



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*Μοριακοί μηχανισμοί κυτταρικής γήρανσης:  
Πρωτεολυτική ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα p53*

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΙΣΟΥΛΑ**

**Βιολόγος**



**ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ**  
**ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓ. ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ**

**Αθήνα 2011**



**NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS**  
**FACULTY OF BIOLOGY**  
**DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY**

**Ph.D. Thesis**

*Molecular mechanisms of cellular senescence:  
Proteasomal regulation of transcription factor p53*

**CHRISTINA SISOULA**

**Biologist**



**NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION**  
**INSTITUTE OF BIOLOGICAL RESEARCH AND BIOTECHNOLOGY**  
***LAB. OF MOLECULAR AND CELLULAR AGEING***

**Athens 2011**



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*«Μοριακοί μηχανισμοί κυτταρικής γήρανσης:  
Πρωτεολυτική ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα p53»*

**Χριστίνα Σισούλα**  
Βιολόγος

**Τόπος διεξαγωγής:** Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εργ. Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης

**Επιβλέπουσα:** Διδώ Βασιλακοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήματος Βιολογίας, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

- 1. Εμμανουήλ Γ. Φραγκούλης**, Καθηγητής Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήματος Βιολογίας, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 2. Διδώ Βασιλακοπούλου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήματος Βιολογίας, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 3. Ευστάθιος Γκόνος**, Διευθυντής Ερευνών Ινστιτούτου Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Εργ. Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

- 1. Εμμανουήλ Γ. Φραγκούλης**, Καθηγητής Βιοχημείας, Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήματος Βιολογίας, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 2. Διδώ Βασιλακοπούλου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας Ευκαρυωτικών Οργανισμών, Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήματος Βιολογίας, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 3. Ευστάθιος Γκόνος**, Διευθυντής Ερευνών Ινστιτούτου Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εργ. Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
- 4. Ισίδωρος Δ. Μπέης**, Καθηγητής Ζωολογίας Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήματος Βιολογίας, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 5. Αικατερίνη Γαϊτανάκη**, Καθηγήτρια Φυσιολογίας Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήματος Βιολογίας, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 6. Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτταρικής και Αναπτυξιακής Βιολογίας, Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήματος Βιολογίας, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
- 7. Σπύρος Ευθυμιόπουλος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου – Νευροβιολογίας Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Τμήματος Βιολογίας, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

**Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού Προγράμματος: “Functional analysis of evolutionarily conserved mechanisms of ageing based on advanced proteome analysis - PROTEOMAGE” (LSHM-CT-2005-518230).**

**Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.**

**N. 5343/1932, άρθρο 202**

**Στους γονείς μου,  
Γιώργο και Ουρανία**

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	12
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	14
ABSTRACT.....	17
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	20
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>21</b>
1.1 Γήρανση.....	21
1.1.1 <i>In vivo</i> Γήρανση.....	22
1.1.2 <i>In vitro</i> Γήρανση.....	23
1.2 Το p53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο: Ιστορία της ανακάλυψής του.....	28
1.3 Λειτουργία της πρωτεΐνης p53.....	28
1.3.1 Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας.....	30
1.3.2 Ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53.....	32
1.3.3 Δομή της πρωτεΐνης p53.....	34
1.3.4 Μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53 – Σύνδρομο Li-Fraumeni.....	38
1.4 Ρύθμιση της πρωτεΐνης p53.....	38
1.4.1 Ουμπικιτυλίωση.....	39
1.4.2 Πρωτεόσωμα.....	48
1.4.3 Ουμπικιτυλίωση και πρωτεοσωμική αποδόμηση της p53 από την Mdm2.....	56
1.4.3.1 Λιγάση ουμπικιτίνης Mdm2.....	56
1.4.3.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ p53 και Mdm2.....	58
1.4.3.3 Αναστολείς της αλληλεπίδρασης μεταξύ p53 και Mdm2.....	59
1.4.3.4 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν τη σταθερότητα της p53.....	61
1.4.4 Άλλες λιγάσες.....	63
1.4.5 Ρύθμιση της p53 από το σύστημα των συνοδών πρωτεϊνών.....	66
1.4.5.1 Συνοδές πρωτεΐνες (chaperones).....	66
1.4.5.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ Hsp70/Hsp90 και CHIP λιγάσης.....	68
1.4.5.3 Ισορροπία μεταξύ του διπλώματος και της αποδόμησης της p53.....	69
1.4.6 Αποδόμηση της p53 από μηχανισμούς ανεξάρτητους από την ουμπικιτυλίωση.....	71
1.4.7 Ρύθμιση της θέσης της πρωτεΐνης p53 μες στο κύτταρο.....	71
1.5 Πρωτεόσωμα και γήρανση.....	72
1.5.1 Ποσοτικές διαφορές πρωτεοσώματος.....	73

1.5.2 Ποιοτικές διαφορές πρωτεοσώματος .....	73
1.5.2.1 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.....	73
1.5.2.2 Αναστολή ενεργοτήτων μέσω λιποφουσκίνης και τροποποιημένων πρωτεϊνών .....	73
1.6 p53 και γήρανση .....	74
<b>2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>79</b>
2.1 Υλικά.....	79
2.2 Μέθοδοι .....	80
2.2.1 Κυτταροκαλλιέργεια.....	81
2.2.2 Επίδραση κυττάρων με αναστολείς.....	83
2.2.5 Απομόνωση RNA .....	85
2.2.6 Αντίστροφη μεταγραφή.....	86
2.2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) .....	87
2.2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο με τη χρωστική SYBR- green I (Real-Time PCR SYBR-green I) .....	88
2.2.9 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	90
2.2.10 Απομόνωση πρωτεϊνών .....	91
2.2.10.1 Ολικές πρωτεΐνες .....	92
2.2.10.2 Πρωτεΐνες για τη μέτρηση των πρωτεοσωμικών ενεργοτήτων.....	92
2.2.10.3 Διαχωρισμός και απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων .....	94
2.2.11 Μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών .....	95
2.2.12 Μέτρηση των ειδικών πρωτεολυτικών ενεργοτήτων .....	95
2.2.13 Ανοσοκατακρήμνιση για τον προσδιορισμό των επιπέδων ουμπικιτυλίωσης της CHIP <i>in vivo</i> .....	96
2.2.14 Ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-Πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	98
2.2.15 Χρώση Πρωτεϊνών .....	100
2.2.16 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western blot) .....	100
2.2.17 Ανοσοστύπωμα πρωτεϊνών κατά Western (Immunoblotting).....	101
2.2.18 Αφαίρεση αντισώματος από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Stripping) .....	104
2.2.19 Ανοσοεντοπισμός (Confocal) .....	104
2.2.20 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> .....	106
2.2.21 Μετασχηματισμός βακτηρίων (Transformation) .....	107
2.2.22 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA .....	108

2.2.23 Πέψεις DNA με τη χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών.....	110
2.2.24 Επιμόλυνση των κυττάρων.....	111
2.2.25 Στατιστική ανάλυση .....	113
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>115</b>
3.1 Κυτταρική γήρανση HFL-1 εμβρυικών ινοβλαστών.....	115
3.2 Μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων τύπων E3 ενζύμων (λιγάσες ουμπικιτίνης) σε νεαρά και γηρασμένα HFL-1 κύτταρα .....	118
3.2.1 Βιοχημική μελέτη της έκφρασης της p53 πρωτεΐνης και των λιγασών αυτής κατά τη γήρανση των ινοβλαστών HFL-1.....	118
3.2.1.1 Αναδιπλασιαστική γήρανση .....	118
3.2.1.2 Πρώιμα επαγόμενη γήρανση λόγω μερικής πρωτεοσωμικής αναστολής.....	121
3.2.2 Βιοχημική μελέτη του συμπλόκου SCF κατά την εξέλιξη του φαινομένου της αναδιπλασιαστικής γήρανσης .....	126
3.3 Μελέτη της CHIP λιγάσης στην αναδιπλασιαστική γήρανση.....	128
3.3.1 Αποσιώπηση της έκφρασης της CHIP λιγάσης οδηγεί σε πρόωρη γήρανση <i>in vitro</i> .....	128
3.4 Συσχέτιση της λειτουργίας των p53-ειδικών λιγασών με το πρωτεόσωμα και την p53 .....	132
3.4.1 Αυξημένη έκφραση των λιγασών σε κλώνους WI38/T που σταθερά υπερεκφράζουν τη β5 υπομονάδα του πρωτεοσώματος .....	132
3.4.2 Αντίθετη έκφραση p53 και CHIP σε κύτταρα Li-Fraumeni .....	133
3.5 Μελέτη της ειδικής δράσης της CHIP λιγάσης στην κυτταρική γήρανση .....	136
3.5.1 Υποκυτταρικός εντοπισμός της CHIP στους ινοβλάστες HFL-1.....	136
3.5.2 Μελέτη της ειδικής ενεργότητας της CHIP λιγάσης στους φυσιολογικούς ινοβλάστες .....	138
3.5.3 Μελέτη της p53 έπειτα από εξωγενή υπερέκφραση της CHIP .....	140
3.5.4 Μελέτη της αποσιώπησης της έκφρασης της CHIP και της Mdm2 λιγάσης στη ρύθμιση της σταθερότητας της p53 .....	142
3.5.5 Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα Nutlin-3 σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την CHIP λιγάση .....	145
3.5.6 Μελέτη του CHIP-εξαρτώμενου μονοπατιού κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση.....	150
3.5.6.1 Μελέτη της έκφρασης των μοριακών συνοδών πρωτεϊνών κατά τη γήρανση.....	150
3.5.6.2 Μελέτη της αποδόμησης της p53 έπειτα από αναστολή της Hsp90 ενεργότητας ..	151
3.5.6.3 Μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ p53 και Hsp90.....	153
3.6 Κυτταροπροστατευτική δράση της CHIP λιγάσης.....	157
3.6.1 Η CHIP λιγάση προστατεύει τα HFL-1 έναντι των οξειδωμένων πρωτεϊνών.....	157



3.6.2 Η CHIP λιγάση προστατεύει τα MEFs έναντι των οξειδωμένων πρωτεϊνών .....	159
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	161
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	170
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ .....	202
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ .....	205
 <b>ΕΙΚΟΝΕΣ</b>	
Εικόνα 1 Καμπύλη του Hayflick .....	24
Εικόνα 2 Κυτταρικές λειτουργίες κατά την εξέλιξη της διαδικασίας της κυτταρικής γήρανσης .....	27
Εικόνα 3 Σχήμα απόκρισης της πρωτεΐνης p53 .....	29
Εικόνα 4 Ρύθμιση της πρωτεΐνης p53 .....	33
Εικόνα 5 Δομή της πρωτεΐνης p53 .....	35
Εικόνα 6 Σύγκριση της p53 αλληλουχίας μεταξύ των ειδών .....	37
Εικόνα 7 Σύστημα πρωτεόλυσης μέσω ουμπικιτίνης από το 26S πρωτεόσωμα .....	40
Εικόνα 8 Δομή της πρωτεΐνης E6-AP .....	42
Εικόνα 9 Παράδειγμα ενός μοτίβου Cys2His2 με δακτύλιο ψευδαργύρου .....	43
Εικόνα 10 Σύμπλοκο SCF .....	44
Εικόνα 11 Δομή του 20S πρωτεοσώματος .....	49
Εικόνα 12 Σχηματική αναπαράσταση του 26S πρωτεοσωμικού συμπλόκου .....	51
Εικόνα 13 Καταλυτικά κέντρα του 20S πρωτεοσώματος .....	54
Εικόνα 14 Δομή της Mdm2 λιγάσης .....	58
Εικόνα 15 Δομή του αναστολέα Nutlin-3a της αλληλεπίδρασης p53-Mdm2 .....	61
Εικόνα 16 Η διαδικασία της ουμπικιτυλίωσης της p53 από τρία από τα κύρια E3 ένζυμα λιγάσες ουμπικιτίνης, Mdm2, Pirh2 και COP1 .....	65
Εικόνα 17 Κύκλος πρόσδεσης και απελευθέρωσης υποστρωμάτων από την Hsp70 .....	67
Εικόνα 18 Αλληλεπίδραση του διμερούς ενζύμου CHIP με τα E2 ένζυμα Ubc4/5 και με τις μοριακές συνοδούς Hsp70 και Hsp40 .....	68
Εικόνα 19 Δομή της CHIP λιγάσης .....	69
Εικόνα 20 Χάρτες Πλασμιδίων .....	110
Εικόνα 21 Ενεργότητες πρωτεοσώματος σε νεαρά και γηρασμένα HFL-1 κύτταρα .....	116
Εικόνα 22 Ανάλυση κατά Western των καταλυτικών υπομονάδων του 20S πρωτεοσωμικού συμπλόκου σε νεαρά και γηρασμένα HFL-1 κύτταρα .....	117

Εικόνα 23 Ανάλυση κατά Western των E3 λιγασών της p53 πρωτεΐνης σε νεαρούς και γηρασμένους ινοβλάστες.....	119
Εικόνα 24 Ανάλυση κατά Western της έκφρασης της CHIP λιγάσης κατά την εξέλιξη του φαινομένου της αναδιπλασιαστικής γήρανσης .....	120
Εικόνα 25 RNA επίπεδα έκφρασης της CHIP λιγάσης σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα ..	121
Εικόνα 26 Κυτταρικοί διπλασιασμοί HFL-1 κυττάρων έπειτα από επίδραση με 20nM εποξομισίνης.....	123
Εικόνα 27 Ενεργότητα χυμοθρυψίνης HFL-1 κυττάρων έπειτα από επίδραση για 2 ώρες με διάφορες συγκεντρώσεις εποξομισίνης.....	123
Εικόνα 28 Χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης HFL-1 που δέχτηκαν την επίδραση 20 nM εποξομισίνης.....	124
Εικόνα 29 Ανάλυση κατά Western της p53 και των λιγασών της κατά την πρόωμη γήρανση που επάγεται από μερική αναστολή του πρωτεοσώματος .....	125
Εικόνα 30 Ανάλυση κατά Western των υπομονάδων του SCF συμπλόκου κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση.....	126
Εικόνα 31 Επίπεδα έκφρασης RNA της CHIP λιγάσης σε νεαρά κύτταρα έπειτα από αποσιώπηση της έκφρασής της .....	128
Εικόνα 32 Η αποσιώπηση της έκφρασης της CHIP οδηγεί σε πρόωρη γήρανση .....	130
Εικόνα 33 Έκφραση των λιγασών της p53 σε κλώνους WI38/T/β5 .....	133
Εικόνα 34 Έκφραση της p53 και των λιγασών της στα Li-Fraumeni κύτταρα.....	134
Εικόνα 35 Ανάλυση κατά Western της CHIP σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα .....	137
Εικόνα 36 Ανοσοεντοπισμός της CHIP σε νεαρά και γηρασμένα HFL-1 κύτταρα .....	138
Εικόνα 37 Επίπεδα συμπικτυλίωσης της CHIP σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα HFL-1 .	139
Εικόνα 38 Εξωγενής υπερέκφραση της CHIP στα νεαρά κύτταρα.....	141
Εικόνα 39 Αποσιώπηση της έκφρασης της Mdm2 και της CHIP σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα.....	144
Εικόνα 40 Αριθμός HFL-1 κυττάρων μετά από επίδραση με διάφορες συγκεντρώσεις Nutlin-3.....	146
Εικόνα 41 Ανάλυση κατά Western των p53 και Mdm2 σε κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση διάφορων συγκεντρώσεων Nutlin-3 για 24 ώρες.....	146
Εικόνα 42 Ανάλυση κατά Western της p53 και των λιγασών της μετά από επίδραση με τον αναστολέα Nutlin-3 σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα .....	147

Εικόνα 43 Χορήγηση του αναστολέα Nutlin-3 σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα που υπερεκφράζουν την CHIP λιγάση .....	149
Εικόνα 44 Ανάλυση κατά Western των μοριακών συνοδών πρωτεϊνών σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα.....	150
Εικόνα 45 Ανάλυση κατά Western της p53 έπειτα από αναστολή της ενεργότητας της Hsp90 σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα .....	152
Εικόνα 46 Ανάλυση κατά Western της αλληλεπίδρασης μεταξύ της p53 και της Hsp90.....	154
Εικόνα 47 Ανάλυση κατά Western της p53 πρωτεΐνης έπειτα από τη δράση του αναστολέα 17AAG σε κύτταρα στα οποία έχει αποσιωπηθεί η έκφραση της CHIP .....	154
Εικόνα 48 Απεικόνιση του συστήματος αναδίπλωσης/αποδόμησης της p53 με τη συμβολή των βασικών λιγασών της, Mdm2 και CHIP, στα νεαρά και στα γηρασμένα κύτταρα.....	156
Εικόνα 49 Μέτρηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών στα HFL-1 κύτταρα .....	158
Εικόνα 50 Επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών σε ινοβλάστες ποντικού που εκφράζουν ή όχι την CHIP λιγάση .....	159
Εικόνα 51 Μειωμένες οξειδωμένες πρωτεΐνες και καλύτερη μορφολογία των κυττάρων ποντικού όταν υπερεκφράζουν την CHIP λιγάση .....	160

## ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1 Λιγάσες ουμπικιτίνης της πρωτεΐνης p53 .....	64
Πίνακας 2 Αλληλουχίες των PCR εκκινητών.....	90
Πίνακας 3 Πρωτογενή αντισώματα .....	103
Πίνακας 4 Ολιγονουκλεοτίδια siRNA .....	113

**EΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι το αποτέλεσμα ερευνητικής εργασίας που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης, στο Ινστιτούτο Βιολογικών Εφαρμογών και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, με επιστημονικό υπεύθυνο το Διευθυντή Ερευνών Δρ. Ευστάθιο Γκόνο, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Διδώ Βασιλακοπούλου και του Καθηγητή Εμμανουήλ Γ. Φραγκούλη του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής θα επιθυμούσα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν, με διαφορετικό τρόπο ο καθένας, στην προσπάθεια αυτή. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους επιστημονικούς μου επιβλέποντες, οι οποίοι με υποστήριξαν και με συμβούλεψαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης και της συγγραφής αυτής της διατριβής. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Διδώ Βασιλακοπούλου για τις γόνιμες και εποικοδομητικές συζητήσεις που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου, για την καθοδήγησή της και την άψογη συνεργασία μας κατά τη διεξαγωγή των εργαστηριακών ασκήσεων του Τομέα Βιοχημείας. Στη συνέχεια, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Εμμανουήλ Γ. Φραγκούλη τόσο για την επιλογή του να με συμπεριλάβει στους υποψήφιους διδακτορικούς του Τμήματος Βιολογίας, όσο και για την επίβλεψη και την καθοδήγησή του.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Ευστάθιο Γκόνο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριό του και να γνωρίσω μερικούς από τους κορυφαίους επιστήμονες παγκοσμίως στο πεδίο της Γήρανσης και της Βιολογίας γενικότερα. Επίσης, για την ουσιαστική επίβλεψη και καθοδήγησή του και την αμέριστη υποστήριξη που μου παρείχε, τόσο υλικοτεχνική όσο και πνευματική, αφιερώνοντας από τον πολύτιμο χρόνο του.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Ι.Δ. Μπέη, την Καθηγήτρια Α. Γαϊτανάκη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Σ. Ευθυμιόπουλο του Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, καθώς επίσης την Ι.Σ. Παπασιδέρη του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών για την αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τον εκλιπόντα Κωνσταντίνο Σέκερη για το αδιάλειπτο ενδιαφέρον του προς την ερευνητική μου πορεία και την πολύτιμη συμβολή του ώστε να ανακηρυχτώ υπότροφος του Μποδοσάκειου Ιδρύματος, το οποίο ευχαριστώ ξεχωριστά για την οικονομική υποστήριξη που μου προσέφερε όλα τα χρόνια εκπόνησης της διατριβής μου.

Την ευγνωμοσύνη μου οφείλω στη φίλη Δρ. Βαρβάρα Τραχανά, χωρίς τη βοήθεια της οποίας δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Την ευχαριστώ για την ποιοτική μας συνεργασία και το ουσιαστικό ενδιαφέρον που έδειξε στο ερευνητικό μου έργο, για τις γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου, τις εύστοχες παρατηρήσεις και τις συμβουλές της, οι οποίες συνέβαλαν τα μέγιστα στη δημοσίευση των πειραματικών μου αποτελεσμάτων, αλλά και γενικότερα στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Σπουδαίο ρόλο, από το ξεκίνημα αυτής της διατριβής και καθ' όλη τη διάρκειά της, διαδραμάτισε η ανιδιοτελής συνεργασία και φιλία με τη Δρ. Σουζάνα Καπέτα. Την ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου για την υποστήριξή της τόσο σε επιστημονικό όσο και διαπροσωπικό επίπεδο, για τις ωραίες στιγμές που μοιραστήκαμε, αλλά και τη συμπαράστασή της σε όλες τις δύσκολες στιγμές που περάσαμε μαζί, για τις συμβουλές και την ενθάρρυνση που μου προσέφερε απλόχερα, καθώς και για την αισιοδοξία της για το μέλλον. Θέλω, επίσης, να ευχαριστήσω τις συναδέλφους μου Δρ. Χριστίνα Παπαδοπούλου και Δρ. Ευτυχία Οικονόμου για τη φιλία τους και τη γνωστική και υλικοτεχνική υποστήριξη που μου παρείχαν ανιδιοτελώς. Επίσης, τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, τη Δρ. Ειρήνη Μπαλαντίνου, τη Δρ. Νίκη Χονδρογιάννη, τη Δρ. Αυγή Τσώλου και τον Κωνσταντίνο Βουτετάκη για τη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Ένα μέρος αυτής της διατριβής το αφιερώνω στο σύζυγό μου Κώστα, ο οποίος είναι η «δύναμή» μου όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Έπαιξε καταλυτικό ρόλο στην ψυχολογία μου, προκειμένου να είμαι ήρεμη και δυνατή, να αντιμετωπίζω τις δυσκολίες που προέκυπταν ανά πάσα στιγμή και να βγάζω τον καλύτερό μου εαυτό στη δουλειά μου. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την ενθάρρυνση, τη συμπαράσταση, την υπομονή και την ανοχή του όλες εκείνες τις ώρες της απουσίας μου από κοντά του.

Την ανεξάντλητη αγάπη και ευγνωμοσύνη μου θα ήθελα να εκφράσω στους γονείς μου, Γιώργο και Ουρανία, αλλά και στην αδελφή μου, Νίκη, για την πρακτική και ηθική τους συμπαράσταση και κατανόηση καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και για τις κατάλληλες συνθήκες που δημιούργησαν έως τώρα, ώστε να βρίσκομαι σε αυτήν τη θέση.

