoza-Rodríguez CA, Picazo O, Cerbón M. Different expression of alpha and beta mitochondrial estrogen receptors in the aging rat brain: interaction with respiratory complex V. *Exp Gerontol*. 2010 Aug;45(7-8):580-5. doi: 10.1016/j.exger.2010.01.015.
6. Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1695(1-3), pp.189–207. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.10.003.
7. Antignani, A. and Youle, R.J. (2006). How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6), pp.685–689. doi:10.1016/j.ceb.2006.10.004
8. Arendt, C.S. and Hochstrasser, M. (1997). Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(14), pp.7156–7161. doi:10.1073/pnas.94.14.7156.
9. Arnould, D. (2007). Mitochondrial fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology*, [online] 17(1), pp.6–12. doi:10.1016/j.tcb.2006.11.001.
10. Bader, N., Jung, T. and Grune, T. (2007). The proteasome and its role in nuclear protein maintenance. *Experimental Gerontology*, 42(9), pp.864–870. doi:10.1016/j.exger.2007.03.010.
11. Bailey, C.J. (2017). Metformin: historical overview. *Diabetologia*, [online] 60(9), pp.1566–1576. doi:10.1007/s00125-017-4318-z.
12. Baltzer, C., Tiefenböck, S.K. and Frei, C. (2010). Mitochondria in response to nutrients and nutrient-sensitive pathways. *Mitochondrion*, 10(6), pp.589–597. doi:10.1016/j.mito.2010.07.009.
13. Batandier, C., Guigas, B., Demaille, D., El-Mir, M., Fontaine, E., Rigoulet, M. and Leverve, X.M. (2006). The ROS Production Induced by a Reverse-Electron Flux at Respiratory-Chain Complex 1 is Hampered by Metformin. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 38(1), pp.33–42. doi:10.1007/s10863-006-9003-8.
14. Bereiter-Hahn, J. and Vöth, M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy Research and Technique*, 27(3), pp.198–219. doi:10.1002/jemt.1070270303
15. Bhat, A. (2015). Systematic review: Preventive and therapeutic applications of metformin in liver disease. *World Journal of Hepatology*, 7(12), p.1652. doi:10.4254/wjh.v7.i12.1652.
16. Blonde, L., Dipp, S. and Cadena, D. (2018). Correction to: Combination Glucose-Lowering Therapy Plans in T2DM: Case-Based Considerations. *Advances in Therapy*, 35(7), pp.966–966. doi:10.1007/s12325-018-0729-6.
17. Breining, P., Jensen, J.B., Sundelin, E.I., Gormsen, L.C., Jakobsen, S., Busk, M., Rolighed, L., Bross, P., Fernandez-Guerra, P., Markussen, L.K., Rasmussen, N.E., Hansen, J.B., Pedersen, S.B., Richelsen, B. and Jessen, N. (2018). Metformin targets brown adipose tissue in vivo and reduces oxygen consumption in vitro. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, [online] 20(9), pp.2264–2273. doi:10.1111/dom.13362.
18. Celniker SE, Rubin GM. The *Drosophila melanogaster* genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2003;4:89-117. doi: 10.1146/annurev.genom.4.070802.110323. PMID: 14527298.

19. Cereghetti, G.M., Costa, V. and Scorrano, L. (2010). Inhibition of Drp1-dependent mitochondrial fragmentation and apoptosis by a polypeptide antagonist of calcineurin. *Cell Death & Differentiation*, 17(11), pp.1785–1794. doi:10.1038/cdd.2010.61.
20. Cereghetti, G.M., Stangherlin, A., Martins de Brito, O., Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P. and Scorrano, L. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [online] 105(41), pp.15803–15808. doi:10.1073/pnas.0808249105.
21. Chen, H., Chomyn, A. and Chan, D.C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *The Journal of Biological Chemistry*, [online] 280(28), pp.26185–26192. doi:10.1074/jbc.M503062200.