Χριστίνα Σισούλα

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η γήρανση αποτελεί μία φυσιολογική, μη αναστρέψιμη διαδικασία, η οποία εμφανίζεται σε όλους του οργανισμούς ξεκινώντας από τα κατώτερα ασπόνδυλα και επηρεάζεται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ειδικότερα, η γήρανση των πολυκύτταρων οργανισμών περιλαμβάνει διάφορα στάδια, τα οποία χαρακτηρίζονται από μη αντιστρεπτές μεταβολές στην ανατομία, στη φυσιολογία, καθώς και στην προσαρμοστικότητα τους. Η γήρανση αφορά πολλαπλά όργανα και ιστούς και τελικά οδηγεί σε προοδευτικό και γενικευμένο εκφυλισμό της κυτταρικής ομοιοστασίας, δηλαδή της ικανότητας του οργανισμού να διατηρεί τη δομική και λειτουργική του ακεραιότητα.

Η γήρανση των ανθρώπινων ινοβλαστών συνοδεύεται από μεταβολές σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης και της μείωσης της λειτουργίας του πρωτεώσωματος. Το πρωτεόσωμα, ένα πολυενζυμικό, μη λυσοσωμικό σύμπλοκο και ιδιαίτερα ο ATP-εξαρτώμενος πρωτεολυτικός μηχανισμός που πραγματοποιείται από το 26S πρωτεόσωμα ευθύνεται για την αποδόμηση φυσιολογικών και μη πρωτεϊνών, προκειμένου να διατηρηθεί η φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Κατά τη φάση της αναδιπλασιαστικής γήρανσης, το πρωτεόσωμα παρουσιάζει μειωμένη έκφραση και λειτουργία, ενώ η αυξημένη έκφρασή του καθυστερεί το φαινόμενο της γήρανσης σε ανθρώπινους ινοβλάστες.

Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας από τους σημαντικότερους μεταγραφικούς παράγοντες των κυττάρων, υπεύθυνος για πολυάριθμες βιολογικές διεργασίες, όπως η απόκριση στο κυτταρικό στρες, η απόπτωση, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η γήρανση. Στα κύτταρα των θηλαστικών, η γήρανση που επάγεται από την p53 πρωτεΐνη συμβαίνει είτε όταν τα τελομερή εξαντλούνται, με αποτέλεσμα την αναδιπλασιαστική γήρανση (replicative senescence) είτε έπειτα από επιζήμια κυτταρική βλάβη, όπως είναι η κυτταρική γήρανση που επάγεται από στρες (stress-induced cellular senescence). Έχουν διατυπωθεί πολυάριθμες θεωρίες σχετικά με την κεντρική λειτουργία της πρωτεΐνης p53 στη γήρανση των οργανισμών. Η p53 είναι υπεύθυνη για την επαγωγή και τη διατήρηση του γηρασμένου φαινοτύπου, αλλά σε περίπτωση απώλειας της p53 μόνο τα υψηλά επίπεδα του αναστολέα p16 είναι ικανά να κάνουν τη διαδικασία μη αντιστρεπτή. Οι ογκοκατασταλτικές ιδιότητες της p53 εν μέρει εκτελούνται μέσω της επαγωγής της κυτταρικής γήρανσης και κατ' επέκταση της γήρανσης των οργανισμών. Φυσικά, η λειτουργία της p53 πρέπει να εξηγηθεί μέσα από το πολύπλοκο δίκτυο των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά.

Σε φυσιολογικές συνθήκες στο κύτταρο, τα επίπεδα της p53 πρωτεΐνης βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα, διατηρούμενα σε μία ισορροπία μεταξύ της διαδικασίας της σωστής αναδίπλωσης και της πρωτεολυτικής αποδόμησης. Αρκετά γονίδια-στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα p53 αναστέλλουν την ενεργότητα του p53 μέσω ενός αυτορυθμιζόμενου κύκλου αρνητικής ανάδρασης. Ο p53 ενεργοποιεί τον κύριο αρνητικό ρυθμιστή του, το γονίδιο mdm2, μία λιγάση ουμπικιτίνης. Η Mdm2 λιγάση με τη σειρά της απενεργοποιεί την πρωτεΐνη p53, κυρίως σημαίνοντάς την για πρωτεοσωμική αποδόμηση και προωθώντας την έξοδο της από τον πυρήνα. Παρόμοια, τα γονίδια-στόχοι Cop1 και Pirh2 κωδικοποιούν για E3 λιγάσες, που είναι ικανές να αποδομήσουν την p53. Ο αριθμός των λιγασών που μπορούν να ουμπικιτυλιώσουν την p53 ανεξάρτητα από την Mdm2 συνεχώς αυξάνει. Εκτός από τις προαναφερθείσες λιγάσες της p53, βασικές θεωρούνται επίσης, η CHIP και η Topors.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή προσδιορίστηκε ο μηχανισμός με τον οποίο ρυθμίζεται η σταθερότητα της πρωτεΐνης p53 κατά την κυτταρική γήρανση ανθρώπινων ινοβλαστών. Δεδομένου ότι η p53 σημαίνεται για ουμπικιτυλίωση από αρκετές E3 λιγάσες, οι οποίες δρουν ανεξάρτητα η μία από την άλλη, ελέγχθηκε εάν κάποια από αυτές εμφανίζει ειδική δραστηριότητα κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση. Έτσι, παρόλο που η p53 βρέθηκε ότι έχει μειωμένη έκφραση και λειτουργία στους γηρασμένους ινοβλάστες, η CHIP είναι η μόνη από τις βασικές λιγάσες της p53 που μελετήθηκαν, η οποία επάγεται σε μεταγραφικό και σε πρωτεϊνικό επίπεδο κατά τη γήρανση. Αντίθετα, η αποσιώπηση της έκφρασης της CHIP λιγάσης οδήγησε τους ανθρώπινους ινοβλάστες σε πρόωρη γήρανση. Παράλληλα, κατά τη γήρανση, η CHIP μετατοπίζεται εν μέρει στον πυρήνα και παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα ουμπικιτυλίωσης, γεγονός που δεικνύει αυξημένη ενεργότητα λιγάσης ουμπικιτίνης.

Στο σύνολο, σχεδόν, των επιστημονικών μελετών που αφορούν την p53, η Mdm2 θεωρείται ως η κύρια E3 λιγάση που ρυθμίζει τη σταθερότητα της p53 στα κύτταρα. Εφόσον στους γηρασμένους ανθρώπινους ινοβλάστες βρέθηκε ότι η Mdm2 έχει μειωμένη έκφραση, ελέγχθηκε κατά πόσο είναι λειτουργική στην κυτταρική γήρανση και αντιπαρατέθηκε η δράση της με εκείνη της CHIP λιγάσης. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η επίδραση τόσο της υπερέκφρασης όσο και της αποσιώπησης της έκφρασης της CHIP και της Mdm2, αλλά και η αναστολή της δραστηριότητας της Mdm2 επάνω στα επίπεδα έκφρασης της p53 πρωτεΐνης. Βρέθηκε, λοιπόν, ότι η υπερέκφραση της CHIP στα νεαρά κύτταρα, σε επίπεδα παρόμοια με αυτά που ανιχνεύτηκαν κατά τη γήρανση, οδηγεί σε αποδόμηση της p53 κάτω από τα βασικά της επίπεδα που φυσιολογικά παρατηρούνται στα νεαρά κύτταρα. Επιπλέον, ενώ η εξαρτώμενη από την Mdm2 ρύθμιση της p53 λαμβάνει χώρα τόσο στα νεαρά όσο και στα

γηρασμένα κύτταρα, η CHIP λιγάση συμβάλει στη ρύθμιση των επιπέδων της p53 κυρίως στη γήρανση.

Επιπρόσθετα, είναι πλέον γνωστό ότι η CHIP αποτελεί βασικό αλληλεπιδρόν μόριο των κύριων κυτταροπλασματικών σαπερονών, γνωστές ως πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsp70/90 και τη συν-συνοδό πρωτεΐνη Hsp40, καθώς επίσης ότι η p53 ρυθμίζεται από αυτές τις σαπερόνες. Έτσι, ελέγχθηκαν τα επίπεδα των προαναφερθέντων πρωτεϊνών, τα οποία βρέθηκαν μειωμένα στα γηρασμένα κύτταρα, δεικνύοντας μία ελάττωση του μηχανισμού πρωτεϊνικής αναδίπλωσης κατά τη γήρανση. Ακόμα, αναλύθηκε η επίδραση της αναστολής της δραστηριότητας της Hsp90 επάνω στο προφίλ έκφρασης της p53, η οποία βρέθηκε ότι αποδομείται ραγδαία στους γηρασμένους ινοβλάστες, εξαιτίας της εξειδικευμένης αύξησης των επιπέδων αλλά και της ενεργότητας λιγάσης ουμπικιτίνης της CHIP. Επομένως, τα παραπάνω δεδομένα καταδεικνύουν την εξειδικευμένη δράση της CHIP λιγάσης, αλλά και την υπερίσχυση του πρωτεολυτικού συστήματος με τη μεσολάβηση της CHIP για την αποδόμηση της p53 πρωτεΐνης έναντι του συστήματος των μοριακών σαπερονών κατά την κυτταρική γήρανση. Συνοπτικά, η CHIP λιγάση εμπλέκεται στη ρύθμιση του p53 μονοπατιού κατά την εκδήλωση του φαινομένου της αναδιπλασιαστικής γήρανσης.



## ABSTRACT

Ageing is a physiological, non-reversible phenomenon that occurs in all organisms. Both genetic and environmental factors influence the ageing process. In specific, ageing includes distinct, non-reversible changes in the anatomy, physiology and adaptability of the multicellular organisms. Ageing also involves different organs and tissues and finally results to progressive degeneration of cellular homeostasis, which means the organismal ability to maintain the structural and functional integrity.

Replicative senescence in human fibroblasts is accompanied by alterations in various biological processes, including the impaired function of the proteasome. The proteasome, the major cellular non-lysosomal threonine protease and especially the ATP/ubiquitin-dependent intracellular protein degradation pathway mediated by the 26S complex, is responsible for the removal of both normal and damaged proteins. Due to its latter function, proteasome is also considered as a representative secondary antioxidant cellular mechanism. The function and the expression of the proteasome are decreased in replicative senescence, while its overexpression delays the senescence in human fibroblasts.

P53 protein is one of the most important transcriptional regulators that causes cells to repair, arrest or die when stressed or damaged. Its transcriptional targets include a variety of genes involved in cell cycle control, DNA repair, apoptosis and cellular senescence. In mammalian cells, senescence induced by p53 protein occurs either due to telomere shortening which triggers replicative senescence, or due to detrimental cellular damage, like the stress-induced cellular senescence. It is well established that p53 has a central role in organismal ageing and is responsible for induction of the senescent phenotype, but only a high level of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16<sup>Ink4a</sup> is capable of making this process irreversible. p53 is activated upon entry into senescence and specifically, it is stabilized and differentially regulates its transcriptional targets; with p21<sup>Cip1/Waf1</sup> being the best characterised example of transactivation related to senescence induction. Different theories implicate p53 as the main regulator of organismal ageing, but its biological function needs to be elucidated through the complicated network of proteins that p53 interacts with.

In normal cells, p53 is kept at very low levels through a number of post-translational modifications and the ubiquitin-dependent proteasomal degradation has emerged as a fundamental mechanism of p53 regulation. Mdm2 is considered the major p53 regulator that acts as an E3 ligase and ubiquitinates p53. p53 transcriptionally activates the expression of

Mdm2 in a negative feedback loop. Mdm2 functions as an E3 ligase, covalently attaching ubiquitin molecules to p53, which leads to both the export of p53 to the cytoplasm and its proteasomal degradation. Augmenting the level of complexity of p53 regulation, a number of other p53 E3 ligases have been recently identified that act independently of Mdm2. These include Pirh2, Cop1, TOPORS and CHIP (C-terminus of Hsp70-interacting protein).

Given the large amount of E3 ligases responsible for p53 ubiquitination, the particular research aimed at identifying specific E3 ligases that regulate p53 stability during the manifestation of replicative senescence in human fibroblasts. For this purpose, we studied the expression levels of p53 and its main ligases in replicative senescence, as also in premature senescence caused by partial proteasome inhibition. Thus, we have demonstrated that CHIP is the only E3 ligase, among the p53 ligases tested, that is up-regulated in mRNA and protein level concomitant with a significant down-regulation of p53 in senescent fibroblasts. In contrast, the continuous silencing of CHIP expression leads to premature senescence of human fibroblasts. Moreover, we have established in this study that CHIP partially translocates to the nucleus and acquires elevated ubiquitination levels in senescent cells, suggesting an enhanced ligase activity during senescence.

Furthermore, since Mdm2 was found to be down-regulated in senescent fibroblasts, we studied its function in correlation with the activity of CHIP ligase. Therefore, we examined the effect of either overexpression or silencing the expression of each ligase, CHIP and Mdm2, as also the inhibition of Mdm2 function on p53 protein expression. Notably, CHIP overexpression in young cells, to levels similar to those recorded during senescence, leads to p53 degradation below its basal levels. In addition, while Mdm2-dependent regulation of p53 occurs in both young and senescent fibroblasts, CHIP ligase participates in regulating p53 levels mainly in senescence.

Moreover, it is well established that CHIP is a bona fide interaction partner of the major cytoplasmic chaperones, namely the heat shock proteins Hsp70/Hsp90 and the co-chaperone Hsp40 and also, the proper folding of p53 is regulated by these chaperones. The protein levels of the above mentioned chaperones were also examined and they were found to be significantly down-regulated in senescent cells, suggesting attenuation in the molecular folding-refolding machinery during senescence. The effect of chaperone inhibition on the p53 degradation profile was also analysed using a specific inhibitor of Hsp90 activity that blocks the proper folding of its substrates, including p53. The inhibition of Hsp90 activity leads to p53 rapid degradation only in senescent cells due to the specific up-regulation of the levels and the activity of the chaperone-associated CHIP ligase. Taken together, the aforementioned

data reveal the involvement of CHIP ubiquitin ligase in the regulation of p53 pathway towards the manifestation of cellular senescence.

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Είναι γνωστό ότι η διαδικασία της πρωτεϊνικής αποδόμησης και οι πρωτεολυτικοί μηχανισμοί του κυττάρου αποτελούν συστήματα που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιοστασίας, ενώ υφίστανται τροποποιήσεις κατά την εξέλιξη του φαινομένου της γήρανσης. Η γήρανση αποτελεί ένα καθολικό φαινόμενο που εμφανίζεται σε όλους τους οργανισμούς και τα φυσιολογικά κυτταρικά συστήματα. Κεντρικό ρόλο σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνεται και η γήρανση, διαδραματίζει η πρωτεΐνη p53. Υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που προσπαθούν να εξηγήσουν τον τρόπο με τον οποίο η p53 συμβάλλει στην εξέλιξη του φαινομένου της κυτταρικής γήρανσης, αλλά ο ακριβής μηχανισμός παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος. Φυσικά, η λειτουργία της p53 πρέπει να διερευνηθεί μέσα από το πολύπλοκο δίκτυο των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά και οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση της σταθερότητας του μορίου αυτού στο εσωτερικό του κυττάρου.

Επομένως, σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη της σταθερότητας της p53 πρωτεΐνης σε διάφορες κυτταρικές φάσεις και ιδιαίτερα κατά την κυτταρική γήρανση, εξετάζοντας το μηχανισμό αποδόμησης της σε αντιδιαστολή με το σύστημα που εξασφαλίζει τη σωστή αναδίπλωση και λειτουργικότητα αυτού του μορίου. Τα ερωτήματα που αποτέλεσαν το σκοπό της παρούσας εργασίας ήταν τα εξής:

1. Εάν η πρωτεΐνη p53 σημαίνεται για ουμπικιτυλίωση από ειδικές E3 λιγάσες κατά τη φυσιολογική αναδιπλασιαστική γήρανση των ανθρώπινων ινοβλαστών.
2. Εάν η πρωτεΐνη p53 και οι κύριες λιγάσες της διατηρούν το ίδιο πρότυπο έκφρασης κατά την πρόιμα επαγόμενη γήρανση λόγω μερικής πρωτεοσωμικής αναστολής, όπως συμβαίνει κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση.
3. Εάν μεταβάλλεται και πώς η έκφραση των p53-ειδικών λιγασών σε συνθήκες α) ενεργοποίησης του πρωτεοσώματος, β) ελεγχόμενης έκφρασης της p53 και γ) οξειδωτικού στρες.
4. Εάν η p53 πράγματι σημαίνεται για ουμπικιτυλίωση από κάποια/ες συγκεκριμένη/ες λιγάση/ες στους γηρασμένους ινοβλάστες, ποιος είναι ο μηχανισμός δράσης και ποιος ο ρόλος του συστήματος των μοριακών σαπερονών κατά την κυτταρική γήρανση.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γήρανση

Η αναπτυξιακή πορεία όλων των πολυκύτταρων οργανισμών χαρακτηρίζεται από διάφορα αναπτυξιακά στάδια, τα οποία περιλαμβάνουν μη αντιστρεπτές μεταβολές στην ανατομία, στη φυσιολογία, αλλά και στην προσαρμοστικότητα τους, οι οποίες αυξάνουν την πιθανότητα θανάτου. Οι μεταβολές που υφίσταται κάθε οργανισμός μπορεί να είναι απότομες ή και βαθμιαίες. Το φαινόμενο της αλληλοδιαδοχής διάφορων αναπτυξιακών σταδίων, με κατάληξη το θάνατο, καλείται γήρανση. Κατά την εξέλιξη του φαινομένου της γήρανσης, παρατηρείται μία προοδευτική και γενικευμένη απώλεια της κυτταρικής ομοιοστασίας, δηλαδή της ικανότητας του οργανισμού να διατηρεί τη δομική και λειτουργική του ακεραιότητα [1].

Η γήρανση δεν αποτελεί ένα είδος διαδεδομένης ασθένειας, αλλά μία βιολογική, φυσιολογική, μη αναστρέψιμη διαδικασία, η οποία συνοδεύεται από ανατομικές και λειτουργικές μεταβολές σε όλο το σώμα. Πρόκειται για ένα καθολικό φαινόμενο που δεν κάνει διακρίσεις, εμφανίζεται σε όλους τους οργανισμούς και επηρεάζεται τόσο από γενετικούς όσο και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η γήρανση χαρακτηρίζεται από βιοχημικές μεταβολές στη σύσταση των ιστών, όπως την αυξημένη ποσότητα εξωκυττάρων ουσιών, του κολλαγόνου και τη διασύνδεση (cross-linking) των ινιδίων κολλαγόνου ή τα αυξημένα επίπεδα μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως η οξειδωση, η διαδοχική πτώση των φυσιολογικών λειτουργιών, της καρδιακής ή της νεφρικής λειτουργίας, η μειωμένη ικανότητα αντίδρασης στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, η πτώση της ομοιοστασίας και η αυξημένη ευαισθησία σε ασθένειες [1, 2].

Το προσδόκιμο ζωής (μέσος όρος ζωής) καθορίζεται από τη μέγιστη ηλικία στην οποία φτάνει το 50% ενός πληθυσμού, ενώ το μέγιστο προσδόκιμο ζωής προσδιορίζεται από τη μέγιστη ηλικία στην οποία έχουν φτάσει κάποια μέλη του πληθυσμού. Και οι δύο όροι αναφέρονται σε έναν πληθυσμό και όχι σε μεμονωμένα άτομα. Ο μέσος όρος ζωής του ανθρώπινου πληθυσμού έχει παρουσιάσει τεράστια αύξηση τα τελευταία 100 χρόνια, με τη βελτίωση των συνθηκών διαβίωσης, αλλά και τις εξελίξεις στον ιατροφαρμακευτικό τομέα. Αντίθετα, το μέγιστο προσδόκιμο ζωής για τον ανθρώπινο πληθυσμό έχει παραμείνει σταθερό, γεγονός που δεικνύει ότι υπάρχει ένα ανώτατο όριο που πιθανά καθορίζεται από το γενετικό υπόβαθρο του κάθε πληθυσμού [2].

Το φαινόμενο της γήρανσης εμφανίζεται πολύ νωρίς κατά την εξέλιξη, ξεκινώντας ήδη από τους κατώτερους οργανισμούς, όπως τα ασπόνδυλα (π.χ. νηματώδεις σκόληκες). Παρόλο που τα χαρακτηριστικά γήρανσης της κάθε ταξινομικής ομάδας διαφέρουν και ποικίλουν, η γήρανση όλων των ειδών έχει συσχετιστεί, μεταξύ των άλλων, με τη σταδιακή κατάρρευση της ομοιοστασίας των οργανισμών. Έτσι, αν και η εμφάνιση της γήρανσης είναι αδύνατον να αποφευχθεί, η μακροβιότητα μπορεί να ρυθμιστεί έμμεσα από τη ρύθμιση και τη διατήρηση των ομοιοστατικών μηχανισμών που διέπουν τις κυτταρικές λειτουργίες [1]. Οι τρόποι ρύθμισης της ομοιοστασίας των οργανισμών, ο ρόλος του γενετικού και περιβαλλοντικού υποβάθρου στην εξέλιξη του φαινομένου της γήρανσης, πώς και γιατί εξελίχθηκε το φαινόμενο, είναι σημεία που ερευνώνται αλλά ακόμα δεν είναι πλήρως κατανοητά. Όλα αυτά αποδεικνύουν περαιτέρω την πολυπλοκότητα του φαινομένου.

### 1.1.1 *In vivo* Γήρανση

Σε επιστημονικό και πειραματικό επίπεδο, το φαινόμενο της γήρανσης μπορεί να κατηγοριοποιηθεί και να μελετηθεί σε δύο επίπεδα: στην *in vivo* γήρανση και στην *in vitro* γήρανση. Η δεύτερη αποτελεί ένα μοντέλο που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο και προσομοιάζει το φαινόμενο της *in vivo* γήρανσης [3, 4].

Η *in vivo* γήρανση μελετάται με: α) τη χρήση πειραματόζωων, β) εξετάζοντας υγιείς αιωνόβιους και γ) εξετάζοντας τα σύνδρομα πρόωμης γήρανσης. Α) Ορισμένα ζώα, όπως η *Drosophila* και ο *C. Elegans*, έχουν μικρό χρόνο ζωής που τα καθιστά ιδανικά για τη μελέτη του φαινομένου της γήρανσης. Άλλοι μονοκύτταροι οργανισμοί, όπως ο *Saccharomyces cerevisiae*, έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί [5]. Μερικοί μηχανισμοί έχουν καθολική ισχύ σε διάφορα πειραματικά μοντέλα. Συγκεκριμένα, η μείωση του μεταβολικού ρυθμού με τον περιορισμό των θερμίδων φαίνεται να είναι αποτελεσματική σε μεγάλο αριθμό ζωικών ειδών. Ωστόσο η φυσιολογία του ανθρώπου διαφέρει σημαντικά από τους οργανισμούς που προαναφέρθηκαν. Στην πραγματικότητα, φαίνεται ότι υπάρχουν μηχανισμοί γήρανσης οι οποίοι είναι κοινοί για τα διάφορα ζωικά είδη, όπως επίσης και μηχανισμοί μοναδικοί για κάθε είδος [6].

Β) Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να αντλούνται πολύτιμες πληροφορίες από συγκεκριμένες ομάδες του ανθρώπινου πληθυσμού, όπως η ομάδα των αιωνόβιων, που θεωρούνται πολύ καλό ανθρώπινο μοντέλο "επιτυχούς" γήρανσης. Οι υγιείς αιωνόβιοι παρότι έχουν φτάσει σε εξαιρετικά μεγάλη ηλικία, έχουν ξεφύγει από τις ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση και συνήθως βρίσκονται σε καλή ψυχική και πνευματική κατάσταση. Μελέτες σχετικά με αυτήν την ομάδα ατόμων προτείνουν ότι οι αιωνόβιοι είναι

άτομα που φέρουν είτε αυξημένα επίπεδα προστατευτικών μορίων ή εναλλακτικά, διαφοροποιημένα βιοχημικά μονοπάτια που ενεργοποιούν τέτοιου είδους μόρια, είτε τα ίδια προστατευτικά μόρια με τα υπόλοιπα άτομα του πληθυσμού, αλλά εφοδιασμένα με αυξημένο χρόνο λειτουργίας [7].

Γ) Ένας ενδιαφέρων φαινότυπος στη βιολογία της γήρανσης είναι η επιταχυνόμενη γήρανση, που εμφανίζεται σε ανθρώπους και ζώα ως αποτέλεσμα ορισμένων μεταλλάξεων. Τα λεγόμενα «σύνδρομα προγηρίας» είναι σπάνιες γενετικές νόσοι, με χαρακτηριστικά παραδείγματα το σύνδρομο Werner's (σύνδρομο προγηρίας σε ενήλικες), το σύνδρομο Hutchinson-Gilford (σύνδρομο προγηρίας σε παιδιά) και το σύνδρομο Down (τρισωμία 21) [8], τα οποία διαφοροποιούνται κυρίως με βάση το χρόνο εμφάνισής τους. Το σύνδρομο Werner οφείλεται σε υπολειπόμενη μεταλλαγή ενός γονιδίου που κωδικοποιεί μια RecQ ελικάση [9], η οποία εμπλέκεται στην επιδιόρθωση του DNA. Έτσι, κύτταρα που προέρχονται από ασθενείς με αυτό το σύνδρομο εμφανίζουν αυξημένη γενωμική αστάθεια [10], πραγματοποιώντας πολύ μικρότερο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα [11]. Παρόμοια, στο σύνδρομο Hutchinson-Gilford μεταλλάσσεται η πυρηνική πρωτεΐνη Lamin A/C [12]. Όλα τα παραπάνω σύνδρομα προσφέρονται ως μοντέλα για τη μελέτη των μηχανισμών που ευθύνονται για την «ανεπιτυχή» εξέλιξη της γήρανσης, προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα για τη φυσιολογική διαδικασία του φαινομένου.

### 1.1.2 *In vitro* Γήρανση

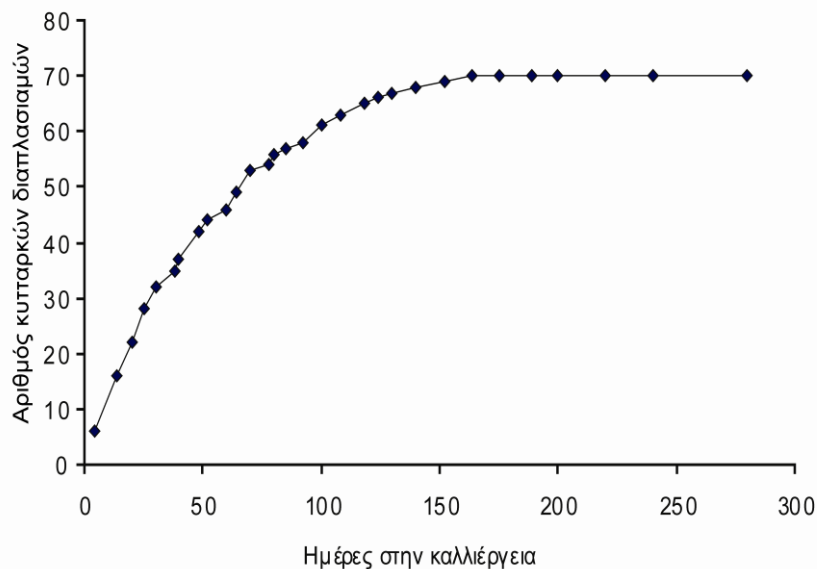
Η μελέτη του φαινομένου της γήρανσης *in vivo* δεν είναι εύκολη, εξαιτίας των βιοηθικών προβλημάτων που δημιουργούνται από τις απευθείας μελέτες σε εθελοντές, αλλά και των πρακτικών προβλημάτων από την ανάγκη για μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Επομένως, αναζητήθηκε ένα μοντέλο για τη μελέτη του φαινομένου της γήρανσης σε *in vitro* συνθήκες. Μέχρι στιγμής, έχουν αναφερθεί δύο είδη *in vitro* γήρανσης: α) η αναδιπλασιαστική γήρανση και β) η πρόωρα επαγόμενη γήρανση λόγω στρες.

- **Αναδιπλασιαστική γήρανση**

Τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα, όταν μεταφερθούν στην καλλιέργεια, χάνουν σταδιακά το πολλαπλασιαστικό τους δυναμικό και αφού πραγματοποιήσουν συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διπλασιασμών, φτάνουν στο σημείο της μη αντιστρεπτής παύσης του πολλαπλασιασμού τους. Η διαδικασία της διαδοχικής μείωσης του κυτταρικού πολλαπλασιαστικού δυναμικού είναι γνωστή ως αναδιπλασιαστική γήρανση (replicative senescence), δηλαδή γήρανση που καθορίζεται από τον πραγματοποιούμενο αριθμό

κυτταρικών διαιρέσεων και όχι από το χρόνο που τα κύτταρα διατηρούνται στην καλλιέργεια [3].

Η αναδιπλασιαστική γήρανση συνδέεται άμεσα με τη σταδιακή μείωση των τελομερών. Σε κάθε κυτταρική διαίρεση, το μήκος των τελομερών μειώνεται σταδιακά, έως ότου φτάσει σε ένα συγκεκριμένο μήκος στο οποίο πιστεύεται πως ενεργοποιείται πλέον ο γηρασμένος φαινότυπος [13]. Η διαδικασία αυτή έχει ονομαστεί ρεπλικόμετρο, δηλαδή είδος "μετρητή" των κυτταρικών διπλασιασμών [14]. Αν σε ένα γράφημα αποτυπωθεί ο αριθμός των διπλασιασμών που πραγματοποιούν οι ανθρώπινοι ινοβλάστες στην καλλιέργεια σε σχέση με το χρόνο που αυτά διατηρούνται στις *in vitro* συνθήκες, λαμβάνεται η «τυπική καμπύλη του Hayflick», που εκφράζει την *in vitro* ανάπτυξη των φυσιολογικών ινοβλαστών (Εικ. 1). Πρόκειται για μία λογαριθμική καμπύλη αύξησης, στην οποία αρχικά ο ρυθμός διπλασιασμού είναι αυξημένος και σταδιακά μειώνεται για να φτάσει σε κάποιο σημείο όπου τα κύτταρα πλέον παύουν να πολλαπλασιάζονται, οπότε εμφανίζεται το «plateau της καμπύλης» (Εικ. 1). Ο συνολικός χρόνος ζωής των κυττάρων σε *in vitro* συνθήκες είναι γνωστός και ως «όριο Hayflick» (Hayflick limit).



### Εικόνα 1 Καμπύλη του Hayflick

Ανθρώπινοι εμβρυϊκοί ινοβλάστες διαίρονται στην καλλιέργεια καθ' όλη τη διάρκεια της *in vitro* ζωής τους και καταμετρείται ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων σε σχέση με το χρόνο παραμονής τους στην καλλιέργεια. Μία μεγάλη περίοδος συνεχούς αύξησης ακολουθείται από μία περίοδο με μειωμένο ρυθμό αύξησης, που καταλήγει σε παύση του πολλαπλασιασμού.



Ένα μεγάλο ερώτημα στο πεδίο της γήρανσης είναι το αν μελετώντας το φαινόμενο της *in vitro* αναδιπλασιαστικής γήρανσης, μπορεί να γίνει κατανοητό το φαινόμενο της *in vivo* γήρανσης. Έως σήμερα, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις συσχέτισης των δύο φαινομένων. Αρχικά, κύτταρα που προέρχονται από άτομα που πάσχουν από σύνδρομα πρόωρης γήρανσης (σύνδρομα Hutchinson-Gilford και Werner's) δίνουν μικρότερο αριθμό διπλασιασμών στην καλλιέργεια σε σχέση με κύτταρα από αντίστοιχους υγιείς δότες. Επιπλέον, έχει βρεθεί πως το μέγιστο προσδόκιμο ζωής κάθε είδους σχετίζεται ανάλογα με το *in vitro* προσδόκιμο ζωής των ινοβλαστών του κάθε είδους [15]. Έτσι, ανθρώπινοι ινοβλάστες δίνουν πολύ μεγαλύτερο αριθμό κυτταρικών διπλασιασμών στην καλλιέργεια από ινοβλάστες τρωκτικών.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές αναφορές που υποστηρίζουν την αρνητική σχέση ανάμεσα στην ηλικία του δότη και το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων του *in vitro*, δηλαδή όσο μεγαλύτερος ο δότης, τόσο μικρότερος ο αριθμός κυτταρικών διπλασιασμών που πραγματοποιούν τα κύτταρά του *in vitro* [16]. Δεν πρέπει όμως να παραληφθεί η αναφορά μιας μελέτης που υποστηρίζει ότι ο αριθμός των διπλασιασμών που τα κύτταρα κάποιου δότη πραγματοποιούν στην καλλιέργεια, είναι περισσότερο συνάφεια της υγείας του δότη και όχι της ηλικίας αυτού [17]. Τέλος, ο πλέον αποδεκτός δείκτης γήρανσης, η ενεργότητα SA-β-γαλακτοσιδάσης ανιχνεύτηκε σε κύτταρα δοτών μεγάλης ηλικίας [18]. Συνεπώς, αν και θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλοι οι περιορισμοί που διέπουν το συσχετισμό μεταξύ *in vitro* και *in vivo* γήρανσης, φαίνεται ότι το μοντέλο της αναδιπλασιαστικής γήρανσης είναι το καλύτερο και το πλέον αποδεκτό *in vitro* σύστημα μελέτης του φαινομένου της γήρανσης των κυττάρων των θηλαστικών [13].

- **Χαρακτηριστικά αναδιπλασιαστικής γήρανσης**

Κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση, τα κύτταρα φέρουν κάποια ιδιαίτερα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα νεαρά. Συγκεκριμένα, μεταβάλλεται σταδιακά η μορφολογία τους, καθώς από μακρόστενα με οξύληκτα άκρα που μεγαλώνουν σε παράλληλους στοίχους μετατρέπονται σε πεπλατυσμένα, που αυξάνονται χωρίς κάποια δομή στο χώρο, οι πυρήνες τους διογκώνονται, το δίκτυο του κυτταροσκελετού τους οργανώνεται διαφορετικά, η σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης διαφοροποιείται και εμφανίζουν αυξημένο ρυθμό βιογένεσης λυσοσωμάτων [19]. Επίσης, γεμίζουν με κοκκία λιποφουσκίνης [20], υλικό με ενδογενή φθορισμό, που προέρχεται κυρίως από οξειδωμένα παράγωγα λιπιδίων και πρωτεϊνών τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς και υδρόφοβους δεσμούς. Η συσσώρευση λιποφουσκίνης έχει επιπτώσεις σε διάφορες κυτταρικές

λειτουργίες, όπως είναι η επαγωγή ελευθέρων ριζών που αυξάνουν το ενδοκυτταρικό οξειδωτικό στρες, αποσταθεροποίηση των λυσοσωμάτων, μείωση αυτοφαγοκυττάρωσης και αναστολή της δράσης του πρωτεοσώματος [21].

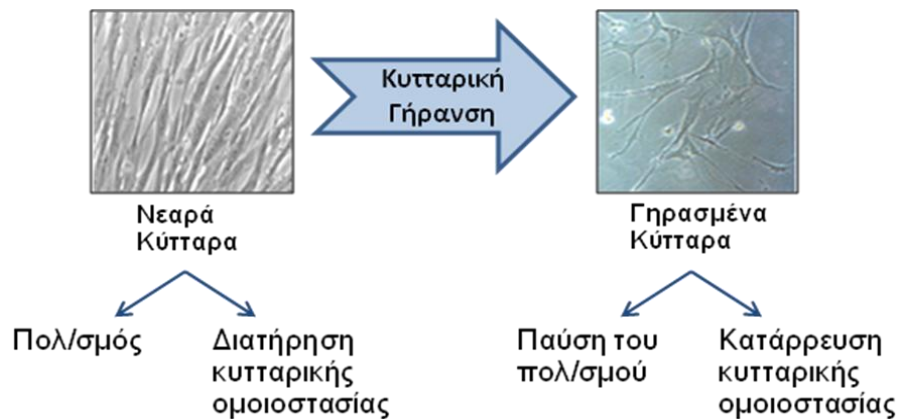
Ως προς τα βιοχημικά χαρακτηριστικά, τα γηρασμένα κύτταρα μπορούν να παραμείνουν στη φάση μη διπλασιασμού άθικτα αλλά μεταβολικά ενεργά για χρόνια [22]. Διατηρούν την ικανότητα να συνθέτουν RNA και πρωτεΐνες, όχι όμως DNA. Τα γηρασμένα κύτταρα είναι μόνιμα σταματημένα στην G<sub>1</sub> φάση του κυτταρικού κύκλου, οπότε και διαφοροποιούνται από τα κύτταρα που είναι σταματημένα στην G<sub>0</sub> φάση και δε συνθέτουν DNA λόγω της αναστολής εξ' επαφής. Επιπρόσθετα, παρουσιάζουν αυξημένη ενεργότητα της όξινης SA-β-γαλακτοσιδάσης, ενός από τους πλέον αποδεκτούς δείκτες γήρανσης που σχετίζεται με τον αυξημένο ρυθμό βιογένεσης λυσοσωμάτων [18], καθώς και αυξημένα επίπεδα άλλων γονιδίων, όπως η οστεονεκτίνη, η ινονεκτίνη και η απολιποπρωτεΐνη J [17]. Επίσης, έχουν υψηλά επίπεδα ενεργότητας μεταλλοπρωτεϊνών, ενζύμων που αποδομούν τον εξωκυττάριο χώρο, μειωμένη ικανότητα να εκφράζουν πρωτεΐνες θερμικού στρες τόσο *in vivo* [23] όσο και *in vitro* [24] και αυξημένο αριθμό μεταλλάξεων του μιτοχondριακού DNA [25]. Τέλος, ενώ τα φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα είναι διπλοειδή, με κάθε ανακαλλιέργεια αυξάνει ο αριθμός των πολυπλοειδικών κυττάρων [26].

#### • Πρόωρα επαγόμενη γήρανση εξαιτίας στρες

Εκτός από το ρεπλικόμετρο και τον αριθμό των πραγματοποιούμενων κυτταρικών διαρέσεων, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που αν και δε σχετίζονται άμεσα με το ρεπλικόμετρο, μπορούν να ενεργοποιήσουν σε νεαρά κύτταρα την εμφάνιση μιας κυτταρικής διαδικασίας που φαινοτυπικά και βιοχημικά μοιάζει με την αναδιπλασιαστική γήρανση και ονομάζεται πρόωρα επαγόμενη γήρανση εξαιτίας στρες (stress-induced premature senescence, SIPS).

Παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν τα νεαρά κύτταρα σε πρόωρη γήρανση είναι διάφορα οξειδωτικά, όπως το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [27], η υπερέκφραση του ογκογονιδίου *ras* σε φυσιολογικά νεαρά κύτταρα [28], η αναστολή βασικών κυτταρικών μονοπατιών, όπως της PI-3 κινάσης [29], καθώς και η αναστολή της λειτουργίας του πρωτεοσώματος [30]. Όπως στην αναδιπλασιαστική γήρανση, έτσι και σε αυτό το είδος *in vitro* γήρανσης, η μόνιμη παύση του πολλαπλασιασμού επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης ογκο-κατασταλτικών γονιδίων, του p53 και των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKIs), p16<sup>INK4A</sup>, p19<sup>ARF</sup> και p21<sup>Cip1/Waf1/sdi1</sup> [31].

Φανερά, υπάρχουν δύο βασικοί μηχανισμοί που ελέγχουν την *in vitro* γήρανση, είτε την αναδιπλασιαστική, είτε την πρόωρα επαγόμενη [31, 32]. Ο πρώτος μηχανισμός σχετίζεται με τη μείωση του μήκους των τελομερών και λειτουργεί ως "μιτωτικό ρολόι" (mitotic clock) που ελέγχει διαρκώς την ακεραιότητα των τελομερών και ωθεί στην εμφάνιση του φαινότυπου της γήρανσης όταν αυτή η ακεραιότητα δεν υφίσταται πλέον. Ο δεύτερος μηχανισμός επάγει την εμφάνιση του πρόωρου γηρασμένου φαινότυπου, μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων του μήκους των τελομερών, οι οποίοι σχετίζονται με την ενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 και των αναστολέων των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών. Τα δύο είδη *in vitro* γήρανσης δεν είναι πανομοιότυπα, αλλά παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες [33].



**Εικόνα 2** Κυτταρικές λειτουργίες κατά την εξέλιξη της διαδικασίας της κυτταρικής γήρανσης

## 1.2 Το p53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο: Ιστορία της ανακάλυψής του

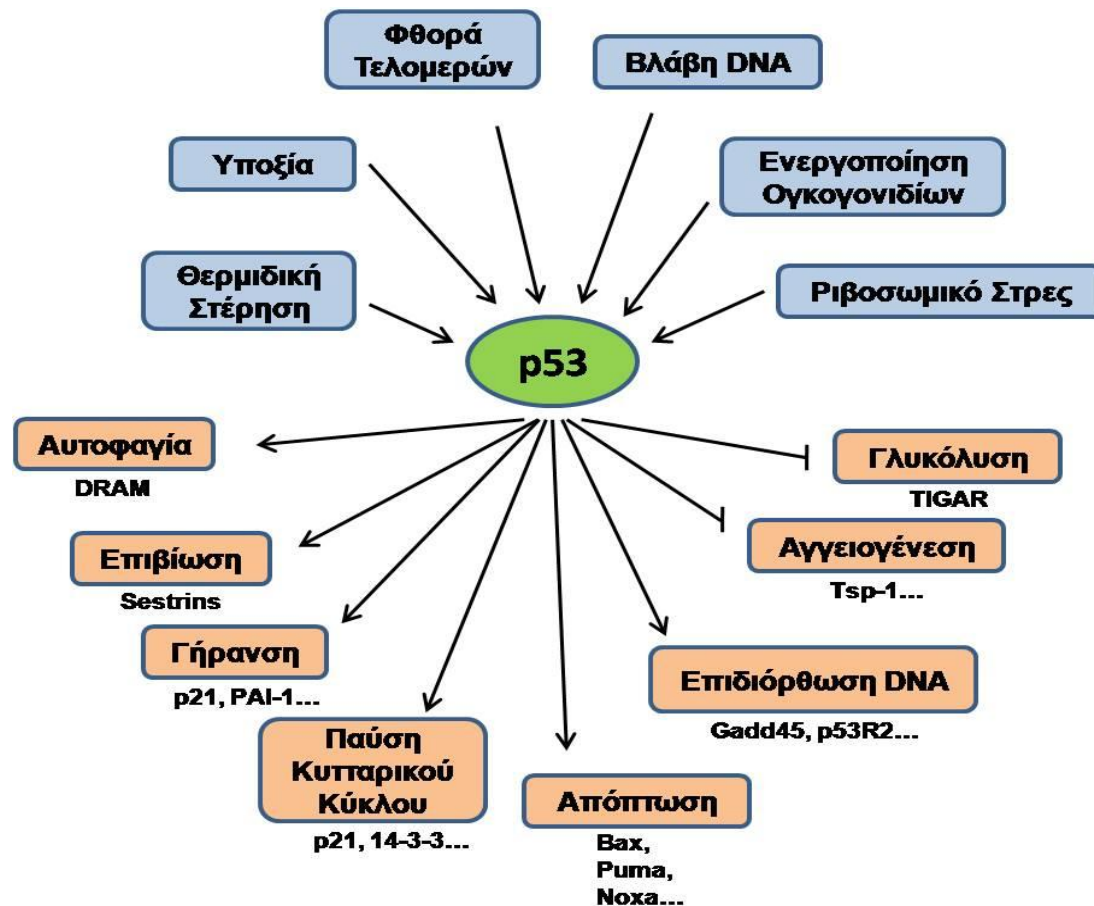
Το p53 ανακαλύφθηκε το 1979 ως μία πρωτεΐνη σε σύμπλοκο με το μεγάλο T-αντιγόνο του DNA ιού SV-40 [34, 35]. Παράλληλα, μία άλλη μελέτη ανέφερε υψηλά επίπεδα p53 σε μετασχηματισμένα κύτταρα χωρίς προηγούμενη ιική μόλυνση, προτείνοντας ότι κωδικοποιείται από κυτταρικά γονίδια. Ήδη από τα πρώτα χρόνια της ανακάλυψής του, αποκαλύφθηκε το μοναδικό χαρακτηριστικό του p53, που το διακρίνει από τα άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Το γονίδιο p53 κλωνοποιήθηκε [36, 37] και αρχικά περιγράφηκε ως ένα ογκογονίδιο λόγω της ικανότητάς του να μετασχηματίζει τα κύτταρα σε συνεργασία με το ογκογονίδιο H-Ras [38, 39]. Στη συνέχεια, δείχτηκε ότι αθανατοποιεί τα κύτταρα [40] και ενισχύει το δυναμικό ογκογένεσης κυττάρων που εισέρχονται σε ποντίκια [41, 42], ώσπου έγινε κατανοητό ότι αυτή η πρωτεΐνη ήταν το προϊόν ενός μεταλλαγμένου γονιδίου, που πράγματι προκαλούσε ογκογένεση. Ο σημαντικός ρόλος στην ογκογένεση φαίνεται από μελέτες σε ασθενείς με σύνδρομο Li-Fraumeni, οι οποίοι κληρονομούν ένα αλληλόμορφο μεταλλαγμένου p53 γονιδίου και έχουν μεγάλη προδιάθεση για καρκίνους [43].