22. Chen, Y. and Dorn, G.W. (2013). PINK1-Phosphorylated Mitofusin 2 Is a Parkin Receptor for Culling Damaged Mitochondria. *Science*, 340(6131), pp.471–475. doi:10.1126/science.1231031.
23. Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L. and Green, D.R. (2006). Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death & Differentiation*, 13(8), pp.1396–1402. doi:10.1038/sj.cdd.4401963.
24. Chondrogianni, N., Stratford, F.L.L., Trougakos, I.P., Friguet, B., Rivett, A.J. and Gonos, E.S. (2003). Central Role of the Proteasome in Senescence and Survival of Human Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), pp.28026–28037. doi:10.1074/jbc.m301048200.
25. Cipolat, S., de Brito, O.M., Dal Zilio, B. and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45), pp.15927–15932. doi:10.1073/pnas.0407043101.
26. Cuervo, A.M. (2004). Autophagy: Many paths to the same end. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263(1/2), pp.55–72. doi:10.1023/b:mcbi.0000041848.57020.57.
27. Cuervo, A.M. and Dice, J.F. (1997). Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *Journal of Molecular Medicine*, 76(1), pp.6–12. doi:10.1007/s001090050185.
28. de Brito, O.M. and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456(7222), pp.605–610. doi:10.1038/nature07534.
29. DUVE, C. (1983). Lysosomes revisited. *European Journal of Biochemistry*, 137(3), pp.391–397. doi:10.1111/j.1432-1033.1983.tb07841.x.
30. Duncan, L.J.P. and Clarke, B.F. (1965). Pharmacology and Mode of Action of the Hypoglycaemic Sulphonylureas and Diguanides. *Annual Review of Pharmacology*, 5(1), pp.151–162. doi:10.1146/annurev.pa.05.040165.001055.
31. Estaquier, J. and Arnoult, D. (2007). Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 14(6), pp.1086–1094. doi:10.1038/sj.cdd.4402107.
32. Finkel, T. and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), pp.239–247. doi:10.1038/35041687.
33. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell*. 2001 Oct;1(4):515-25. doi: 10.1016/s1534-5807(01)00055-7.
34. Fredriksson, Å., Johansson Krogh, E., Hernebring, M., Pettersson, E., Javadi, A., Almstedt, A. and Nyström, T. (2012). Effects of aging and reproduction on protein quality control in soma and gametes of *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell*, 11(4), pp.634–643. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00823.x.
35. Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Bezoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B. and Scorrano, L. (2006). OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell*, 126(1), pp.177–189. doi:10.1016/j.cell.2006.06.025.
36. Gandini, S., Puntoni, M., Heckman-Stoddard, B.M., Dunn, B.K., Ford, L., DeCensi, A. and Szabo, E. (2014). Metformin and Cancer Risk and Mortality: A Systematic Review and Meta-analysis Taking into Account Biases and Confounders. *Cancer Prevention Research*, [online] 7(9), pp.867–885. doi:10.1158/1940-6207.capr-13-0424.
37. Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fu, H., Larsen, C.N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V. and Finley, D. (1999). *Molecular Biology Reports*, 26(1/2), pp.21–28. doi:10.1023/a:1006928316738.

38. Liu, W., Zhang, Q., Gong, F., Cao, Z. and Huo, Y. (2015). ChemInform Abstract: A Convenient and Efficient Synthesis of 2-Thioxoquinazolinone Derivatives via Microwave Irradiation. *ChemInform*, 46(32), p.no-no. doi:10.1002/chin.201532185.
39. Green, D.R. (1998). Apoptotic Pathways. *Cell*, 94(6), pp.695–698. doi:10.1016/s0092-8674(00)81728-6.
40. Grimberg K.B., Beskow, A., Lundin, D., Davis, M.M. and Young, P. (2011). Basic Leucine Zipper Protein Cnc-C Is a Substrate and Transcriptional Regulator of the Drosophila 26S Proteasome. *Molecular and Cellular Biology*, 31(4), pp.897–909. doi:10.1128/mcb.00799-10.
41. Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. *Nature*, 386(6624), pp.463–471. doi:10.1038/386463a0.