Από τη στιγμή που κλωνοποιήθηκε το άγριου-τύπου p53, αποδείχτηκε ότι η φυσιολογικού-τύπου πρωτεΐνη μπλόκαρε την ικανότητα των ογκογονιδίων να μετασχηματίζουν τα κύτταρα [44-46]. Έγινε, επίσης, κατανοητό ότι ο SV-40 έπρεπε να απενεργοποιήσει το p53 προκειμένου να μετασχηματίσει τα κύτταρα [47]. Από τότε, το p53 κατατάχθηκε στα ογκοκατασταλτικά γονίδια και πολυάριθμες μελέτες έχουν καθιερώσει το ρόλο του στην προστασία των κυττάρων έναντι του καρκίνου [48]. Είναι χαρακτηριστικό ότι ποντίκια που δεν εκφράζουν p53 (p53 knock-out mice) αναπτύσσουν καρκίνους μέχρι την ηλικία των 6 μηνών [49, 50]. Το p53 μεταλλάσσεται στο 50% όλων των ανθρώπινων καρκίνων [51] και θεωρείται ως μία σημειακή μετάλλαξη παρά σαν απενεργοποίηση. Αυτή η μετάλλαξη του p53 γονιδίου αποδίδει νέες ογκογονικές ιδιότητες στην πρωτεΐνη p53. Η αναγνώριση του κυρίαρχου ρόλου του p53 στην προστασία έναντι των καρκίνων έχει προκαλέσει το μεγάλο αριθμό των επιστημονικών άρθρων, τα οποία ανέρχονται σε περίπου 20.000.

## 1.3 Λειτουργία της πρωτεΐνης p53

Η πρωτεΐνη p53 ενεργοποιείται έπειτα από την ενεργοποίηση διάφορων ογκογονιδίων ή βλάβη του DNA ή επάγεται ως απόκριση σε άλλους τύπους κυτταρικού στρες, όπως η υποξία και η μείωση των rNTPs, με αποτέλεσμα την αύξηση των περιστατικών μεταλλαγής στα κύτταρα και επομένως των πιθανοτήτων καρκινογένεσης (Εικ. 3). Με την παρουσία βλάβης στο DNA, η p53 ενεργοποιείται και ρυθμίζει τη μετάβαση του κυττάρου από τη

φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Προκαλεί, δηλαδή, παροδική αναστολή του κυτταρικού κύκλου, δίνοντας το χρόνο στο κύτταρο είτε να επιδιορθώσει τη βλάβη του DNA είτε να οδηγηθεί σε απόπτωση [48, 52]. Μπορεί, επίσης, να επηρεάσει μία ποικιλία άλλων βιολογικών διαδικασιών, όπως η κινητικότητα των κυττάρων, η αγγειογένεση, η διαφοροποίηση, η κυτταρική επιβίωση, η γλυκόλυση [53, 54] και η αυτοφαγία [55] (Εικ. 3).



**Εικόνα 3 Σχήμα απόκρισης της πρωτεΐνης p53**

Η πρωτεΐνη p53 επάγεται από μεγάλο αριθμό κυτταρικών στρες (μπλε κουτιά) και ρυθμίζει διαφορετικές βιολογικές διαδικασίες (πορτοκαλί κουτιά) μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης των γονιδίων-στόχων του.

### 1.3.1 Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας

Το γονίδιο p53 κωδικοποιεί για ένα μεταγραφικό παράγοντα και προάγει τις περισσότερες από τις βιολογικές του δραστηριότητες ρυθμίζοντας την έκφραση πολυάριθμων γονιδίων-στόχων (Εικ. 3), καθώς προσδέεται στις ειδικές αλληλουχίες, τα στοιχεία απόκρισης στην p53 (p53 responsive elements) στη ρυθμιστική περιοχή των γονιδίων-στόχων [56]. Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 ενεργοποιεί τη μεταγραφή των περισσότερων στόχων του στρατολογώντας είτε γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες (TATA-binding protein-associated factors) είτε ακετυλοτρανσφεράσες ιστόνης (HAT) είτε άλλους παράγοντες, όπως είναι οι CBP, p300 και PCAF, στον υποκινητή τους [57-60].

Ένα από τα πρώτα γονίδια-στόχοι του p53 που ανακαλύφθηκαν ήταν ο αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, που επάγει παύση του κυτταρικού κύκλου [61]. Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 επάγει απόπτωση, ενεργοποιώντας τα γονίδια που μεσολαβούν σε εξωγενή και ενδογενή αποπτωτικά μονοπάτια, μεταξύ των οποίων είναι οι υποδοχείς θανάτου Fas/CD95/Apo-1 και Killer/R5 και οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες Bax, Noxa και PUMA. Είναι αξιοσημείωτο ότι η πρωτεΐνη p53 μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση ανεξάρτητα από τη μεταγραφική της δραστηριότητα, αλληλεπιδρώντας άμεσα με μέλη της οικογένειας BCL-2 στα μιτοχόνδρια [62]. Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν τη μικροσυστοιχία RNA (micro-RNA) miR-34 ως γονίδιο-στόχο του p53. Τα miRNAs είναι μία τάξη μικρών ρυθμιστικών RNAs που μεσολαβούν στη μετα-μεταγραφική αποσιώπηση ειδικών στόχων mRNAs. Η οικογένεια miR-34 επάγεται άμεσα από το μεταγραφικό παράγοντα p53 ως απόκριση σε βλάβες του DNA και σε ογκογονικό στρες, προκαλώντας παύση του κυτταρικού κύκλου και απόπτωση μέσω αναστολής της γονιδιακής έκφρασης αντι-αποπτωτικών γονιδίων και γονιδίων του πολλαπλασιασμού [63, 64].

Ο μεταγραφικός παράγοντας p53 μεσολαβεί στην κυτταρική επιβίωση μέσω επιδιόρθωσης του DNA, επάγοντας γονίδια όπως το Gadd45 και το p53R2 και προστατεύει το γονιδίωμα από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), επάγοντας γονίδια όπως το TIGAR, Sestrins και Sco2, που μειώνουν τα επίπεδα των ενδικοκυττάρων ROS. Το γονίδιο TIGAR συμμετέχει στη ρύθμιση της γλυκόλυσης, αλλά δρα και ως αντι-οξειδωτικό, μειώνοντας τα ROS και προστατεύοντας από κυτταρικό θάνατο [53]. Επομένως, σε συνθήκες ήπιου στρες, η πρωτεΐνη p53 κατέχει επιβιωτικό ρόλο καθώς βοηθάει τα κύτταρα να ανταπεξέλθουν στο στρες, μειώνοντας τα επίπεδα των ROS και επιτρέποντας την επιδιόρθωση του DNA. Αντίθετα, όταν το στρες είναι πολύ ισχυρό και η βλάβη του DNA

ανεπανόρθωτη, η p53 εκκινεί μία μη αντιστρεπτή παύση του κυτταρικού κύκλου ή απόπτωση, προκειμένου να ελαττώσει τον αριθμό των βλαβερών κυττάρων [52].

Αρκετά γονίδια-στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα p53 αναστέλλουν την ενεργότητα του p53 μέσω ενός αυτορυθμιζόμενου κύκλου αρνητικής ανάδρασης (negative feedback loop). Ο p53 ενεργοποιεί μεταγραφικά τον κύριο αρνητικό ρυθμιστή του, το γονίδιο mdm2 (mouse double minute) [65, 66], μία λιγάση ουμπικιτίνης. Η Mdm2 λιγάση με τη σειρά της απενεργοποιεί την πρωτεΐνη p53 κυρίως στοχεύοντάς την για πρωτεοσωμική αποδόμηση και προωθώντας την έξοδό της από τον πυρήνα [67]. Παρόμοια, τα γονίδια-στόχοι Cop1 και Pirh2 κωδικοποιούν για E3 λιγάσες, που είναι ικανές να αποδομήσουν την p53.

Παρόλο που η μεταγραφή της πλειοψηφίας των γονιδίων-στόχων επάγεται με τη δράση του p53, υπάρχουν κάποια γονίδια των οποίων η μεταγραφή μειώνεται. Ο p53 εμποδίζει την ενεργοποίηση των υποκινητών αυτών των γονιδίων με ποικίλους τρόπους. Πρώτον, μπορεί να εμποδίσει την πρόσδεση των κατάλληλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως στην περίπτωση των NF- $\kappa$ B και CEBP, υπερκαλύπτοντας τις θέσεις πρόσδεσης στον υποκινητή. Μέσω αυτού του μηχανισμού, καταστέλλει τη μεταγραφή του BRCA1 και μερικών ακόμα γονιδίων [68]. Με αντίστοιχο τρόπο, καταστέλλει το αντι-αποπτωτικό γονίδιο Bcl-2, αποτρέποντας την ενεργοποίησή του από την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων POU4F1 [69]. Δεύτερον, έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά άμεσα με τους μεταγραφικούς παράγοντες Sp1, AP1 και άλλους, με σκοπό να μπλοκάρει την πρόσδεση στα γονίδια-στόχους, όπως της κυκλίνης B1 [70] και του TERT [71]. Τρίτον, στρατολογεί αποακετυλάσες ιστόνης (Histone DeAcetylases, HDACs) στους υποκινητές, μία διαδικασία που μεσολαβείται από την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη SIN3A, για την καταστολή γονιδίων, όπως το MAP4 και το stathmin [72].

Ένα από τα βασικά γονίδια-στόχους του p53, το CD44, αναστέλλεται από το p53 υπό συνθήκες βασικού στρες. Το CD44 κωδικοποιεί για ένα μόριο της κυτταρικής επιφάνειας και είναι ικανό να μπλοκάρει αποπτωτικά σινιάλα που επάγονται από στρες εξαρτώμενο από την πρωτεΐνη p53. Το CD44 διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην εξέλιξη των όγκων σε κύτταρα που δεν εκφράζουν p53. Απενεργοποίηση της λειτουργίας της p53 πρωτεΐνης στα καρκινικά κύτταρα αποκαταστέλλει την έκφραση της πρωτεΐνης CD44, η οποία είναι ουσιώδης για την ικανότητα έναρξης του όγκου σε μετασχηματισμένα επιθηλιακά κύτταρα θηλαστικών [73].

Η επιλογή της κατάλληλης p53 απόκρισης εξαρτάται από τον τύπο του συγκεκριμένου κυττάρου αλλά και του στρες, ενώ η επιλογή των κατάλληλων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων καθορίζουν τα γονίδια-στόχους που θα μεταγραφούν από το p53. Συγκεκριμένα, έπειτα από ακτινοβολία UV και βλάβη DNA, οι HIPK2 [74, 75] και DYRK2

[76] φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη p53 στη θέση S46 μέσω ενεργοποίησης του προ-αποπτωτικού γονιδίου p53AIP1. Ακετυλίωση της p53 στη λυσίνη 120 από τις MOF και TIP60 προάγει p53-εξαρτώμενη απόπτωση ως απόκριση σε βλάβη του DNA, μέσω των προ-αποπτωτικών γονιδίων PUMA και Bax [77, 78]. Ουμπικιτυλίωση της p53 από την E3 λιγάση E4F1 προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου, ενεργοποιώντας το p21, το Gadd45 και την κυκλίνη G1, χωρίς να επηρεάζει τα προ-αποπτωτικά γονίδια-στόχους [79]. Ακόμα και τα μέλη της p53 οικογένειας, p63 και p73, μπορούν επιλεκτικά να ενισχύσουν την αποπτωτική δράση της πρωτεΐνης p53 σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, προάγοντας την trans-ενεργοποίηση των πρωτεϊνών PERP και BAX, αλλά όχι της p21 [80].

Συνεπώς, το εύρος των γονιδίων-στόχων του παράγοντα p53 είναι εκτενές και εκτός των όσων αναφέρθηκαν παραπάνω, πρέπει να προστεθούν οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την κυτταρική μετανάστευση και την αγγειογένεση. Παρά το γεγονός ότι αυτές οι βιολογικές διαδικασίες έχουν διαφορετικούς ρόλους και μερικές φορές αντίθετους, όλες συμμετέχουν στην ογκοκατασταλτική ιδιότητα του μεταγραφικού παράγοντα p53.

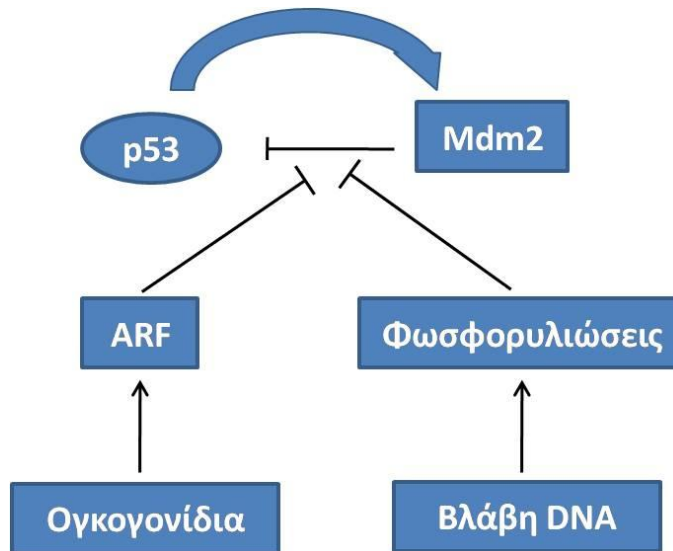
### 1.3.2 Ενεργοποίηση της πρωτεΐνης p53

Τα καλύτερα μελετημένα και πιο κατανοητά σιγάλα ενεργοποίησης της p53 είναι οι βλάβες του DNA και η ογκογονική ενεργοποίηση (Εικ. 4). Υπάρχουν διαφορετικά είδη βλάβης του DNA, αποτέλεσμα της γ- ή της υπεριώδους ακτινοβολίας, της αλκυλίωσης των βάσεων, της αποδιάταξης του DNA και των ελεύθερων ριζών οξυγόνου [81]. Οι κύριοι αισθητήρες της βλάβης του DNA είναι οι πρωτεΐνες ATM και ATR και οι κινάσες Chk1 και Chk2 [82-84], που φωσφορυλιώνουν την p53 και οδηγούν σε σταθεροποίηση και ενεργοποίησή της.

Η ογκογονική ενεργοποίηση οδηγεί σε συσσώρευση της p53 μέσω ενός μηχανισμού, ο οποίος μεσολαβείται κυρίως από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη ARF (p19<sup>ARF</sup> στον ποντικό και p14<sup>ARF</sup> στον άνθρωπο). Η πρωτεΐνη ARF (Alternative Reading Frame) είναι το προϊόν του γενετικού τόπου INK4a, που επίσης κωδικοποιεί για τον αναστολέα p16<sup>INK4a</sup>. Ογκογονίδια, όπως το Myc, το Ras και το E2F, επάγουν την έκφραση της πρωτεΐνης ARF, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της p53 απόκρισης [85-87], καθώς η ARF αναστέλλει τη δράση της λιγάσης Mdm2 [88-91]. Ποντίκια που δεν εκφράζουν ARF έχουν προδιάθεση για καρκίνους, αν και ο φαινότυπος δεν είναι τόσο σοβαρός όπως στην περίπτωση των ποντικών που δεν εκφράζουν p53 [92]. Άλλωστε, καρκινικές κυτταρικές σειρές που διατηρούν φυσιολογικού-τύπου p53 σχεδόν πάντα χάνουν την ARF, γεγονός που δεικνύει τη σημασία της σηματοδότησης μέσω αυτού του μονοπατιού κατά την ανάπτυξη των καρκίνων. Η απώλεια της ARF δεν εμποδίζει την ενεργοποίηση της p53 κατά την απόκριση σε βλάβη του



DNA, προτείνοντας ότι η ογκογονική ενεργοποίηση και η βλάβη του DNA είναι δύο ανεξάρτητα σινιάλα. Είναι βέβαιο ότι η κατάσταση είναι πιο περίπλοκη, εφόσον έχειδειχθεί ότι η απώλεια της ARF μειώνει την απόκριση σε βλάβη του DNA, ενώ η απώλεια της ATM μπορεί να μειώσει την ARF απόκριση [93].



#### Εικόνα 4 Ρύθμιση της πρωτεΐνης p53

Η Mdm2 λιγάση είναι ο κύριος αρνητικός ρυθμιστής της πρωτεΐνης p53, ενώ η p53 επάγει μεταγραφικά την Mdm2. Στρες, όπως η βλάβη του DNA και η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων, ενεργοποιούν την p53 αναστέλλοντας την Mdm2.

Η σπουδαιότητα αυτών των δύο μονοπατιών της p53 ενεργοποίησης στην καταστολή των όγκων παραμένει αμφιλεγόμενη. Από τη μία πλευρά, έχειδειχθεί ότι το μονοπάτι για τη βλάβη του DNA είναι ένα συμβάν που λαμβάνει χώρα νωρίς με την εμφάνιση των όγκων και η p53 απόκριση ενεργοποιείται για να προστατεύσει τα κύτταρα από το σχηματισμό όγκων [94, 95]. Από την άλλη, θεωρείται ότι η πρωτεΐνη p53 είναι σημαντική σαν ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη, μόνο αφού η πλειονότητα της βλάβης του DNA έχει ήδη επιλυθεί [96]. Σε συμφωνία με αυτήν την άποψη, μία ομάδα ερευνητών έδειξε ότι η σηματοδότηση μέσω ARF ευθύνεται για όλη σχεδόν την ογκοκατασταλτική δράση της p53 [97], που σημαίνει ότι η δράση της p53 έπειτα από ογκογονική ενεργοποίηση είναι η πιο σημαντική στη διαδικασία καταστολής των όγκων.

Εκτός των άλλων, το ριβοσωμικό στρες είναι ένας πολύ γνωστός ενεργοποιητής της p53. Για παράδειγμα, η χορήγηση στα κύτταρα του αναστολέα της RNA πολυμεράσης II, ακτινομυκίνη D, αποτελεί ένα στρες των ριβοσωμάτων, που μεσολαβείται από έναν αριθμό ριβοσωμικών πρωτεϊνών, L5, L11 και L23, οι οποίες προσδένονται στην Mdm2 λιγάση και την αναστέλλουν, οπότε η p53 σταθεροποιείται και ενεργοποιείται [98-101].

Τέλος, το μεταβολικό στρες λόγω έλλειψης θερμίδων μπορεί να ενεργοποιήσει την p53 μέσω του μονοπατιού που περιλαμβάνει την κίνηση AMP. Σε αυτήν την περίπτωση, η p53 προκαλεί παύση του κυτταρικού κύκλου παίζοντας επιβιωτικό ρόλο κατά τη διάρκεια της στέρησης της τροφής [102]. Η υποξία, επίσης, ενεργοποιεί το μονοπάτι της p53 και μπορεί να καταλήξει σε παύση του κυτταρικού κύκλου, αυτοφαγία ή απόπτωση, ανάλογα με τη σοβαρότητα του υποξικού στρες [103].

### 1.3.3 Δομή της πρωτεΐνης p53

Το γονίδιο p53 βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17p13 και αποτελείται από 393 αμινοξέα. Το 1988, αναγνωρίστηκαν 2 υποκινητές του γονιδίου p53. Ο πρώτος εντοπίζεται 100 έως 250 ζεύγη βάσεων ανοδικά του πρώτου εξωνίου και ο δεύτερος, ένας πιο ισχυρός υποκινητής, εντοπίζεται εντός του πρώτου εσωνίου [104]. Περιέχει 2 θέσεις έναρξης μεταγραφής στο εξώνιο 1, δύο εναλλακτικές θέσεις έναρξης μετάφρασης στα εξώνια 2 και 4, ενώ εναλλακτικό μάτισμα λαμβάνει χώρα στο εσώνιο 2 και μεταξύ των εξωνίων 9 και 10. Περιέχει 11 εξώνια και 10 εσώνια, που κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 53 KDa (GenBank Accession Number: NC\_000077).

Η πρωτεΐνη p53 είναι μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, αποτελούμενη από 2 διμερή που ενώνονται με ιοντικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός τετραμερούς με διεδρη συμμετρία. Κάθε υπομονάδα (μονομερές) της πρωτεΐνης αποτελείται από 3 λειτουργικές περιοχές: α) μία ενεργοποιημένη αμινομάδα που συμμετέχει στο μηχανισμό μεταγραφής (αμινοτελικό άκρο) (N-terminal transcriptional activation domain, TA), β) την κεντρική περιοχή που αλληλεπιδρά με το DNA (sequence-specific DNA-binding domain, DBD) και γ) το καρβοξυτελικό άκρο που είναι υπεύθυνο για το σχηματισμό των τετραμερών (oligomerization domain, OD) (Εικ. 5). Η κεντρική περιοχή πρόσδεσης στο DNA (κατάλοιπα αμινοξέων από 100 έως 300) αποτελεί τον πυρήνα της πρωτεΐνης, ο οποίος είναι ανθεκτικός σε διαδικασίες πρωτεόλυσης. Υπάρχει, επίσης, μία αμινοτελική περιοχή πλούσια σε προλίνες που εμπλέκεται στις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, μία ρυθμιστική περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο, καθώς και αρκετά σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και εξόδου από τον πυρήνα (NES). Ακόμα, εντοπίζονται πέντε πολύ συντηρημένες εξελικτικά περιοχές, τα κουτιά I έως V. Το κουτί I (κατάλοιπα 13-18) κρύβεται εντός της TA περιοχής και αποτελεί την περιοχή που αλληλεπιδρά με την Mdm2, ενώ τα κουτιά II, III, IV και V περιορίζονται στην DBD περιοχή και είναι οι πιο συχνά μεταλλαγμένες περιοχές στους καρκίνους (Εικ. 5).



### Εικόνα 5 Δομή της πρωτεΐνης p53

Φαίνονται οι κύριες περιοχές της πρωτεΐνης p53. Τα σήματα εξόδου από τον πυρήνα (NES), τα σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και οι θέσεις των συντηρημένων κουτιών I, II, III, IV και V. (TA - transactivation domain, PD - proline-rich domain, DBD - DNA binding domain, OD - oligomerization domain, RD – regulatory domain).

Στην αμινοτελική περιοχή οριοθετούνται δύο TA περιοχές, TA1 (κατάλοιπα αμινοξέων 1-42) και TA2 (κατάλοιπα 43-92) (Εικ. 5). Και οι δύο TA περιοχές αλληλεπιδρούν με τη βασική μεταγραφική μηχανή και ανεξάρτητα η κάθε μία επαρκεί για να επάγει μεταγραφή όταν συντήκονται με ετερόλογη περιοχή DBD. Οι δύο TA περιοχές ρυθμίζονται από σχετικές μεταξύ τους πρωτεΐνες, όπως η p300, η Mdm2 και η Pin1. Δομικές μελέτες αποκαλύπτουν ότι η αμινοτελική περιοχή φυσιολογικά δεν είναι διπλωμένη, αλλά διπλώνεται πλήρως έπειτα από σύνδεση με άλλα μόρια. Ένα θραύσμα αποτελούμενο από τα κατάλοιπα αμινοξέων 15-29 αποκτά μία διαμόρφωση α-έλικας έπειτα από σύνδεση με την αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης Mdm2. Δίπλα στην TA περιοχή βρίσκεται η PD (κατάλοιπα 64-92), αποτελούμενη από πέντε μοτίβα PXXP, τα οποία συμμετέχουν σε πολλαπλές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (Εικ. 5). Η λειτουργία της PD δεν είναι πλήρως κατανοητή και θεωρείται ότι συμβάλλει στην προ-αποπτωτική λειτουργία της p53. Επιπλέον, η αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης p53 υπόκειται σε πολλαπλές φωσφορυλιώσεις από διαφορετικές πρωτεϊνικές κινάσες.

Η περιοχή πρόσδεσης του DNA (DBD) είναι ουσιώδης για τη μεταγραφική δραστηριότητα της πρωτεΐνης p53 και κατ' επέκταση για τη βιολογική της λειτουργία. Περιλαμβάνει τα κατάλοιπα αμινοξέων 102-292 και περιέχει τις τέσσερις από τις πέντε υψηλά συντηρημένες περιοχές της p53, τα κουτιά II (κατάλοιπα αμινοξέων 117-142), III (αμινοξέα 171-181), IV (αμινοξέα 234-256) και V (αμινοξέα 270-286) (Εικ. 5). Η κρυσταλλική δομή της πρόσδεσης p53-DBD-DNA έχει επιλυθεί [105]. Αρκετές ακόμα δομές

έχουν αναφερθεί, όπως δομές της p53-DBD περιοχής σε διάλυμα, χωρίς να συνδέεται με το DNA ή σε σύμπλοκα με αλληλεπιδρώντα μόρια.

Η DBD είναι μία οριακά σταθερή περιοχή, που εξελικτικά έχει προκύψει για να επιτρέπει υψηλό βαθμό ευελιξίας μεταξύ των δύο καταστάσεων, της διπλωμένης και της μη διπλωμένης μορφής, παρέχοντας τη δομική βάση για τη διάκριση των ενδιάμεσων αποκρίσεων. Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις της p53 που εμφανίζονται στους καρκίνους, επηρεάζουν την DBD περιοχή και αφορούν σημειακές μεταλλάξεις αμινοξέων που είτε επικοινωνούν με το DNA είτε είναι σημαντικές για τη δομή της DBD, αποκαλύπτοντας τον κρίσιμο ρόλο της DBD στην ανάπτυξη των καρκίνων.

Ο σχηματισμός τετραμερούς της p53 μεσολαβείται από την περιοχή ολιγομερισμού στην καρβοξυτελική περιοχή (κατάλοιπα 325-356) (Εικ. 5). Από δομικές μελέτες φαίνεται ότι το τετραμερές είναι ένα διμερές δύο αρχικών διμερών [106]. Ο τετραμερισμός της πρωτεΐνης p53 απαιτείται για την πρόσδεση στο DNA και τη μεταγραφική δραστηριότητα με υψηλό βαθμό συγγένειας. Το μοντέλο που προτείνεται είναι ότι ένα διμερές DBD συνδέεται στη μισή περιοχή της θέσης πρόσδεσης στο DNA, ενώ ένα δεύτερο διμερές συνδέεται στο παρακείμενο μισό αυτής της θέσης. Επιπλέον, η περιοχή ολιγομερισμού ρυθμίζει την πρόσδεση με την Mdm2 λιγάση και την έξοδο της p53 από τον πυρήνα. Το άκρο της καρβοξυτελικής περιοχής (κατάλοιπα αμινοξέων 364-393) θεωρείται ως μία ρυθμιστική περιοχή και υπόκειται σε εκτενείς μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, ουμπικιτυλίωση, σουμουλίωση, νεδυλίωση και μεθυλίωση, οι οποίες ρυθμίζουν τη δράση και σταθερότητα της p53.

Το γονίδιο p53 κωδικοποιεί για ποικίλα p53 mRNA μέσω εναλλακτικού ματίσματος και του ενδιάμεσου υποκινητή στο εσώνιο 4. Το καρβοξυτελικό τμήμα μπορεί να κοπεί εναλλακτικά και να παράγει 3 ισομορφές, p53, p53-β και p53-γ, από τις οποίες οι δύο τελευταίες δεν έχουν την περιοχή ολιγομερισμού. Ο εναλλακτικός υποκινητής οδηγεί σε έκφραση μίας αμινοτελικά κομμένης πρωτεΐνης εκκινώντας από το κωδικόνιο 133 (del133p53) [107]. Με τη χρήση RT-PCR αναγνωρίστηκαν 8 νέα μετάγραφα p53 σε περιοχές του ανθρώπινου εγκεφάλου, ενώ οι περιοχές της καρδιάς και των νεφρών εκφράζουν μόνο την πλήρη αλληλουχία του p53 [108].

Homo_sapiens	1	---	HE	SPQ	SDPSVEP	PLSQETFS	DLW	KLL	FENNVLS	PSQ	ANDDL	HL	SP	
Mus_musculus	1	ME	SSQ	SDISLEL	PLSQETFS	SLW	KLL	LP	---	DI	PSPHC	HDDL	LP	
Gallus_gallus	1	---	MA	EEM	PLLEP	TEVF	HDL	SHL	RY	SMOOL	PE	EDHS	NWQEL	SP
Xenopus_laevic	1	---	ME	SSQ	SEKIGMD	PPLSQETFS	DLW	SLEP	DFL	QTV	TC	ELDNL	SEFP	DP
Danio_rerio	1	---	MA	QND	SOE	FAELW	EKN	---	LI	QF	GGG	SCWD	IND	
I														
Homo_sapiens	48	DB	IEQ	WT	IED	PGP	DEAF	RHF	EAA	PPV	AP	APAA	TR	AA
Mus_musculus	48	QD	VEE	FFE	---	GP	SEAL	KV	SGA	FAA	QDP	VI	ET	TP
Gallus_gallus	44	LE	PSD	PPP	---	---	FP	FP	FL	PL	AAA	AP	FL	H
Xenopus_laevic	47	---	---	---	---	---	LA	AD	H	TV	L	Q	E	G
Danio_rerio	24	EE	YLP	GS	---	---	DP	NI	F	EM	V	LE	EQ	P
II														
Homo_sapiens	98	F	S	K	I	V	Q	S	I	G	F	L	G	F
Mus_musculus	95	F	S	K	I	V	Q	N	I	G	F	L	G	F
Gallus_gallus	83	F	S	T	E	D	V	A	G	K	I	G	L	O
Xenopus_laevic	72	F	S	T	D	V	A	G	K	I	G	L	O	L
Danio_rerio	66	F	S	T	D	V	A	G	K	I	G	L	O	L
III														
Homo_sapiens	148	D	S	I	P	F	F	G	E	R	V	R	A	N
Mus_musculus	145	S	A	I	P	P	A	G	S	V	R	A	N	A
Gallus_gallus	133	O	V	A	P	P	O	S	S	L	R	A	V	A
Xenopus_laevic	122	E	S	P	P	P	G	S	I	L	R	A	T	A
Danio_rerio	116	D	V	A	P	P	O	G	S	V	R	A	T	A
IV														
Homo_sapiens	197	V	E	G	N	L	R	V	E	Y	L	D	D	R
Mus_musculus	194	V	E	G	N	L	R	V	E	Y	L	D	D	R
Gallus_gallus	183	V	E	O	N	F	Q	A	R	Y	M	D	D	E
Xenopus_laevic	172	V	E	O	N	F	Q	A	R	Y	M	D	D	E
Danio_rerio	165	V	E	G	N	O	R	A	N	Y	R	E	D	N
V														
Homo_sapiens	247	N	R	P	I	L	T	I	T	L	E	D	S	S
Mus_musculus	244	N	R	P	I	L	T	I	T	L	E	D	S	S
Gallus_gallus	233	N	R	P	I	L	T	I	T	L	E	G	F	G
Xenopus_laevic	222	N	R	P	I	L	T	I	T	L	E	T	F	Q
Danio_rerio	215	N	R	P	I	L	T	I	T	L	E	T	F	Q
VI														
Homo_sapiens	297	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Mus_musculus	294	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Gallus_gallus	279	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Xenopus_laevic	272	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
Danio_rerio	265	T	H	A	K	T	I	T	O	T	K	R	S	L
VII														
Homo_sapiens	329	E	M	F	R	E	L	M	E	A	L	E	L	K
Mus_musculus	326	E	M	F	R	E	L	M	E	A	L	E	L	K
Gallus_gallus	322	E	M	L	K	T	I	N	F	A	L	L	A	E
Xenopus_laevic	314	E	M	I	K	L	N	D	A	L	L	O	E	S
Danio_rerio	315	E	I	L	K	L	N	D	S	L	L	S	D	V
VIII														
Homo_sapiens	386	K	T	E	G	P	D	S	D	---	---	---	---	
Mus_musculus	382	K	V	G	P	D	S	D	---	---	---	---		
Gallus_gallus	364	K	G	S	D	---	---	---	---	---	---	---		
Xenopus_laevic	356	K	D	T	O	P	D	S	E	---	---	---		
Danio_rerio	365	K	D	E	O	R	S	D	S	D	---	---		

Εικόνα 6 Σύγκριση της p53 αλληλουχίας μεταξύ των ειδών

Συσχέτιση της ανθρώπινης p53 αλληλουχίας με άλλα είδη: *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis* and *Danio rerio*, με τη χρήση του προγράμματος ClustalX. Τα εξελικτικά συντηρημένα κατάλοιπα υπογραμμίζονται με μαύρο, τα αποκλίνοντα αμινοξέα που ανήκουν στην ίδια τάξη υπογραμμίζονται με γκρι και τα υψηλά συντηρημένα κουτιά I, II, III, IV, V, σημαίνονται με μπλε.

### 1.3.4 Μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53 – Σύνδρομο Li-Fraumeni

Το σύνδρομο Li-Fraumeni (Li-Fraumeni syndrome, LFS) είναι ένα σπάνια κληρονομούμενο σύνδρομο με υψηλή προδιάθεση για καρκίνο, που επηρεάζει άτομα πριν την ηλικία των 45 ετών και παρουσιάζει υψηλό βαθμό θνησιμότητας. Σε αντίθεση με άλλα κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα, χαρακτηρίζεται από μία ποικιλία διάφορων καρκίνων, με κυρίαρχο το σάρκωμα, τον καρκίνο του μαστού και τους εγκεφαλικούς όγκους, αν και έχουν αναφερθεί και άλλοι τύποι καρκίνων. Αναλύσεις σε οικογένειες με αυτό το σύνδρομο έχουν δείξει ότι το ~70% αυτών των οικογενειών εμφανίζουν μία μετάλλαξη του γονιδίου p53 στη γαμετική σειρά.

Επιπλέον, υπάρχει το σύνδρομο που μοιάζει με το LFS και λέγεται LFL (Li-Fraumeni-like syndrome), το οποίο παρουσιάζει ομοιότητες, όπως είναι οι μεταλλάξεις του γονιδίου p53 στη γαμετική σειρά, αλλά δεν έχει όλα τα χαρακτηριστικά του κλασικού LFS [43, 109, 110]. Σε κάποιες περιπτώσεις, δεν υπάρχουν τέτοιες μεταλλάξεις, αλλά εμφανίζεται μετάλλαξη στο Chk2 γονίδιο [111, 112]. Από πληροφορίες σε βάσεις δεδομένων προκύπτει ότι ~46% των μεταλλάξεων εντοπίζονται στα κωδικόνια 175, 213, 245, 248, 273 και 282 στην DBD περιοχή της p53 και αντιστοιχούν σε «hotspot» μεταλλάξεις (περιοχές όπου οι μεταλλάξεις συμβαίνουν 100 φορές πιο συχνά σε σύγκριση με τον κανονικό ρυθμό μεταλλάξεων) σε διάφορους σποραδικούς καρκίνους. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες μελέτες αναλύουν τις μεταλλάξεις που αφορούν στα εξώνια 5-8, οπότε προκαταλαμβάνουν την ανίχνευση των μεταλλάξεων στην DBD περιοχή της p53. Σίγουρα υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ του τύπου της μετάλλαξης και του τύπου του όγκου. Ωστόσο, οι μεταλλάξεις της DBD περιοχής δίνουν περισσότερους καρκίνους και μάλιστα στις πιο νεαρές ηλικίες. Επομένως, υπάρχει μία λειτουργική σημασία του τύπου της μετάλλαξης ως προς την ανάπτυξη του όγκου στους ανθρώπους [113].

### 1.4 Ρύθμιση της πρωτεΐνης p53

Υπό την επίδραση κυτταρικού στρες, η πρωτεΐνη p53 συσσωρεύεται ραγδαία και επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων. Στα φυσιολογικά κύτταρα, έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής (περίπου 20 λεπτά) και κατά κύριο λόγο ρυθμίζεται σε επίπεδο πρωτεϊνικής σταθερότητας, που παρέχει τα μέσα για τη ραγδαία επαγωγή p53 όταν υπάρχει ανάγκη. Σε συνθήκες φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου, η p53 βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, λόγω ουμπικιτυλίωσης και αποδόμησης από το πρωτεόσωμα. Έχουν βρεθεί τουλάχιστον πέντε βασικές κυτταρικές λιγάσες για την αποδόμηση της p53, με σημαντικότερη ίσως και καλύτερα μελετημένη την Mdm2. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι εκτός από τον

κεντρικό ρόλο της Mdm2 στην πρωτεοσωμική στόχευση της p53, υπάρχουν επιπλέον E3 ένζυμα, που θα συζητηθούν παρακάτω.

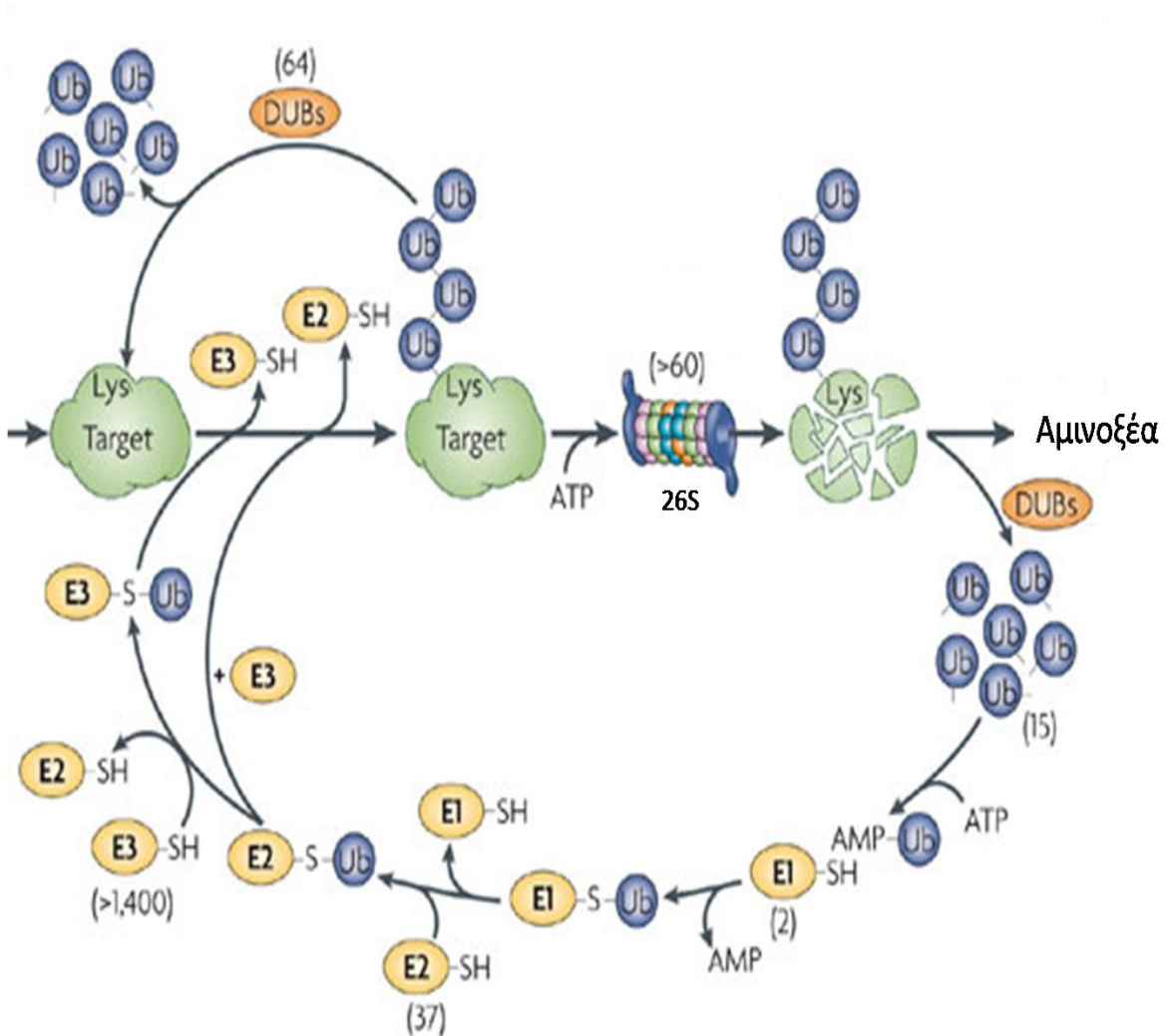
#### 1.4.1 Ουμπικιτυλίωση

Η ουμπικιτίνη είναι ένα υψηλά συντηρημένο πολυπεπτίδιο 76 αμινοξέων, που κωδικοποιείται σε πολλά γονίδια. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν ολιγομερή ουμπικιτίνης, που δημιουργούν ενεργά μονομερή στα κύτταρα. Οι ουμπικιτίνες στη συνέχεια συνδέονται ομοιοπολικά με λυσίνες των πρωτεϊνών-στόχων σε έναν καταρράκτη αντιδράσεων, που χαρακτηρίζεται ως ουμπικιτυλίωση (Εικ. 7).

Περίληπτικά, η ουμπικιτυλίωση είναι μία ακολουθία αντιδράσεων που μεσολαβούνται από τρία βασικά ένζυμα, το E1 – ένζυμο ενεργοποίησης της ουμπικιτίνης (ubiquitin activating enzyme), E2 – ένζυμο σύνδεσης της ουμπικιτίνης (ubiquitin conjugating enzyme) και το E3 – λιγάση ουμπικιτίνης (ubiquitin protein ligase), υπεύθυνο για την αναγνώριση του ειδικού υποστρώματος. Αρχικά, το E1 δημιουργεί ένα θειο-εστερικό δεσμό μεταξύ της ενεργούς κυστεΐνης και της καρβοξυτελικής γλυκίνης της ουμπικιτίνης, μία ATP-εξαρτώμενη διαδικασία. Έπειτα, η ενεργός ουμπικιτίνη μεταφέρεται από το E1 σε μία συντηρημένη κυστεΐνη του E2, μία trans-θειολική αντίδραση. Στη συνέχεια, το E3 ένζυμο αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο E2-ενεργός ουμπικιτίνη και το υπόστρωμα, σχηματίζοντας μία ισοπεπτιδική σύνδεση μεταξύ της καρβοξυτελικής γλυκίνης πάνω στην ουμπικιτίνη και της ε-αμινομάδας μίας εσωτερικής λυσίνης του υποστρώματος. Οι αλυσίδες πολυάριθμων μορίων ουμπικιτίνης σχηματίζονται με σύνδεση της νέας ουμπικιτίνης στη λυσίνη της ουμπικιτίνης που ήδη συνδέεται με το υπόστρωμα [114]. Σε κάποιες περιπτώσεις, η ουμπικιτίνη μπορεί να συνδεθεί στην ελεύθερη α-αμινομάδα του υποστρώματος [115, 116].

#### E1

Μέχρι σήμερα, θεωρείται ότι υπάρχει μόνο ένα E1 ένζυμο, με δύο ισομορφές E1a και E1b, αποτέλεσμα εναλλακτικής έναρξης μετάφρασης [117]. Η αντίδραση ενεργοποίησης της ουμπικιτίνης συνήθως περιλαμβάνει δύο βήματα: τον ATP-εξαρτώμενο σχηματισμό του αδενυλιωμένου ενδιάμεσου ουμπικιτίνης, που ακολουθείται από το σχηματισμό θειο-εστέρα μεταξύ E1 και ουμπικιτίνης.



### Εικόνα 7 Σύστημα πρωτεόλυσης μέσω ουμπικιτίνης από το 26S πρωτεόσωμα

Αρχικά, το E1 ενεργοποιεί την ουμπικιτίνη (ubiquitin, Ub), σχηματίζοντας ένα θειο-εστερικό δεσμό υψηλής ενέργειας μεταξύ της κυστεΐνης του E1 και της COOH-τελικής γλυκίνης της ουμπικιτίνης. Η ενεργοποιημένη Ub μεταφέρεται σε μία κυστεΐνη του E2 μέσω trans-εστεροποίησης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το ενδιάμεσο Ub-E2 εξυπηρετεί ως δότης Ub, με τη χρήση ενός E3 για να αναγνωρίσει το στόχο (target) και να καταλύσει τη μεταφορά της Ub. Το τελικό προϊόν είναι ένα σύμπλοκο Ub στο οποίο η καρβοξυλομάδα της γλυκίνης στο COOH-τελικό τμήμα της Ub συνδέεται με ισοπεπτιδικό δεσμό με μία αμινομάδα (Lys ε-amino) του στόχου. Οι αλυσίδες Ub μπορούν να αποδιαταχθούν μέσω των ενζύμων DUBs (DeUbiquitinating enzymes) και να απελευθερώσουν την πρωτεΐνη-στόχο και τα μόρια Ub στο εσωτερικό του κυττάρου. Εναλλακτικά, η πρωτεΐνη διασπάται από το 26S, με παράλληλη απελευθέρωση των προσδεμένων μορίων Ub.



## E2

Υπάρχουν περίπου 13 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που μοιάζουν με E2 (E2-like proteins) στη ζύμη και για περισσότερα από 30 E2 ένζυμα στο γονιδίωμα των θηλαστικών, αν και δεν μπορούν όλα να δεσμεύσουν ουμπικιτίνη, όπως το Ubc9 που δεσμεύει μία πρωτεΐνη που μοιάζει με ουμπικιτίνη, τη SUMO. Όλα τα E2 έχουν μία χαρακτηριστική περιοχή ~150 αμινοξέων, τη UBC, η οποία περιέχει κυστεΐνη που δέχεται την ουμπικιτίνη από το E1 και είναι συντηρημένη κατά ~35% μεταξύ των μελών της οικογένειας. Επιπρόσθετα, πολλά E2 έχουν αμινοτελικές και καρβοξυτελικές προεκτάσεις, που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις με τα E3, λειτουργώντας ως μεμβρανικές άγκυρες στην αλληλεπίδραση των E3 με τα υποστρώματα [118].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η θέση του ενζύμου E2 για τη σύνδεση με την ουμπικιτίνη δεν υπερκαλύπτεται από τη θέση για τη σύνδεση με το E3 [119, 120], ενώ οι θέσεις σύνδεσης των ενζύμων E1 και E3 υπερκαλύπτονται. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να συμβούν πολλαπλοί κύκλοι E2-E3 σύνδεσης, προκειμένου να σχηματισθούν οι αλυσίδες πολλαπλών μορίων Ub.