42. Groll, M., Glickman, M.H., Finley, D., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D.M. and Huber, R. (2000). *Nature Structural Biology*, 7(11), pp.1062–1067. doi:10.1038/80992.
43. Grune, T., Reinheckel, T. and Davies, K.J.A. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *The FASEB Journal*, 11(7), pp.526–534. doi:10.1096/fasebj.11.7.9212076.
44. Hajnóczky, G., Csordás, G., Das, S., Garcia-Perez, C., Saotome, M., Sinha Roy, S. and Yi, M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: Approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium*, [online] 40(5-6), pp.553–560. doi:10.1016/j.ceca.2006.08.016.
45. Hansen, T.Ø., Sarup, P., Loeschcke, V. and Rattan, S.I.S. (2012). Age-related and sex-specific differences in proteasome activity in individual Drosophila flies from wild type, longevity-selected and stress resistant strains. *Biogerontology*, 13(4), pp.429–438. doi:10.1007/s10522-012-9387-2.
46. Hardie, D.G., Ross, F.A. and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [online] 13(4), pp.251–262. doi:10.1038/nrm3311.
47. Harman, D. (1981). The aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [online] 78(11), pp.7124–7128. doi:10.1073/pnas.78.11.7124.
48. Head, B., Griparic, L., Amiri, M., Gandre-Babbe, S. and van der Bliek, A.M. (2009). Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 187(7), pp.959–966. doi:10.1083/jcb.200906083.
49. Herrmann, J.M. and Neupert, W. (2000). Protein transport into mitochondria. *Current Opinion in Microbiology*, 3(2), pp.210–214. doi:10.1016/s1369-5274(00)00077-1.
50. Hill, R.B. and Pellegrini, L. (2010). The PARL family of mitochondrial rhomboid proteases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(6), pp.582–592. doi:10.1016/j.semcdb.2009.12.011.
51. Hirano, Y., Kaneko, T., Okamoto, K., Bai, M., Yashiroda, H., Furuyama, K., Kato, K., Tanaka, K. and Murata, S. (2008). Dissecting β -ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *The EMBO Journal*, 27(16), pp.2204–2213. doi:10.1038/emboj.2008.148.
52. Ikeda, F., Crosetto, N. and Dikic, I. (2010). What Determines the Specificity and Outcomes of Ubiquitin Signaling? *Cell*, 143(5), pp.677–681. doi:10.1016/j.cell.2010.10.026.
53. Jung, T., Bader, N. and Grune, T. (2007). Oxidized proteins: Intracellular distribution and recognition by the proteasome. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, [online] 462(2), pp.231–237. doi:10.1016/j.abb.2007.01.030.
54. Kang C, Ji LL. PGC-1 α overexpression via local transfection attenuates mitophagy pathway in muscle disuse atrophy. *Free Radic Biol Med*. 2016 Apr;93:32-40. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.032. Epub 2015 Dec 30. PMID: 26746585.
55. Karnkowska, Anna; Vacek, Vojtěch; Zubáčová, Zuzana; Treitli, Sebastian; Petrželková, ; Eme, Laura; Novák, Lukáš; Žárský, Vojtěch; Barlow, Lael; Herman, Emily; Soukal, Petr; Hroudová, Miluše; Doležal, Pavel; Stairs, Courtney; Roger, Andrew; Eliáš, Marek; Dacks, Joel; Vlček, Čestmír; Hampl, Vladimír. *Current Biology*. vol. 26, no. 10, pp. 1274-1284. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.053>
56. Kim, S.-J., Syed, G.H., Khan, M., Chiu, W.-W., Sohail, M.A., Gish, R.G. and Siddiqui, A. (2014). Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral

- persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), pp.6413–6418. doi:10.1073/pnas.1321114111.
57. Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I. and Dikic, I. (2009). A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Molecular Cell*, 34(3), pp.259–269. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.026.