Επιπλέον, υπάρχουν πολλά περισσότερα E3 ένζυμα παρά E2, αλλά η δομική ομοιότητα μεταξύ διαφορετικών E2 αυξάνει το εύρος των λειτουργιών τους. Πράγματι, τα E2 ένζυμα UbcH5 και UbcH7 μπορούν να λειτουργήσουν και με E3 ένζυμα που διαθέτουν HECT περιοχή και με E3 ένζυμα που διαθέτουν RING περιοχή. Για παράδειγμα, το συντηρημένο κατάλοιπο Phe63 του E2 ενζύμου UbcH7 συνδέεται με τη HECT περιοχή του E6-AP, αλλά και με τη RING περιοχή του c-Cbl και φαίνεται ότι βρίσκεται και σε άλλα E2, δεικνύοντας τη σημασία του στην πρόσδεση μεταξύ E2 και E3 [121].

*In vitro* μελέτες δείχνουν ότι τα E3 ένζυμα μπορούν να λειτουργήσουν με πολλά E2. Σε μία αναζήτηση E2 ενζύμων ειδικών για τη λιγάση Mdm2 βρέθηκε ότι τα UbcH5A, -B, -C και E2-25K συμμετέχουν στην ουμπικιτυλίωση της πρωτεΐνης p53 που μεσολαβείται από την Mdm2 *in vitro* [122]. Μία άλλη μελέτη δείχνει ότι η λιγάση Topors λειτουργεί με τα E2 UbcH5a, UbcH5c και UbcH6, αλλά όχι με τα UbcH7, CDC34 ή UbcH2b [123]. Η p53 υπόκειται σε K63-ουμπικιτυλίωση που μεσολαβείται από το E2 ένζυμο Ubc13, το οποίο αυξάνει τη σταθερότητα της p53 και την εμφάνισή της στο κυτταρόπλασμα [124]. Είναι πιθανό, λοιπόν, το βήμα που περιλαμβάνει το E2 ένζυμο κατά την ουμπικιτυλίωση να παρέχει ένα πρόσθετο σημείο για εξειδίκευση και διαφοροποίηση του σήματος ουμπικιτυλίωσης.

### E3

Τα ένζυμα λιγάσης ουμπικιτίνης κατά κύριο λόγο αποφασίζουν για το υπόστρωμα. Έχουν βρεθεί περισσότερες από 200 διαφορετικές λιγάσες ήδη χαρακτηρισμένες και πολλές εκατοντάδες που προβλέπονται με τεχνικές βιοπληροφορικής. Διακρίνονται τρεις μεγάλες οικογένειες E3 ενζύμων με βάση την ύπαρξη της λειτουργικής περιοχής: οι ομόλογες πρωτεΐνες HECT (Homologous to E6-AP Carboxy-Terminus), RING (Really Interesting New Gene) και U-box (UFD2). Η οικογένεια της RING περιοχής περιλαμβάνει και την υπο-οικογένεια PHD (Plant HomeoDomain). Κάθε μία από τις λειτουργικές περιοχές αλληλεπιδρά άμεσα με το αντίστοιχο E2.

- **HECT**

Αυτή η οικογένεια ορίζεται από την παρουσία της περιοχής HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl-Terminus) (HECT-domain proteins) και καθιερώθηκε από την πρώτη λιγάση που ανακαλύφθηκε στα θηλαστικά, την E6-AP (E6-Associated Protein). Μετά από πρόσδεση στην E6 πρωτεΐνη του ιού HPV (human papillomavirus), η λιγάση E6-AP ουμπικιτυλιώνει και αποδομεί την p53 [125]. Χαρακτηριστικό στοιχείο των μελών της οικογένειας HECT είναι μία υψηλά συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή ~350 αμινοξέων. Η αμινοτελική περιοχή συμμετέχει στην αναγνώριση του υποστρώματος. Η HECT περιοχή προσδένει το ενδιάμεσο E2-ουμπικιτίνης και δέχεται την ουμπικιτίνη σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο κυστεΐνης που βρίσκεται συνήθως ~35 κατάλοιπα αμινοξέων άνωθεν της καρβοξυτελικής περιοχής του E3. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό αυτής της οικογένειας είναι ο σχηματισμός του ενδιάμεσου E3-ουμπικιτίνης, τη στιγμή που οι άλλες λιγάσες E3 μεταφέρουν την ουμπικιτίνη απευθείας στο υπόστρωμα. Άλλα μέλη της οικογένειας περιλαμβάνουν το HUWE1/ARF-BP1/Mule που ουμπικιτυλιώνει διάφορα υποστρώματα, όπως την p53, τη Mcl-1 και τη c-Myc.

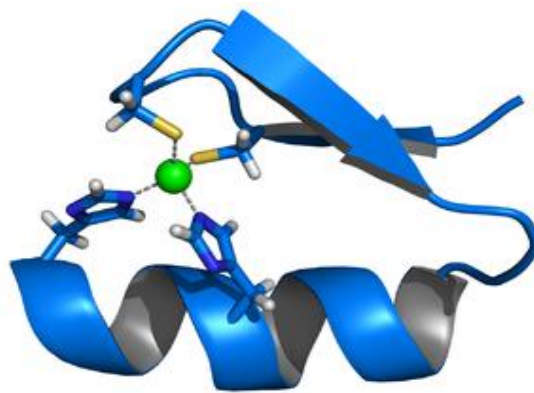


#### Εικόνα 8 Δομή της πρωτεΐνης E6-AP

Φαίνεται η χαρακτηριστική HECT περιοχή με πράσινο χρώμα στο COOH-τελικό τμήμα της πρωτεΐνης E6-AP.

- **RING**

Η μεγαλύτερη οικογένεια των E3 ενζύμων διακρίνεται από την παρουσία της περιοχής RING (Really Interesting New Gene) (RING-finger proteins) με ένα εύρος 40-100 αμινοξέων. Αυτή η περιοχή αποτελείται από οχτώ συντηρημένες κυστεΐνες και ιστιδίνες, με γενικό μοτίβο [CX<sub>2</sub>CX(9-39)CX(1-3)HX(2-3)C/HX<sub>2</sub>CX(4-48)CX<sub>2</sub>C], που συντονίζουν δύο ιόντα ψευδαργύρου σε ένα διασταυρούμενο σχηματισμό (Εικ. 9). Η RING περιοχή συνδέεται άμεσα με το E2 ένζυμο και είναι ουσιώδης για τη δραστηριότητα λιγάσης ουμπικιτίνης [119], καθώς προσαρμόζει τη λυσίνη του υποστρώματος κοντά στο ενδιάμεσο E2-ουμπικιτίνης [126].

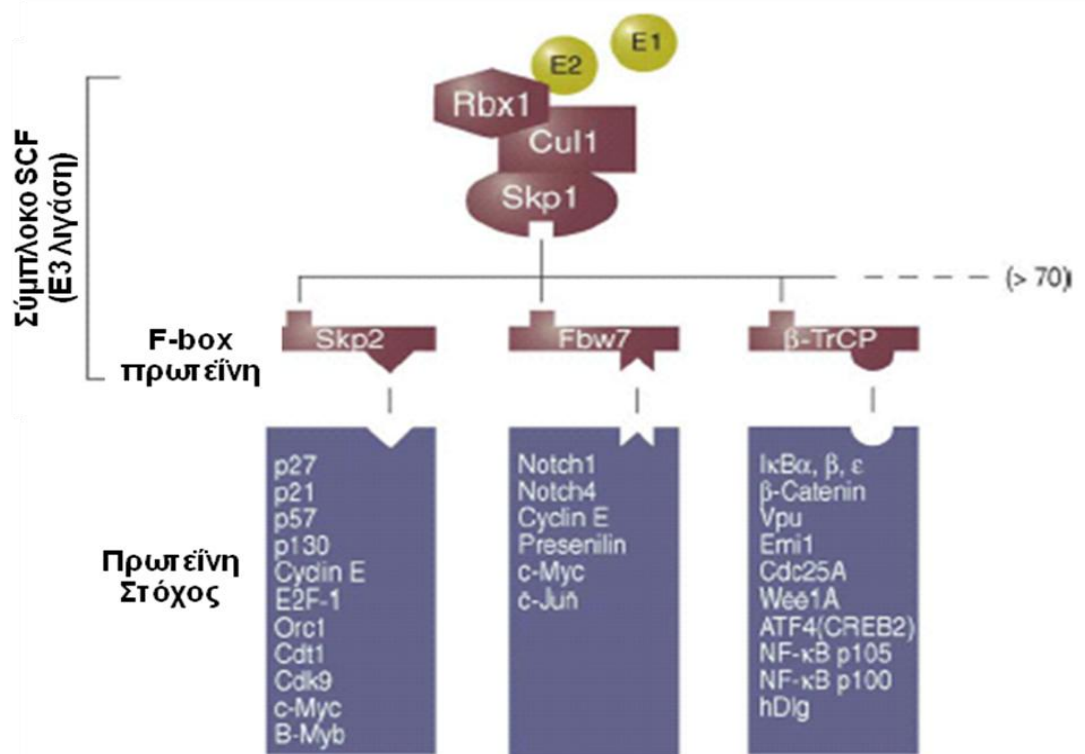


**Εικόνα 9 Παράδειγμα ενός μοτίβου Cys2His2 με δακτύλιο ψευδαργύρου**

Αποτελείται από μια α-έλικα και ένα αντιπαράλληλο β-φύλλο. Το ιόν ψευδαργύρου (πράσινο χρώμα) συντονίζεται από δύο κατάλοιπα ιστιδίνης και δύο κατάλοιπα κυστεΐνης.

Οι λιγάσες με περιοχή RING μπορούν να αποτελούνται από μονές ή πολλαπλές υπομονάδες. Η Mdm2 είναι μία λιγάση μονής υπομονάδας, που περιέχει την αμινοτελική περιοχή για τη σύνδεση με την p53 και τη RING περιοχή στο καρβοξυτελικό της άκρο. Σε συνεργασία με τα ένζυμα E1 και E2, η Mdm2 επαρκεί για να ουμπικιτυλιώσει την p53 *in vitro*. Λιγάσες με πολλές υπομονάδες συνήθως περιέχουν την υπομονάδα της RING περιοχής, ένα μέλος της οικογένειας των κουλινών (cullin) και ένα δομικό προσαρμογέα που περιέχει την F-box περιοχή (F-box containing structural adaptor) [127]. Η υπομονάδα της RING περιοχής παρέχει ενεργότητα λιγάσης, οι κουλίνες παίζουν το ρόλο της «σκαλωσιάς» και οι πρωτεΐνες F-box συνδέουν την κουλίνη στο υπόστρωμα. Για παράδειγμα, το σύμπλοκο SCF (Skp1-Cul1-F-box) αποτελείται από μία πρωτεΐνη με RING περιοχή (RING finger protein 1, Rbx1) που διαθέτει την ενεργότητα λιγάσης, την κουλίνη Cul1, την υπομονάδα Skp1 (S-phase Kinase associated Protein 1A) και την F-box πρωτεΐνη (Εικ. 10). Οι γνωστές SCF λιγάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μετάβασης G1/S του κυτταρικού

κύκλου. Οι υπομονάδες του συμπλόκου βρίσκονται σε τέτοια δομική οργάνωση, ώστε να θέτουν τον πυρήνα της λιγάσης στη διάθεση πολλών υποστρωμάτων. Στα υποστρώματα των λιγασών SCF συμπεριλαμβάνονται ογκογονίδια, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην εξέλιξη, αλλά και στην παύση του κυτταρικού κύκλου, στη μεταγωγή σήματος και στη μεταγραφή.



### Εικόνα 10 Σύμπλοκο SCF

Αποτελείται από την πρωτεΐνη που περιέχει τη RING περιοχή (Rbx1), την κουλίνη (Cul1), την υπομονάδα Skp1 και την F-box πρωτεΐνη (Skp2, Fbw7 ή β-TrCP) που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του κατάλληλου υποστρώματος.

Μία μικρή υπο-οικογένεια των RING λιγασών ορίζεται από την παρουσία μίας PHD περιοχής. Δομικές μελέτες δείχνουν ότι η PHD περιοχή μοιάζει με τη RING περιοχή στο συντονισμό των ιόντων ψευδαργύρου σε διασταυρούμενη διαμόρφωση. Συνήθως περιέχει μία κυστεΐνη παρά μία ιστιδίνη στην τέταρτη θέση και μία συγκεκριμένη τρυπτοφάνη πριν το έβδομο κατάλοιπο της σύνδεσης με τον ψευδάργυρο. Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει τις ιικές πρωτεΐνες MIR (Modulator of Immune Recognition), που αποδομούν τα ανοσοαντιγόνα MHC-τάξης I [128].

- **U-box**

Μία διαφορετική οικογένεια πρωτεϊνών περιέχουν την περιοχή U-box. Για πρώτη φορά, η U-box περιοχή ανακαλύφθηκε στη λιγάση Ufd2 της ζύμης, η οποία δεν έχει δικό της υπόστρωμα. Αντίθετα, προωθεί την πολυ-ουμπικιτυλίωση του υποστρώματος μίας άλλης

λιγάσης, γεγονός που οδήγησε στην ταξιμόμησή της ως «E4» ένζυμο [129]. Η περιοχή U-box παρουσιάζει δομική ομοιότητα με τη RING περιοχή, με τη διαφορά ότι δε σταθεροποιείται με τους δακτυλίους ψευδαργύρου που συντονίζονται από ιστιδίνες και κυστεΐνες, αλλά από ένα σύστημα με γέφυρες άλατος και δεσμούς υδρογόνου. Σε αυτό το δίκτυο δεσμών συμμετέχουν φορτισμένα και πολικά κατάλοιπα, τα οποία είναι πολύ πιο συντηρημένα στις U-box πρωτεΐνες παρά στις RING πρωτεΐνες, ενισχύοντας το ρόλο τους στη διατήρηση της σταθερότητας της περιοχής U-box. Όλες οι U-box πρωτεΐνες των θηλαστικών έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν με τις μοριακές συνοδές πρωτεΐνες, Hsp90, Hsp70, DnaJc7, EKN1, CRN, και VCP. Επομένως, η λειτουργία αυτής της ομάδας πρωτεϊνών έγκειται στην αποδόμηση των μη σωστά διπλωμένων πρωτεϊνών, σε συνεργασία με τις συνοδές πρωτεΐνες, οι οποίες αναγνωρίζουν αρχικά και προσδένονται στις μη φυσιολογικές πρωτεΐνες.

Μία από τις πιο σημαντικές U-box λιγάσες είναι η CHIP (Carboxyl-Terminus of Hsp70-Interacting Protein) ή το ανθρώπινο ομόλογο STUB1 (STIP1 homology and U-box containing protein 1), η οποία κατέχει και ενεργότητα παρόμοια με αυτή των E4 ενζύμων [130, 131]. Η CHIP προσδέεται και αναστέλλει την ενεργότητα ATPάσης των Hsc70/Hsp70 και μπλοκάρει την αντίδραση πρόσδεσης του υποστρώματος σε αυτές. Η CHIP έχει ενεργότητα E3 λιγάσης και ουμπικιτυλιώνει αρκετά υποστρώματα, τα περισσότερα εκ των οποίων είναι μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις συνοδές πρωτεΐνες Hsp70 και/ή Hsp90 [132]. Μπορεί, επίσης, να δράσει με τη λιγάση Parkin, που ανήκει στην οικογένεια των RING ενζύμων και προάγει την ουμπικιτυλίωση της πρωτεΐνης Pael-R που μεσολαβείται από την Parkin [133].

### **Αλυσίδες Ουμπικιτυλίωσης**

Οι λυσίνες των υποστρωμάτων μπορούν να μονο- ή πολυ-ουμπικιτυλιωθούν. Μία σύνδεση μίας μονής ουμπικιτίνης μπορεί να συμβεί ακόμα και σε αρκετές λυσίνες και ορίζεται ως πολλαπλή ουμπικιτυλίωση. Ο καλύτερα μελετημένος ρόλος της μονο-ουμπικιτυλίωσης είναι η ρύθμιση της ενδοκύτωσης και της επιδιόρθωσης του DNA και έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό, τη διαμόρφωση, την ενεργότητα και τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις των υποστρωμάτων [134-136]. Οι αλυσίδες πολυ-ουμπικιτίνης σχηματίζονται με σύνδεση της καρβοξυλικής ομάδας G76 της επόμενης ουμπικιτίνης στην ε-αμινομάδα μίας λυσίνης εντός της προηγούμενης ουμπικιτίνης.

Η ουμπικιτίνη έχει επτά κατάλοιπα λυσίνης, K6, K11, K27, K29, K33, K48 και K63, τα οποία εξυπηρετούν τις συνδέσεις της ουμπικιτίνης [137]. Οι καλύτερα χαρακτηρισμένες

αλυσίδες πολυ-ουμπικιτίνης είναι εκείνες που συνδέονται μέσω των K48 και K63. Οι K48 αλυσίδες με 4 μόρια ουμπικιτίνης ή περισσότερα οδηγούν το υπόστρωμα προς τα πρωτεοσώματα για αποδόμηση [138], αν και μπορούν να έχουν και λειτουργίες ανεξάρτητες από την πρωτεόλυση. Για παράδειγμα, η K48-ουμπικιτυλίωση της πρωτεΐνης p53 από τη λιγάση E4F1 φαίνεται να τροποποιεί τη μεταγραφική δραστηριότητα της p53, χωρίς να επηρεάζει την πρωτεόλυση της p53 [79]. Η K63-ουμπικιτυλίωση απαιτεί τη δράση ξεχωριστών E2 ενζύμων, δεν επάγει αποδόμηση, αλλά οδηγεί σε διαφορετικές βιολογικές διαδικασίες. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη IKK ενεργοποιείται μέσω K63-ουμπικιτυλίωσης, που μεσολαβείται από την TRAF6 [139].

Αντίθετα, είναι πολύ λίγα γνωστά για το ρόλο των συνδέσεων της ουμπικιτίνης μέσω των K6, K11 και K29. Αλυσίδες οι οποίες καταλύουν το σχηματισμό K6 και K11 έχουν βρεθεί να προσδένονται στην πρωτεοσωμική υπομονάδα S5a, παρόλο που δεν είναι βέβαιο εάν μπορούν να προωθήσουν την αποδόμηση του υποστρώματος. Η K6-ουμπικιτυλίωση του BRCA1 σταθεροποιεί το BRCA1 και το οδηγεί κατευθείαν στη θέση για την επιδιόρθωση του DNA [140]. Η βιολογική σημασία άλλων αλυσίδων ουμπικιτίνης πρέπει να διερευνηθεί. Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την επιλογή της λυσίνης πάνω στην ουμπικιτίνη κατά τη διάρκεια της ουμπικιτυλίωσης είναι σχεδόν άγνωστοι. Είναι ξεκάθαρο ότι το ίδιο ένζυμο E3 μπορεί να συνδέσει K48 και K63 αλυσίδες. Η εξειδίκευση θα μπορούσε να καθοριστεί από το E2, καθώς διαφορετικά E2 ένζυμα εμπλέκονται στο σχηματισμό της K63 αλυσίδας. Πιθανά και τα αλληλεπιδρώντα μόρια των λιγασών μπορούν να ορίσουν ποια αλυσίδα θα σχηματιστεί. Από την άλλη, το ίδιο υπόστρωμα μπορεί να τροποποιηθεί από διαφορετικούς τύπους ουμπικιτυλίωσης, οδηγώντας σε ποικίλες βιολογικές ενέργειες. Για παράδειγμα, η K48-πολυ-ουμπικιτυλίωση στην καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης p53 οδηγεί σε πρωτεοσωμική αποδόμηση, ενώ η K63-ουμπικιτυλίωση στη λυσίνη K320 διαφοροποιεί τη μεταγραφική ενεργότητα της p53 και την οδηγεί στα γονίδια-στόχους που αφορούν την παύση του κυτταρικού κύκλου [79].

## **DUBs**

Η ουμπικιτυλίωση μπορεί να αντιστραφεί με τη δράση των ενζύμων απο-ουμπικιτυλίωσης (deubiquitinating enzymes, DUBs), τα οποία είναι υδρολάσες κυστεΐνης: καρβοξυτελικές υδρολάσες ουμπικιτίνης (ubiquitin C-terminal hydrolases, UCHs) και πρωτεάσες ειδικές για ουμπικιτίνη (ubiquitin-specific processing proteases, USPs) [141]. Γενικά, οι UCHs είναι ικανές να αποκόψουν τα πρόδρομα της ουμπικιτίνης για να φτιάξουν την ενεργή ουμπικιτίνη.

Οι USPs είναι μία μεγάλη ομάδα ενζύμων που μπορούν να σπάσουν και να αποδιατάξουν τις αλυσίδες ουμπικιτίνης.

Τα DUBs συμμετέχουν σε αρκετές βιολογικές διαδικασίες, όπως στη δημιουργία ουμπικιτίνης, στην ανακύκλωση της ουμπικιτίνης και στην επεξεργασία των αλυσίδων πολυουμπικιτίνης, συμβάλλοντας στην αποδόμηση μέσω του πρωτεοσώματος. Πολλά ένζυμα DUBs σχετίζονται με το 26S πρωτεόσωμα και ρυθμίζουν τη λειτουργία του. Για παράδειγμα, το UCH37 είναι μία υπομονάδα του 19S πρωτεοσώματος και εμπλέκεται στην «επεξεργασία» των ουμπικιτυλιωμένων υποστρωμάτων σύμφωνα με το μήκος των πολυουμπικιτυλιωμένων αλυσίδων [142]. Επιπλέον, η υπομονάδα Rpn11 του πρωτεοσώματος εκπροσωπεί ένα ένζυμο DUB και ο ρόλος της έγκειται στην απελευθέρωση της πολυουμπικιτυλιωμένης αλυσίδας, επιτρέποντας την πλήρη μετατόπιση της πρωτεΐνης-υπόστρωμα προς τον πρωτεολυτικό πυρήνα του πρωτεοσώματος [143]. Επιπρόσθετα, μερικά DUBs έχουν βρεθεί ότι είναι ικανά για την εξειδίκευση του υποστρώματος. Το HAUSP παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p53, καθώς αποουμπικιτυλιώνει και την p53 και την Mdm2 [144]. Το CYLD αποουμπικιτυλιώνει την πρωτεΐνη TRAF2, μειώνοντας την NFκB σηματοδότηση [145, 146].

### **Μόρια που μοιάζουν με ουμπικιτίνη**

Από τότε που ανακαλύφθηκε η ουμπικιτίνη, μία ολόκληρη οικογένεια μορίων που μοιάζουν με ουμπικιτίνη έχει βρεθεί και μετράει περισσότερα από 10 μέλη, μεταξύ των οποίων το Nedd8, το SUMO, το ISG15 και το Atg8 [147, 148]. Παρόλο που δεν έχουν υψηλό βαθμό ομοιότητας ως προς την αλληλουχία τους, αυτά τα μόρια είναι δομικά όμοια με την ουμπικιτίνη. Συνδέονται στη λυσίνη του υποστρώματος σε μία αντίδραση που μοιάζει με την ουμπικιτυλίωση, με τη συμμετοχή διαφορετικών E1 και E2 ενζύμων. Τα καλύτερα χαρακτηρισμένα μόρια αυτής της κατηγορίας, το SUMO και το Nedd8, είναι τα πιο κοντινά στην ουμπικιτίνη με ομολογία ως προς την αλληλουχία κατά 20 και 60% αντίστοιχα. Υπάρχουν αρκετές λιγάσες ειδικές για SUMO, όπως η οικογένεια των PIAS και η TOPORS. Αξιοσημείωτο είναι ότι μερικές λιγάσες, όπως η Mdm2, μπορούν να λειτουργήσουν και ως NEDD8 E3 ένζυμα [149].