 58. Kirkwood, T., Austad, S. Why do we age?. *Nature* 408, 233–238 (2000). <https://doi.org/10.1038/35041682>
 59. Klinge, C.M. (2008). Estrogenic Control of Mitochondrial Function and Biogenesis. *Journal of cellular biochemistry*, [online] 105(6), pp.1342–1351. doi:10.1002/jcb.21936.
 60. Knecht, E., Aguado, C., Cárcel, J., Esteban, I., Esteve, J.M., Ghislat, G., Moruno, J.F., Vidal, J.M. and Sáez, R. (2009). Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(15), pp.2427–2443. doi:10.1007/s00018-009-0030-6.
 61. Kunjappu, M.J. and Hochstrasser, M. (2014). Assembly of the 20S proteasome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(1), pp.2–12. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.008.
 62. Lamanna, C., Monami, M., Marchionni, N. and Mannucci, E. (2011). Effect of metformin on cardiovascular events and mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 13(3), pp.221–228. doi:10.1111/j.1463-1326.2010.01349.x
 63. Leboucher, Guillaume P., Tsai, Y., Yang, M., Shaw, Kristin C., Zhou, M., Veenstra, Timothy D., Glickman, Michael H. and Weissman, Allan M. (2012). Stress-Induced Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Mitofusin 2 Facilitates Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis. *Molecular Cell*, 47(4), pp.547–557. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.041.
 64. Lee, Y., Jeong, S.-Y., Karbowski, M., Smith, C.L. and Youle, R.J. (2004). Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, 15(11), pp.5001–5011. doi:10.1091/mbc.e04-04-0294.
 65. Liang, H. and Ward, W.F. (2006). PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Advances in physiology education*, [online] 30(4), pp.145–51. doi:10.1152/advan.00052.2006.
 66. Lin, S.-C. and Hardie, D.G. (2018). AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metabolism*, [online] 27(2), pp.299–313. doi:10.1016/j.cmet.2017.10.009.
 67. Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang XF. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol*. 2013 Feb 25;6:19. doi: 10.1186/1756-8722-6-19. PMID: 23442817; PMCID: PMC3599349
 68. López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M. and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), pp.1194–1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039.
 69. Mao Y. Structure, Dynamics and Function of the 26S Proteasome. *Subcell Biochem*. 2021;96:1-151. doi: 10.1007/978-3-030-58971-4_1. PMID: 33252727.
 70. Martin, M. and Marais, R. (2012). Metformin: A Diabetes Drug for Cancer, or a Cancer Drug for Diabetics? *Journal of Clinical Oncology*, 30(21), pp.2698–2700. doi:10.1200/jco.2012.42.1677.
 71. McBride, H.M., Neuspiel, M. and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology*, [online] 16(14), pp.R551–R560. doi:10.1016/j.cub.2006.06.054.
 72. Merkwirth, C., Dargazanli, S., Tatsuta, T., Geimer, S., Löwer, B., Wunderlich, F.T., von Kleist-Retzow, J.-C., Waisman, A., Westermann, B. and Langer, T. (2008). Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. *Genes & Development*, 22(4), pp.476–488. doi:10.1101/gad.460708.
 73. Merzetti, E.M., Staveley, B.E. spargel, the PGC-1α homologue, in models of Parkinson disease in *Drosophila melanogaster* . *BMC Neurosci* 16, 70 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12868-015-0210-2>
 74. Miller KN, Clark JP, Anderson RM. Mitochondrial regulator PGC-1α-Modulating the modulator. *Curr Opin Endocr Metab Res*. 2019 Mar;5:37-44. doi: 10.1016/j.coemr.2019.02.002. Epub 2019 Feb 27. PMID: 31406949; PMCID: PMC6690794.
 75. Montessuit, S., Somasekharan, S.P., Terrones, O., Lucken-Ardjomande, S., Herzig, S., Schwarzenbacher, R., Manstein, D.J., Bossy-Wetzel, E., Basañez, G., Meda, P. and Martinou, J.-C. (2010). Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell*, [online] 142(6), pp.889–901. doi:10.1016/j.cell.2010.08.017.
 76. Morales, D.R. and Morris, A.D. (2015). Metformin in Cancer Treatment and Prevention. *Annual Review of Medicine*, 66(1), pp.17–29. doi:10.1146/annurev-med-062613-093128.

77. Neven, E., Vervaet, B., Brand, K., Gottwald-Hostalek, U., Opdebeeck, B., De Maré, A., Verhulst, A., Lalau, J.-D., Kamel, S., De Broe, M.E. and D'Haese, P.C. (2018). Metformin prevents the development of severe chronic kidney disease and its associated mineral and bone disorder. *Kidney International*, 94(1), pp.102–113. doi:10.1016/j.kint.2018.01.027.
78. Niccoli, T. and Partridge, L. (2012). Ageing as a Risk Factor for Disease. *Current Biology*, 22(17), pp.R741–R752. doi:10.1016/j.cub.2012.07.024.
79. Nishigaki A, Kido T, Kida N, Kakita-Kobayashi M, Tsubokura H, Hisamatsu Y, Okada H. Resveratrol protects mitochondrial quantity by activating SIRT1/PGC-1 α expression during ovarian hypoxia. *Reprod Med Biol*. 2020 Mar 16;19(2):189-197. doi: 10.1002/rmb2.12323. PMID: 32273826; PMCID: PMC7138948.
80. Oh JE, Lee HK. Modulation of pathogen recognition by autophagy. *Front Immunol*. 2012 Mar 12;3:44. doi: 10.3389/fimmu.2012.00044. PMID: 22566926; PMCID: PMC3342359.
81. Oh-hama T. Evolutionary consideration on 5-aminolevulinic synthase in nature. *Orig Life Evol Biosph*. 1997 Aug;27(4):405-12. doi: 10.1023/a:1006583601341. PMID: 9249985.
82. Oka SI, Sabry AD, Cawley KM, Warren JS. Multiple Levels of PGC-1 α Dysregulation in Heart Failure. *Front Cardiovasc Med*. 2020 Jan 30;7:2. doi: 10.3389/fcvm.2020.00002. PMID: 32083094; PMCID: PMC7002390.
83. Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P. and Lenaers, G. (2002). Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), pp.7743–7746. doi:10.1074/jbc.c200677200.
84. Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Brichese L, Gas N, Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP, Ducommun B, Lenaers G, Belenguer P. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett*. 2002 Jul 17;523(1-3):171-6. doi: 10.1016/s0014-5793(02)02985-x. PMID: 12123827.
85. Ong, C., Yung, L.-Y.L., Cai, Y., Bay, B.-H. and Baeg, G.-H. (2014). *Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity. *Nanotoxicology*, 9(3), pp.396–403. doi:10.3109/17435390.2014.940405.
86. Papanagnou, P., Stivarou, T. and Tsironi, M. (2016). Unexploited Antineoplastic Effects of Commercially Available Anti-Diabetic Drugs. *Pharmaceuticals*, [online] 9(2), p.24. doi:10.3390/ph9020024.
87. Park J, Cho J, Song EJ. Ubiquitin-proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment. *Arch Pharm Res*. 2020 Nov;43(11):1144-1161. doi: 10.1007/s12272-020-01281-8. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33165832; PMCID: PMC7651821.
88. Patrone, C., Eriksson, O. and Lindholm, D. (2014). Diabetes drugs and neurological disorders: new views and therapeutic possibilities. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2(3), pp.256–262. doi:10.1016/s2213-8587(13)70125-6.
89. Pavón, N., Martínez-Abundis, E., Hernández, L., Gallardo-Pérez, J.C., Alvarez-Delgado, C., Cerbón, M., Pérez-Torres, I., Aranda, A. and Chávez, E. (2012). Sexual hormones: Effects on cardiac and mitochondrial activity after ischemia–reperfusion in adult rats. Gender difference. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, [online] 132(1-2), pp.135–146. doi:10.1016/j.jsbmb.2012.05.003.