Η δράση των μορίων που μοιάζουν με ουμπικιτίνη οδηγεί σε διάφορα φυσιολογικά συμβάντα. Η σουμυλίωση (SUMOylation) εμπλέκεται στον υποκυτταρικό εντοπισμό, στην επιδιόρθωση του DNA, στον ανασχηματισμό της χρωματίνης και στη ρύθμιση της μεταγραφής. Η νεδυλίωση (Neddylation) συχνά στοχεύει λιγάσες ουμπικιτίνης, όπως οι κουλίνες, επάγοντας τη λειτουργία τους [150, 151], ενώ μπορεί να αναστείλει και τη

μεταγραφική ενεργότητα της πρωτεΐνης-στόχου, όπως έχει δειχθεί για την p53 [149]. Τέλος, η ισγυλίωση (Isgylation) παίζει κάποιο ρόλο στην ανοσοαπόκριση [152]. Η λειτουργία των άλλων μορίων της κατηγορίας παραμένει άγνωστη.

#### 1.4.2 Πρωτεόσωμα

Ο θεμελιώδης ρόλος των αλυσίδων ουμπικιτίνης είναι η στόχευση των υποστρωμάτων προς το πρωτεόσωμα για αποδόμηση [153, 154]. Αλυσίδες των τεσσάρων ή περισσότερων μορίων ουμπικιτίνης που συνδέονται στις λυσίνες K48 αποτελούν το σήμα για την πρωτεοσωμική αναγνώριση [138]. Το πρωτεόσωμα είναι μία ενδοκυτταρική πρωτεάση τύπου θρεονίνης και αποτελεί ~1% των κυτταρικών πρωτεϊνών. Τα πρωτεοσώματα είναι άφθονα στα κύτταρα και αποδομούν πρωτεΐνες στο κυταρόπλασμα, στον πυρήνα ή στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στο σύστημα του πρωτεοσώματος, συμπεριλαμβάνονται δύο ειδών πρωτεολυτικοί μηχανισμοί, ο ATP-εξαρτώμενος, που πραγματοποιείται από το 26S πρωτεόσωμα και ο ATP-ανεξάρτητος, που πραγματοποιείται από το 20S πρωτεόσωμα. Εμπλέκεται στην αποδόμηση τόσο των μη φυσιολογικών, οξειδωμένων και αποδιαταγμένων, όσο και των πλήρως λειτουργικών πρωτεϊνών, οι οποίες πρέπει να αποδομηθούν προκειμένου να διατηρηθεί η φυσιολογική κυτταρική λειτουργία. Με αυτόν τον τρόπο, το πρωτεόσωμα συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και της μεταγραφής, ο πρωτεϊνικός καταβολισμός και η αντιγονοπαρουσίαση.

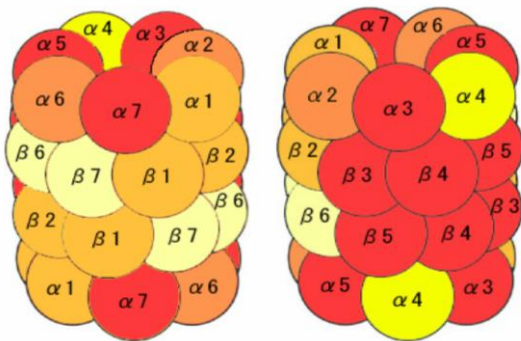
#### 20S

Το 20S πρωτεόσωμα είναι ένα πολύ καλά οργανωμένο σύμπλοκο, μοριακού βάρους ~750 KDa, διαμέτρου ~12 nm και μήκους ~17 nm, αποτελούμενο από διάφορες πρωτεϊνικές υπομονάδες, μεγέθους 20-35 KDa. Το σύμπλοκο έχει τη μορφή «βαρελιού» [155] και οι υπομονάδες του διατάσσονται με τέτοιο τρόπο, ώστε να δημιουργούν 4 πρωτεϊνικούς δακτυλίους, 2 εξωτερικούς που περιέχουν μόνο α-υπομονάδες και δύο εσωτερικούς που αποτελούνται μόνο από β-υπομονάδες. Οι υπομονάδες των ευκαρυωτικών οργανισμών ομαδοποιούνται περαιτέρω σε 7 υπο-οικογένειες. Συνολικά, κάθε 20S σύμπλοκο δημιουργείται από 14 α- και 14 β- υπομονάδες, με 7 υπομονάδες ανά δακτύλιο, σε διάταξη α<sub>7</sub>β<sub>7</sub>β<sub>7</sub>α<sub>7</sub> (Εικ. 11).

Οι πρωτεοσωμικές υπομονάδες αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών που δεν έχει εμφανείς ομοιότητες με άλλες οικογένειες πρωτεϊνών. Σχεδόν σε όλες τις α- και β- υπομονάδες, υπάρχουν αρκετά κατάλοιπα γλυκίνης και ένα GxxxD μοτίβο, ενώ είναι πολύ πιθανό να προήλθαν από έναν κοινό αρχικό πρόγονο. Στα αρχαιοβακτήρια, υπάρχουν μόνο 2



διαφορετικές υπομονάδες, η  $\alpha$  και η  $\beta$  [156], στη ζύμη 14 (7  $\alpha$  και 7  $\beta$ ) [157], ενώ στα κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών υπάρχουν περισσότερες από 14 διαφορετικές υπομονάδες, καθώς και 3 ( $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{2i}$  και  $\beta_{5i}$ ) οι οποίες εκφράζονται στο ανοσοπρωτεόσωμα. Στα ανώτερα ευκαρυωτικά, η έκφρασή τους διαφοροποιείται ανάμεσα στους ιστούς και τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του ίδιου οργανισμού. Να σημειωθεί, επίσης, ότι ομόλογες υπομονάδες που ανήκουν στην ίδια υπο-οικογένεια, όπως οι LMP πρωτεΐνες και οι ομόλογες αυτών,  $\beta_{1i}$  και  $\beta_{5i}$ , δεν είναι παρούσες ταυτόχρονα στο ίδιο σύμπλοκο.



**Εικόνα 11 Δομή του 20S πρωτεοσώματος**

Το 20S πρωτεόσωμα έχει τη μορφή βαρελιού και αποτελείται από 7 διαφορετικές  $\alpha$ -ρυθμιστικές και 7 διαφορετικές  $\beta$ -καταλυτικές υπομονάδες σε διάταξη  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ .

Οι  $\alpha$ -υπομονάδες είναι πιο συντηρημένες από τις  $\beta$ . Στο  $\text{NH}_2$ -τελικό τους άκρο υπάρχει υψηλά συντηρημένη αλληλουχία, που δεν απαντάται στις  $\beta$ -υπομονάδες. Πολλές από τις  $\alpha$ -υπομονάδες περιέχουν σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS). Οι  $\beta$ -υπομονάδες που αποτελούν τα καταλυτικά κέντρα του πρωτεοσώματος, παρουσιάζουν υψηλότερο βαθμό ετερογένειας σε σύγκριση με τις  $\alpha$ -υπομονάδες. Συγκεκριμένα, η  $\beta_1$  αποτελεί το ενεργό κέντρο ενεργότητας πεπτιδυλογλυταμυλο-υδρολάσης (PGPH), η  $\beta_2$  το ενεργό κέντρο ενεργότητας θρυψίνης (T-L) και η  $\beta_5$  το ενεργό κέντρο ενεργότητας χυμοθρυψίνης (CT-L). Επιπλέον, οι 5 από τις 7  $\beta$ -υπομονάδες φέρουν μια μικρή αλληλουχία στο  $\text{NH}_2$ -τελικό τους άκρο (προ-πεπτίδιο), η οποία αποκόπτεται κατά τη συγκρότηση του συμπλόκου. Αυτή η αποκοπή είναι απαραίτητη, προκειμένου να εκτεθεί το κατάλοιπο θρεονίνης που φέρουν οι  $\beta$ -υπομονάδες και το σύμπλοκο να αποκτήσει ενεργότητα πρωτεάσης. Τα προ-πεπτίδια των ενεργών κέντρων  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  και  $\beta_5$  αποκόπτονται μέσω αυτοκατάλυσης, ενώ τα προ-πεπτίδια των μη καταλυτικών  $\beta$ -υπομονάδων αποκόπτονται από τις γειτονικές ενεργές αλληλουχίες [158].

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η συγκρότηση του πρωτεοσώματος είναι απόλυτα ρυθμιζόμενη [159], με τη δημιουργία ενδιάμεσων προ-συμπλόκων, 13S και 16S, γνωστά και ως «μισά» πρωτεοσώματα [160]. Οι  $\alpha$ -υπομονάδες δημιουργούν αυθόρμητα δακτυλίους επταμερών και αποτελούν μήτρες επάνω στις οποίες ενσωματώνονται οι  $\beta$ -υπομονάδες

[161]. Η πρόσδεση των β-υπομονάδων πραγματοποιείται σε διάφορα στάδια [162]. Τρεις από τις επτά β-υπομονάδες, η β<sub>2</sub>, η β<sub>3</sub> και η β<sub>4</sub>, έχουν ταυτοποιηθεί ως μέλη του 13S προ-συμπλόκου. Οι υπόλοιπες τέσσερις β-υπομονάδες, β<sub>5</sub>, β<sub>6</sub>, β<sub>7</sub> και β<sub>1</sub>, αποτελούν μέλη του 16S προ-συμπλόκου. Ο διμερισμός των δύο προ-συμπλόκων στο προ-ολοπρωτεόσωμα ακολουθείται από την αποκοπή των NH<sub>2</sub>-τελικών προ-πεπτιδίων των β-υπομονάδων [163]. Η μετατροπή του προ-ολοπρωτεοσώματος σε πλήρως λειτουργικό, «ώριμο» πρωτεόσωμα, φαίνεται να είναι ένα βασικό στάδιο ρύθμισης.

Είναι απαραίτητο να αναφερθεί πως η ωρίμανση των πρωτεοσωμάτων στα ευκαρυωτικά κύτταρα απαιτεί την παρουσία και συμμετοχή επιπλέον πρωτεϊνών κατά το τελικό στάδιο ωρίμανσης. Για παράδειγμα, η hsc73 αλληλεπιδρά με το 16S προ-σύμπλοκο και το διατηρεί σε μη διπλωμένη κατάσταση, ώστε να είναι δυνατή η αποκοπή των προ-πεπτιδίων από τις β-υπομονάδες, το σωστό δίπλωμα των πρωτεϊνών και η σωστή ενσωμάτωση των υπομονάδων [164]. Άλλη πρωτεΐνη που παίζει κύριο ρόλο είναι η Ump1 στη ζύμη [165] ή POMP (Proteasome Maturation Protein) [166] στον άνθρωπο. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν μέλη των πρωτεοσωμικών προ-συμπλόκων, βρίσκονται παροδικά στο εσωτερικό των «ανώριμων» πρωτεοσωμάτων για να βοηθήσουν στην ενεργοποίηση των β-υπομονάδων και αποδομούνται από το ίδιο το ενεργό πρωτεόσωμα [165]. Η Ump1 προσδέεται στο β<sub>5</sub> προ-πεπτίδιο [165], ενώ η POMP μπορεί να συνδεθεί και σε άλλα προ-πεπτίδια β-υπομονάδων [166]. Ο ακριβής ρόλος και η σημασία αυτών των πρωτεϊνών χρίζουν περαιτέρω μελέτης.

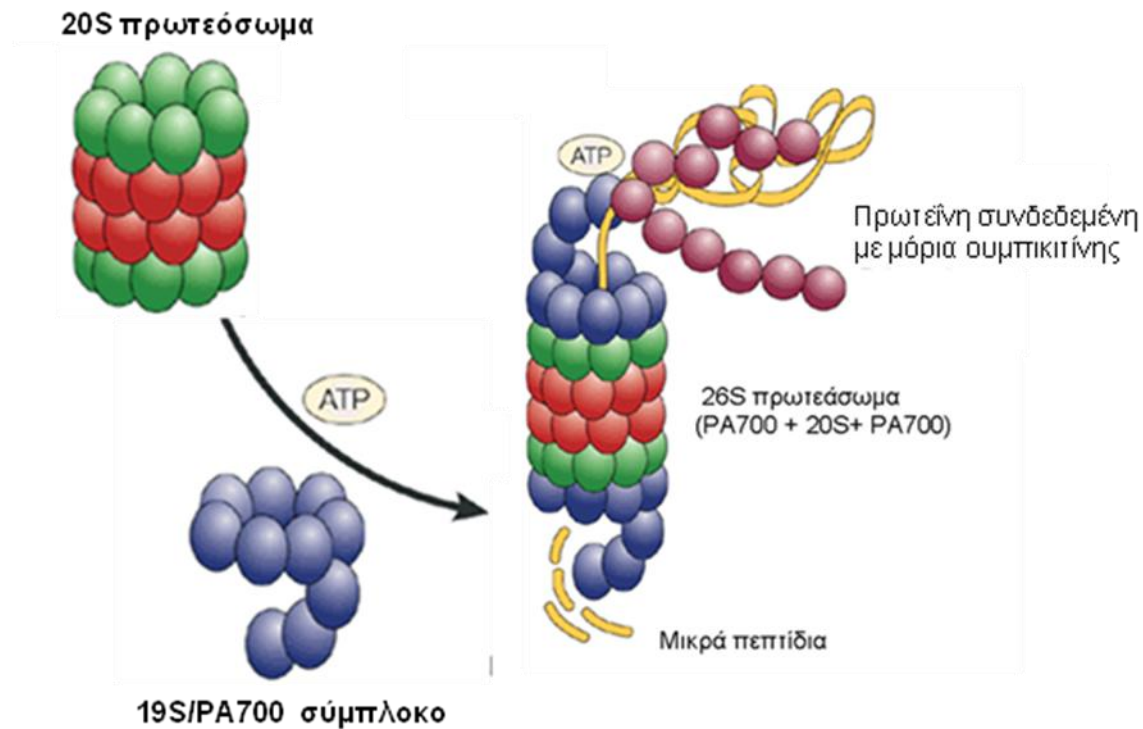
### **Ανοσοπρωτεόσωμα**

Ένας διαφορετικός τύπος 20S συμπλόκου είναι το ανοσοπρωτεόσωμα, το οποίο παίζει κύριο ρόλο κατά τη διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης [167]. Η προσθήκη γ-ιντερφερόνης στα κύτταρα μεταβάλλει τόσο τις πρωτεοσωμικές ενεργότητες όσο και την πρωτεϊνική σύσταση των πρωτεοσωμάτων των κυττάρων αυτών. Συγκεκριμένα, οι β-υπομονάδες β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub> και β<sub>5</sub> (συνεχώς εκφραζόμενες υπομονάδες υπό φυσιολογικές συνθήκες), αντικαθίστανται από τις υπομονάδες, β<sub>1i</sub>, β<sub>2i</sub> και β<sub>5i</sub> αντίστοιχα [168]. Κατά την αντικατάσταση αυτή, αυξάνεται η V<sub>max</sub> πρωτεόλυσης ύστερα από υδρόφοβα και βασικά αμινοξέα των απομονωμένων 20S και 26S συμπλόκων [169], ενώ μειώνεται η ενεργότητα πρωτεόλυσης ύστερα από όξινα αμινοξέα [170]. Τα πρωτεοσώματα που φέρουν τις ανοσο-υπομονάδες (β<sub>1i</sub>, β<sub>2i</sub> και β<sub>5i</sub>) είναι πιο αποδοτικά στην παραγωγή αντιγονικών πεπτιδίων (πεπτίδια που είναι πιο κατάλληλα για την MHC-τάξης I παρουσίαση) συγκριτικά με τα πρωτεοσώματα που φέρουν τις υπομονάδες β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub> και β<sub>5</sub>. Τα ανοσοπρωτεοσώματα βρίσκονται κυρίως στο

ήπαρ και στο σπλήνα και όχι στους μύες και στον εγκέφαλο, όπου ούτως ή άλλως τα MHC-τάξης I μόρια βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα.

## 26S

Το 26S σύμπλοκο δημιουργείται κατά την ATP-εξαρτώμενη πρόσδεση ενός 19S συμπλόκου σε κάθε άκρο του 20S (Εικ. 12). Πρόκειται για ένα πολυ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο, μοριακού βάρους ~2500 KDa, υπεύθυνο για την αποδόμηση πρωτεϊνών σημασμένων με ουμπικιτίνη [171, 172]. Αποτελείται από δύο αντίγραφα τουλάχιστον 32 υπομονάδων υψηλά συντηρημένων στους ευκαρυώτες. Τα υποστρώματα κερδίζουν πρόσβαση στο 20S μόνο μέσω των στενών πόρων που σχηματίζονται από την α υπομονάδα, με ένα μηχανισμό για το «άνοιγμα των θυρών». Αυτή η λειτουργία επιτελείται από το 19S, ένα σύμπλοκο σχεδόν 1MDa.



**Εικόνα 12 Σχηματική αναπαράσταση του 26S πρωτεοσωμικού συμπλόκου**

Το 19S σύμπλοκο ενώνεται στα δύο άκρα του 20S συμπλόκου, δίνοντας το 26S σύμπλοκο που είναι υπεύθυνο για την ATP-εξαρτώμενη και ουμπικιτυλιο-εξαρτώμενη πρωτεϊνική αποδόμηση.

Το 19S σύμπλοκο αποτελείται από 17 υπομονάδες που ομαδοποιούνται σε δύο υπο-σύμπλοκα, τη «βάση» (base) και το «καπάκι» (lid). Η «βάση» αποτελείται από έξι ATPάσες (Rpt 1-6) που ανήκουν στην AAA-οικογένεια (ATPases Associated with different cellular Activities) και τέσσερις μη-ATPάσες (Rpn1, Rpn2, Rpn10 και Rpn13). Οι ATPάσες

δημιουργούν μια δομή εξαμερούς δακτυλίου. Η «βάση» βρίσκεται σε επαφή με το 20S σύμπλοκο και είναι υπεύθυνη για το ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών προς αποδόμηση και τη διάνοιξη του πόρου στο 20S σύμπλοκο, για την προώθηση των υποστρωμάτων μέσα σε αυτό. Η Rpt2 ανοίγει τον πόρο, ενώ η Rpt5 αναγνωρίζει την αλυσίδα ουμπικιτίνης του υποστρώματος. Η μη-ATPάση Rpn10/S5a λειτουργεί ως υποδοχέας της ουμπικιτίνης. Το «καπάκι» αποτελείται από οχτώ μη-ATPάσες (Rpn3, Rpn5, Rpn6, Rpn7, Rpn8, Rpn9, Rpn11 και Rpn12) και είναι απαραίτητο για την αναγνώριση πολυ-ουμπικιτυλιωμένων υποστρωμάτων προς αποδόμηση. Προσδένεται στη «βάση» μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ της Rpn12 και Rpn2 και μεταξύ της Rpn11 και Rpn1. Η Rpn10 φαίνεται πως ενέχεται στη σταθεροποίηση αυτών των αλληλεπιδράσεων.

Το 19S σύμπλοκο επιτελεί διάφορες βιοχημικές λειτουργίες. Αναγνωρίζει ουμπικιτυλιωμένα υποστρώματα, φέρει ενεργότητα ισοπεπτιδάσης που διασπά τις αλυσίδες ουμπικιτίνης σε μονομερή που επαναχρησιμοποιούνται, ανοίγει μία οπή στα άκρα του για την προώθηση των πρωτεϊνών προς αποδόμηση στο εσωτερικό της πρωτεολυτικής κοιλότητας και φέρει ενεργότητα αποδιάταξης των υποστρωμάτων και μεταφοράς των ξεδιπλωμένων/αποδιαταγμένων πεπτιδίων μέσα στην κοιλότητα του 20S.

Πολλές πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διαδικασίες αποδόμησης (Rad23, Dsk2, Ddi1) μοιράζονται μία κοινή περιοχή που μοιάζει με ουμπικιτίνη και η οποία αναγνωρίζεται από την υπομονάδα Rpn1 [173]. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν επιπλέον μία COOH-τελική περιοχή UbA, που συνδέεται στις αλυσίδες πολυ-ουμπικιτίνης, για να τις προστατεύσει από τη δράση των ενζύμων απο-ουμπικιτυλίωσης DUBs [174].

Επομένως, το πρωτεόσωμα είναι ένα σύνθετο σύμπλοκο με ποικιλία δραστηριοτήτων. Περιληπτικά, τα ουμπικιτυλιωμένα υποστρώματα αρχικά αναγνωρίζονται και προσδένονται στους υποδοχείς ουμπικιτίνης που βρίσκονται στο 19S. Τα μόρια ουμπικιτίνης απομακρύνονται από το υπόστρωμα μέσω των DUBs και ανακυκλώνονται. Τα υποστρώματα δεν είναι πλέον διπλωμένα και διαπερνούν τον πόρο του 20S μέσω μίας πύλης. Μερικές πρωτεΐνες μπορούν να αποδομηθούν απευθείας από το 20S κατά έναν τρόπο ανεξάρτητο της ουμπικιτίνης, όπως είναι η πρωτεΐνη p21 [175], p53 [176] και Rb [177]. Συνεπώς, η ουμπικιτυλίωση φαίνεται ότι απαιτείται για την αναγνώριση των πρωτεϊνών από το 19S του πρωτεοσώματος.

### **Χιμαιρικά Πρωτεοσώματα**

Πέραν του 19S, υπάρχουν πολλά ρυθμιστικά μόρια που είτε σχηματίζουν εναλλακτικούς συνδυασμούς με υποπληθυσμούς του πρωτεοσώματος είτε σχηματίζουν χιμαιρικά

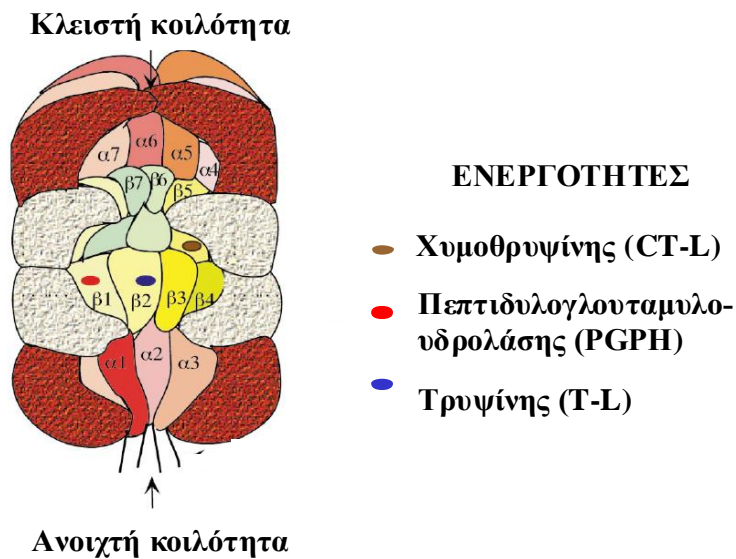
πρωτεοσώματα με ένα μόριο 19S στο ένα άκρο και κάποιο άλλο μόριο στο άλλο άκρο. Αυτά τα ρυθμιστικά μόρια είναι μη-ΑΤΡάσες, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το 11S. Το 11S μπορεί να προσδεθεί στα δύο άκρα του 20S συμπλόκου απουσία ΑΤΡ, δίνοντας ένα καινούριο σύμπλοκο (11S:20S:11S), μοριακού βάρους ~1000 KDa. Αποτελείται από δύο υπομονάδες, την 11S υπομονάδα α και την 11S υπομονάδα β, μοριακού βάρους ~30 KDa η καθεμιά. Οι υπομονάδες αυτές παρουσιάζουν ~50% ομοιότητα μεταξύ τους και ~35% ομοιότητα με το Ki αντιγόνο ή αλλιώς, 11S υπομονάδα γ, το οποίο επίσης μπορεί να ενεργοποιήσει το πρωτεόσωμα [178]. Ο κύριος ρόλος του αφορά ιδιαίτερα τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος κατά την αντιγονοπαρουσίαση, καθώς αυξάνει τις ενεργότητες του ανοσοπρωτεοσώματος, εξασφαλίζοντας τις βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή πεπτιδίων της MHC-τάξης I [179].