90. Pryor, R. and Cabreiro, F. (2015). Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochemical Journal*, 471(3), pp.307–322. doi:10.1042/bj20150497.
91. Radhakrishnan, S.K., Lee, C.S., Young, P., Beskow, A., Chan, J.Y. and Deshaies, R.J. (2010). Transcription Factor Nrf1 Mediates the Proteasome Recovery Pathway after Proteasome Inhibition in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, 38(1), pp.17–28. doi:10.1016/j.molcel.2010.02.029.
92. Rattan, S.I.S. (2005). Hormetic Modulation of Aging and Longevity by Mild Heat Stress. *Dose-Response*, 3(4), p.dose-response.0. doi:10.2203/dose-response.003.04.008.
93. Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K.J.A., and Grune, T. (1998). Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochemical Journal*, 335(3), pp.637–642. doi:10.1042/bj3350637.
94. Renault, Thibaud T., Floros, Konstantinos V., Elkholi, R., Corrigan, K.-A., Kushnareva, Y., Wieder, Shira Y., Lindtner, C., Serasinghe, Madhavika N., Asciolla, James J., Buettner, C.,

- Newmeyer, Donald D. and Chipuk, Jerry E. (2015). Mitochondrial Shape Governs BAX-Induced Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Molecular Cell*, [online] 57(1), pp.69–82. doi:10.1016/j.molcel.2014.10.028.
95. ROSSIER, M. (2006). T channels and steroid biosynthesis: in search of a link with mitochondria. *Cell Calcium*, 40(2), pp.155–164. doi:10.1016/j.ceca.2006.04.020.
 96. Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A. and Korsmeyer, S.J. (2002). A Distinct Pathway Remodels Mitochondrial Cristae and Mobilizes Cytochrome c during Apoptosis. *Developmental Cell*, 2(1), pp.55–67. doi:10.1016/s1534-5807(01)00116-2.
 97. Shay, J.W. and Wright, W.E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [online] 1(1), pp.72–76. doi:10.1038/35036093.
 98. Slack, J.M.. (2006). Βασικές αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης, Ακαδημαϊκές εκδόσεις
 99. Sohal, R.S. and Weindruch, R. (1996). Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science*, [online] 273(5271), pp.59–63. doi:10.1126/science.273.5271.59.
 100. Stojanovski, D., Koutsopoulos, O.S., Okamoto, K. and Ryan, M.T. (2004). Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *Journal of Cell Science*, 117(7), pp.1201–1210. doi:10.1242/jcs.01058.
 101. Stryer, Lubert (1995). "Citric acid cycle.". In: *Biochemistry*. (Fourth ed.). New York: W.H. Freeman and Company. pp. 509–527, 569–579, 614–616, 638–641, 732–735, 739–748, 770–773
 102. Sykietis, G.P. and Bohmann, D. (2010). Stress-Activated Cap'n'collar Transcription Factors in Aging and Human Disease. *Science Signaling*, 3(112), pp.re3–re3. doi:10.1126/scisignal.3112re3.
 103. Kaarniranta, K., Salminen, A., Haapasalo, A., Soininen, H. and Hiltunen, M. (2011). Age-Related Macular Degeneration (AMD): Alzheimer's Disease in the Eye? *Journal of Alzheimer's Disease*, 24(4), pp.615–631. doi:10.3233/jad-2011-101908.
 104. Terman, A., Gustafsson, B. and Brunk, U. (2007). Autophagy, organelles and ageing. *The Journal of Pathology*, 211(2), pp.134–143. doi:10.1002/path.2094.
 105. Troen BR. The biology of aging. *Mt Sinai J Med*. 2003 Jan;70(1):3-22. PMID: 12516005..
 106. Trougakos, I.P., Sesti, F., Tsakiri, E. and Gorgoulis, V.G. (2013). Non-enzymatic post-translational protein modifications and proteostasis network deregulation in carcinogenesis. *Journal of Proteomics*, 92, pp.274–298. doi:10.1016/j.jprot.2013.02.024.
 107. Tsakiri EN, Trougakos IP. The amazing ubiquitin-proteasome system: structural components and implication in aging. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2015;314:171-237. doi: 10.1016/bs.ircmb.2014.09.002. Epub 2014 Nov 18. PMID: 25619718.
 108. Tsakiri, E.N., Iliaki, K.K., Höhn, A., Grimm, S., Papassideri, I.S., Grune, T. and Trougakos, I.P. (2013). Diet-derived advanced glycation end products or lipofuscin disrupts proteostasis and reduces life span in *Drosophila melanogaster*. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, pp.1155–1163. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.186.
 109. Varanita, T., Soriano, M., Romanello, V., Zaglia, T., Quintana-Cabrera, R., Semenzato, M., Menabò, R., Costa, V., Civiletto, G., Pesce, P., Viscomi, C., Zeviani, M., Di Lisa, F., Mongillo, M., Sandri, M. and Scorrano, L. (2015). The Opa1-Dependent Mitochondrial Cristae Remodeling Pathway Controls Atrophic, Apoptotic, and Ischemic Tissue Damage. *Cell Metabolism*, 21(6), pp.834–844. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.007.
 110. Vernace, V.A., Arnaud, L., Schmidt-Glenewinkel, T. and Figueiredo-Pereira, M.E. (2007). Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. *The FASEB Journal*, 21(11), pp.2672–2682. doi:10.1096/fj.06-6751com.
 111. Viollet, B., Guigas, B., Garcia, N.S., Leclerc, J., Foretz, M. and Andreelli, F. (2011). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science*, [online] 122(6), pp.253–270. doi:10.1042/cs20110386.
 112. Voet, J.G. and Voet, D. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology Education (BAMBE)*. *Biochemical Education*, 28(3), p.124. doi:10.1016/s0307-4412(00)00032-7.
 113. White, Michael J., McArthur, K., Metcalf, D., Lane, Rachael M., Cambier, John C., Herold, Marco J., van Delft, Mark F., Bedoui, S., Lessene, G., Ritchie, Matthew E., Huang, David C.S. and Kile, Benjamin T. (2014). Apoptotic Caspases Suppress mtDNA-Induced STING-Mediated Type I IFN Production. *Cell*, 159(7), pp.1549–1562. doi:10.1016/j.cell.2014.11.036.

114. Witters, L.A. (2001). The blooming of the French lilac. *Journal of Clinical Investigation*, 108(8), pp.1105–1107. doi:10.1172/jci14178.
115. Yamaguchi, R., Lartigue, L., Perkins, G., Scott, R.T., Dixit, A., Kushnareva, Y., Kuwana, T., Ellisman, M.H. and Newmeyer, D.D. (2008). Opa1-Mediated Cristae Opening Is Bax/Bak and BH3 Dependent, Required for Apoptosis, and Independent of Bak Oligomerization. *Molecular Cell*, 31(4), pp.557–569. doi:10.1016/j.molcel.2008.07.010.
116. Yang, Y., Ouyang, Y., Yang, L., Beal, M.F., McQuibban, A., Vogel, H. and Lu, B. (2008). Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19), pp.7070–7075. doi:10.1073/pnas.0711845105.
117. Zhang, C.-S., Li, M., Ma, T., Zong, Y., Cui, J., Feng, J.-W., Wu, Y.-Q., Lin, S.-Y. and Lin, S.-C. (2016). Metformin Activates AMPK through the Lysosomal Pathway. *Cell Metabolism*, 24(4), pp.521–522. doi:10.1016/j.cmet.2016.09.003.
118. Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doeber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J. and Moller, D.E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of Clinical Investigation*, [online] 108(8), pp.1167–1174. doi:10.1172/jci13505.
119. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 1999 Apr 23;274(17):11549-56. doi: 10.1074/jbc.274.17.11549. PMID: 10206961.

Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον.

Η ΔΗΛΟΥΣΑ

Υπογραφή:

Ονοματεπώνυμο: Δήμου Όλγα

Αριθμός Μητρώου: 41802