Να αναφερθεί, επίσης, ότι έχουν βρεθεί και υβριδικά πρωτεοσώματα, όπου στο ένα άκρο του 20S πρωτεοσώματος είναι προσδεμένο ένα 19S σύμπλοκο, ενώ στο άλλο άκρο ένα 11S σύμπλοκο. Ο ακριβής ρόλος του συμπλόκου αυτού δεν είναι ακόμα γνωστός.

### **Καταλυτικά κέντρα του 20S πρωτεοσώματος**

Μελέτες με τη βοήθεια φλουοροπεπτιδίων, που χρησιμεύουν ως υποστρώματα του πρωτεοσώματος σε *in vitro* συνθήκες, αποκάλυψαν τρεις βασικές πρωτεοσωμικές ενεργότητες, τα ενεργά κέντρα των οποίων αποτελούν οι β-υπομονάδες: α) ενεργότητα πεπτιδυλογλουταμυλο-υδρολάσης (PGPH), το ενεργό κέντρο της οποίας είναι η β1 υπομονάδα και πρωτεολύει ύστερα από όξινα αμινοξέα, β) ενεργότητα τρυψίνης (T-L), το ενεργό κέντρο της οποίας είναι η β2 υπομονάδα και πρωτεολύει ύστερα από βασικά αμινοξέα και γ) ενεργότητα χυμοθρυψίνης (CT-L), η οποία πρωτεολύει ύστερα από μεγάλα υδρόφοβα αμινοξέα και το ενεργό της κέντρο είναι η β5 υπομονάδα (Εικ. 13) [163]. Έχουν αναφερθεί και δύο άλλες ενεργότητες, η ΒrAAP ενεργότητα, η οποία πρωτεολύει ύστερα από αμινοξέα με μεγάλες πλευρικές αλυσίδες και η ενεργότητα SNAAP, η οποία ευθύνεται για την πρωτεόλυση ύστερα από μικρά, ουδέτερα αμινοξέα [180].

Οι ενεργότητες κάθε ενεργού κέντρου δεν είναι απόλυτα εξειδικευμένες. Για παράδειγμα, το πρωτεόσωμα του *Thermoplasma acidophilum* που φέρει μόνο ένα ενεργό κέντρο και παρουσιάζει κυρίως την ενεργότητα χυμοθρυψίνης, μπορεί επίσης να πρωτεολύει ύστερα από βασικά και όξινα αμινοξέα, αν και ο ρυθμός είναι 10 φορές χαμηλότερος [181]. Φαίνεται, λοιπόν, πως κατά την εξέλιξη των ευκαρυωτικών πρωτεοσωμάτων, τα ενεργά τους κέντρα εξελίχθηκαν φέροντας αυξημένες αλλά όχι απόλυτα εξειδικευμένες ενεργότητες.



**Εικόνα 13 Καταλυτικά κέντρα του 20S πρωτεοσώματος**

Στην εσωτερική κοιλότητα του συμπλόκου υπάρχουν τα καταλυτικά κέντρα των ενεργοτήτων του πρωτεοσώματος. Στη  $\beta_1$  υπομονάδα εντοπίζεται το καταλυτικό κέντρο ενεργότητας πεπτιδολογλουταμυλο-υδρολάσης, στη  $\beta_2$  υπομονάδα το καταλυτικό κέντρο ενεργότητας τρυψίνης και στη  $\beta_5$  υπομονάδα το ενεργό κέντρο ενεργότητας χυμοθρυψίνης.

Το πρωτεόσωμα αποτελεί ενδοκυτταρική πρωτεΐνη τύπου θρεονίνης. Το νουκλεόφιλο ενεργό κέντρο είναι η ομάδα υδροξυλίου στο  $\text{NH}_2$ -τελικό άκρο θρεονίνης στις  $\beta$ -υπομονάδες. Το τελικό αυτό κατάλοιπο θρεονίνης φαίνεται να παραμένει συντηρημένο στις περισσότερες  $\beta$ -υπομονάδες των ευκαρυωτικών κυττάρων, αλλά και σε αυτές των βακτηρίων [182]. Κατά τη βιοσύνθεση του συμπλόκου, η  $\text{NH}_2$ -τελική θρεονίνη εκτίθεται μέσω ενδοπρωτεολυτικής αποκοπής του προ-πεπτιδίου που υπάρχει στη θέση αυτή, οπότε η πρωτεάση γίνεται ενεργή [183]. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού, το ενεργό κέντρο χρειάζεται να φέρει και μία βασική ομάδα για να δεχθεί το πρωτόνιο από το υδροξύλιο της θρεονίνης. Η  $\alpha$ -αμινομάδα της  $\text{NH}_2$ -τελικής θρεονίνης, βρίσκεται σε κατάλληλη θέση ώστε να δράσει ανάλογα και να προσδέσει το πρωτόνιο.

- **Ενεργοποιητές του 20S πρωτεοσώματος**

Η ρύθμιση της δράσης του πρωτεοσώματος διέπεται από ακριβείς ρυθμιστικούς μηχανισμούς, ώστε να επιτυγχάνεται η επιλεγμένη πρωτεϊνική αποδόμηση και όχι μία γενικευμένη και βλαβερή πρωτεόλυση στο κύτταρο. Αρχικά, η δομή του πρωτεοσώματος, δηλαδή η απομόνωση των ενεργών κέντρων στο εσωτερικό της πρωτεοσωμικής κοιλότητας και το κλείσιμο της κοιλότητας από τους  $\alpha$ -δακτυλίους μειώνει κατά πολύ τις πιθανότητες

μη ειδικής πρωτεόλυσης. Παράλληλα, το πρωτεόσωμα διατηρείται σε ανενεργή μορφή και ενεργοποιείται με την επίδραση διάφορων παραγόντων, όπως η θερμοκρασία, η παρουσία βασικών πολυπεπτιδίων, η παρουσία γλυκερόλης ή SDS στο δοκιμαστικό σωλήνα.

Εκτός από την ίδια τη δομή του πρωτεοσώματος, η πρόσδεση δύο ρυθμιστικών συμπλόκων επάνω στο 20S σύμπλοκο είναι αυτή που κυρίως αλλάζει δραματικά την ενεργότητα του πρωτεοσώματος στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το πρώτο είναι το 19S σύμπλοκο που με την πρόσδεσή του στο 20S, μέσω κατανάλωσης ATP, δίνει το 26S σύμπλοκο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Το δεύτερο είναι ο PA28 ενεργοποιητής [184] ή αλλιώς 11S σύμπλοκο [185], που προσδέεται επάνω στο 20S, δίνοντας το PA28:11S σύμπλοκο και φαίνεται να αυξάνει την ενεργότητα του πρωτεοσωμικού συμπλόκου αλλά όχι στα αρχικά στάδια πρωτεϊνικής αποδόμησης.

Εκτός από τα παραπάνω σύμπλοκα, υπάρχει άλλη μία πρωτεΐνη η οποία παίζει ρόλο ενεργοποιητή. Πρόκειται για την πρωτεΐνη PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase), η οποία βρέθηκε ότι προσδέεται επάνω σε πυρηνικά πρωτεοσώματα κατά το οξειδωτικό στρες (με  $H_2O_2$ ) των κυττάρων, οπότε οδηγεί σε αύξηση των πρωτεοσωμικών ενεργοτήτων, αποκτώντας έτσι ρόλο στην κυτταρική άμυνα και στην ανταπόκριση στο οξειδωτικό στρες [186]. Τέλος, έχει αναφερθεί πως υπερέκφραση κάποιων πρωτεοσωμικών υπομονάδων οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα κάποιων πρωτεοσωμικών ενεργοτήτων. Συγκεκριμένα, κατά την επιμόλυνση κυττάρων με τη β1 υπομονάδα, τα επίπεδα της ενεργότητας πεπτιδυλο-γλουταμυλο-υδρολάσης αυξάνονται από 1.5-2.5 φορές σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα ενεργότητας σε κύτταρα που δεν έχουν επιμολυνθεί [187]. Η επιμόλυνση με την β1i υπομονάδα οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα ενεργότητας τρυψίνης, ενώ κατά την επιμόλυνση με την β5i υπομονάδα, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα ενεργότητας χυμοθρυψίνης [188].

- **Αναστολείς του 20S πρωτεοσώματος**

Εκτός από ενεργοποιητές έχουν βρεθεί και αναστολείς του πρωτεοσώματος τόσο χημικοί όσο και πρωτεϊνικοί. Η πρωτεΐνη Hsp90, η οποία απομονώνεται συχνά μαζί με το 20S πρωτεόσωμα, έχει βρεθεί ότι αναστέλλει μία από τις ενεργότητες του πρωτεοσώματος [189]. Επιπλέον, η λιποφουσκίνη, ένα ηλεκτρονιόφυκο υλικό με ενδογενή φθορισμό που δημιουργείται κυρίως από οξειδωμένα παράγωγα λιπιδίων και πρωτεϊνών, έχει βρεθεί ότι προσδέεται επάνω στα καταλυτικά κέντρα του 20S συμπλόκου και αναστέλλει τις ενεργότητες του [190]. Παράλληλα, έχει αναφερθεί πως η πρόσδεση γενικά οξειδωμένων πρωτεϊνών στα καταλυτικά κέντρα του πρωτεοσώματος αναστέλλει τις ενεργότητες αυτού [191].

Οι πρώτοι χημικοί αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κάποια αλδεϋδικά πεπτίδια ανάλογα των υποστρωμάτων του πρωτεοσώματος, όπως ο MG101 (Acetyl-leu-leu-norleucinal) που βρέθηκε ότι αναστέλλει την ενεργότητα χυμοθρυψίνης. Με βάση τη δομή αυτών των πρώτων αναστολέων, σχεδιάστηκαν πιο ικανοί αναστολείς, με διάφορα άλλα βελτιωμένα χαρακτηριστικά, όπως η ικανότητά τους να εισάγονται εύκολα στο κύτταρο. Έτσι, σχεδιάστηκε ο παράγοντας MG115 και διάφορα άλλα παράγωγα αυτού. Ο MG132 είναι ένα ανάλογο λευπεπτίνης που εισάγεται εύκολα μέσα στο κύτταρο και προσδένεται επάνω στη β5 υπομονάδα, αναστέλλοντας κυρίως την ενεργότητα χυμοθρυψίνης και σε δεύτερο χρόνο, προσδένεται επάνω στη β1 υπομονάδα, επηρεάζοντας την ενεργότητα πεπτιδυλο-γλουταμυλο-υδρολάσης [192]. Η δράση του είναι αντιστρεπτή, αφού ύστερα από την αφαίρεσή του από τα κύτταρα, οι πρωτεοσωμικές ενεργότητες επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα μέσα σε μία ώρα. Η αποτελεσματικότητά του στην αναστολή των πρωτεοσωμικών ενεργοτήτων (αναστολή έως και 90%) είναι πολύ μεγαλύτερη όταν προστίθεται σε κύτταρα από ότι σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Τα κύτταρα παραμένουν ζωντανά για τουλάχιστον 10-20 ώρες, παρουσία ακόμα και υψηλής συγκέντρωσης του MG132. Κατά τη χρονική αυτή περίοδο, ο ρυθμός πρωτεϊνοσύνθεσης και τα κυτταρικά αποθέματα σε ATP παραμένουν άθικτα. Τέλος, οι ερευνητές άρχισαν να αναζητούν φυσικά προϊόντα που να αναστέλλουν τις πρωτεοσωμικές ενεργότητες. Έτσι, απομονώθηκαν ουσίες όπως η λακτασιστίνη και ανάλογες λακτόνες, ενώ σήμερα ο πιο ειδικός αναστολέας του πρωτεοσώματος είναι η εποξομισίνη.

### **1.4.3 Ουμπικιτυλίωση και πρωτεοσωμική αποδόμηση της p53 από την Mdm2**

#### **1.4.3.1 Λιγάζση ουμπικιτίνης Mdm2**

Ο κύριος μηχανισμός που διατηρεί την πρωτεΐνη p53 ανενεργή στα κύτταρα μεσολαβείται από την πρωτο-ογκοπρωτεΐνη Mdm2 [193], η οποία οδηγεί την p53 προς πρωτεοσωμική αποδόμηση [194]. Παρόλο που αρκετά E2 ένζυμα μπορούν να υποστηρίξουν την ουμπικιτυλίωση της p53 από την Mdm2 *in vitro*, τα πιο σημαντικά E2 στα κύτταρα είναι τα ένζυμα UbcH5B και C [122].

Η πρωτεΐνη Mdm2 ανιχνεύθηκε ως προϊόν ενός από τα τρία γονίδια που εντοπίζονται σε μία αυθόρμητα μετασχηματισμένη κυτταρική σειρά ποντικού (3T3-DM) [195]. Η πρωτεΐνη Mdm2 είναι πολύ σημαντική για την επιβίωση και τη φυσιολογική ανάπτυξη των οργανισμών, όπως προκύπτει από μελέτες σε ποντίκια που δε διαθέτουν το γονίδιο mdm2



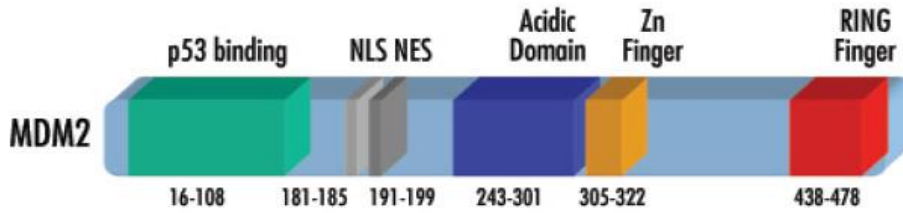
(knock-out). Διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία έχει αφαιρεθεί το γονίδιο mdm2 πεθαίνουν νωρίς κατά την εμβρυογένεση, ως αποτέλεσμα απόπτωσης λόγω συσσώρευσης της p53. Ταυτόχρονη, όμως, απενεργοποίηση της p53 επιτρέπει την επιβίωσή τους [196]. Ακόμα και ποντίκια ομόζυγα ως προς τη μεταλλαγμένη RING περιοχή οδηγούνται σε θάνατο, που δείχνει ότι αν και η μεταλλαγμένη Mdm2 διατηρεί την ικανότητα να προσδένει p53, δεν μπορεί να καταστείλει πλήρως την ενεργότητά της. Συνεπώς, τον πρωταρχικό ρόλο στην αναστολή της p53 κατέχει η ενεργότητα λιγάσης ουμπικιτίνης της Mdm2 [197].

Η Mdm2 είναι μία πρωτεΐνη με RING δομή [198, 199] και ουμπικιτυλιώνει την p53 μέσω της RING περιοχής που διαθέτει [200]. Όταν η Mdm2 βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, προάγει τη μονο-ουμπικιτυλίωση της p53 και προκαλεί την έξοδό της από τον πυρήνα. Αντίθετα, υψηλά επίπεδα Mdm2 πολυ-ουμπικιτυλιώνουν την p53 για την πρωτεοσωμική αποδόμησή της [201]. Η Mdm2 μπορεί, ακόμα, να προσδέεται απευθείας στην NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή της p53 και να αναστέλλει τη μεταγραφική της ενεργότητα [202, 203]. Η κατανομή των παραπάνω ρόλων της Mdm2 προέκυψε από μία πρόσφατη μελέτη σε ποντίκια που παρήγαγαν μία μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Mdm2 που δεν είχε ενεργότητα λιγάσης [197].

Πολλοί μηχανισμοί ενεργοποίησης της p53 συνεπάγονται την καταστροφή της αλληλεπίδρασης μεταξύ p53 και Mdm2, οδηγώντας σε συσσώρευση της p53 στον πυρήνα και ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων της. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τόσο της p53 όσο και της Mdm2, αλλά και των μορίων που προσδέονται σε αυτές.

Το γονίδιο mdm2 περιέχει 12 εξόνια και έχει δύο διαφορετικούς υποκινητές P1 και P2, ο δεύτερος από τους οποίους αποκρίνεται στο μεταγραφικό παράγοντα p53. Έναρξη εναλλακτικής μετάφρασης δημιουργεί δύο πρωτεΐνες, την p90 και τη μικρότερη p76. Η p76 δεν προσδένει p53 και δρα ως δομικός αναστολέας της p90, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της p53 [204-206]. Διάφορες περιπτώσεις εναλλακτικού ματίσματος της Mdm2 έχουν περιγραφεί και συνήθως υπερεκφράζονται στους καρκίνους.

Η πλήρης πρωτεΐνη αποτελείται από 491 αμινοξέα και περιέχει αρκετές λειτουργικές περιοχές (Εικ. 14). Η περιοχή που προσδένει την πρωτεΐνη p53 βρίσκεται στο NH<sub>2</sub>-τελικό τμήμα της Mdm2 και αλληλεπιδρά με ένα υψηλά συντηρημένο τμήμα της NH<sub>2</sub>-τελικής περιοχής της p53 [207]. Περιλαμβάνει, ακόμα, μία κεντρική όξινη περιοχή, σημαντική για την E3 ενεργότητα, που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, όπως η ARF [88, 89] και οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες L5, L11 και L23 [98, 100, 101], αλλά μεσολαβεί και στην αλληλεπίδραση με την κεντρική περιοχή της p53 [208].



#### Εικόνα 14 Δομή της Mdm2 λιγάσης

Οι βασικές περιοχές της πρωτεΐνης Mdm2. Η περιοχή που προσδένει p53 (p53 binding), το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), το σήμα εξόδου από τον πυρήνα (NES), η όξινη περιοχή (acidic domain), η ZINC και η RING περιοχή.

Η ZINC περιοχή (Zn-finger) αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες L5 και L11 [209], αν και η ακριβής λειτουργία αυτής της περιοχής παραμένει άγνωστη. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η RING περιοχή (RING-finger) απαιτείται για την ενεργότητα λιγάσης ουμπικιτίνης της Mdm2. Αυτή η περιοχή περιέχει ένα συντηρημένο μοτίβο Walker A ή P loop, το οποίο εντοπίζεται σε πρωτεΐνες που συνδέονται με νουκλεοτίδια. Πράγματι, η Mdm2 αλληλεπιδρά με νουκλεοτίδια αδενίνης, με αποτέλεσμα την αλλαγή στη διαμόρφωση της COOH-τελικής της περιοχής [210], ρυθμίζοντας έτσι τον εντοπισμό της Mdm2 στον πυρηνίσκο. Άλλα σημαντικά δομικά στοιχεία της Mdm2 είναι το σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) κοντά στο σήμα εξόδου από τον πυρήνα (NES) και ένα σήμα εντοπισμού στον πυρηνίσκο (Εικ. 14).

#### 1.4.3.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ p53 και Mdm2

Υπό φυσιολογικές συνθήκες στο κύτταρο, η p53 διατηρείται σε πολύ χαμηλά επίπεδα από την Mdm2 μέσω ενός αυτο-ρυθμιζόμενου κύκλου αρνητικής ανάδρασης (autoregulatory negative feedback loop) [65, 66]. Η p53 ενεργοποιεί μεταγραφικά την Mdm2, η οποία στη συνέχεια καταστέλλει την p53 μέσω τριών μηχανισμών. Πρώτον, η Mdm2 προσδέεται στη μεταγραφική περιοχή της p53 και μπλοκάρει τη μεταγραφική της ικανότητα. Δεύτερον, εμπλέκεται στην έξοδο της p53 από τον πυρήνα και τρίτον, η Mdm2 δρα ως λιγάση ουμπικιτίνης που επάγει την αποδόμηση της p53 [199].

Μία συντηρημένη περιοχή στην NH<sub>2</sub>-τελική επιφάνεια της p53 προσδέεται σε μία βαθιά υδροφοβική σχισμή στην NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή της Mdm2 (αμινοξέα 25-109), όπως φαίνεται από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου p53-Mdm2 [207]. Η σχισμή στην Mdm2 σχηματίζεται από τα κατάλοιπα 26-108, από τα οποία τα κατάλοιπα G58, G68, V75 και C77 είναι τα πιο σημαντικά, όπως προκύπτει από αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης [211]. Το τμήμα της αλληλεπίδρασης p53-Mdm2 έχει χαρτογραφηθεί στα κατάλοιπα αμινοξέων 18-26, από τα οποία τα L14, F19, L22, W23 και Leu26 είναι τα πιο σημαντικά για την αλληλεπίδραση

[212]. Τα γειτονικά κατάλοιπα είναι χρήσιμα διότι τροποποιούν τη διαμόρφωση αυτού του τμήματος. Συγκεκριμένα, το συντηρημένο box I (αμινοξέα 13-18) της p53 υπερκαλύπτει τη θέση που προσδένεται η Mdm2 [213].

Επιπλέον, η COOH-τελική περιοχή της p53 και ο τετραμερισμός της p53 παίζουν κάποιο ρόλο σ' αυτήν την αλληλεπίδραση, όπως δείχνουν μελέτες με απαλοιφές συγκεκριμένων γονιδίων [213]. Εκτός από την NH<sub>2</sub>- και την COOH-τελική περιοχή της p53, η περιοχή πρόσδεσης DNA παρέχει μία δεύτερη θέση πρόσδεσης για την Mdm2, εμπλέκοντας την όξινη περιοχή [214]. Σε αυτό συμφωνούν δομικές μελέτες που έχουν δείξει ότι η όξινη και μέρος της ZINC περιοχής της Mdm2 συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση με την κεντρική περιοχή της p53 [215]. Το μοντέλο που επικρατεί σήμερα προτείνει ότι η NH<sub>2</sub>-τελική αλληλεπίδραση μεταξύ p53 και Mdm2 επάγει μία αλλαγή στη διαμόρφωση της Mdm2 και οδηγεί σε αλληλεπίδραση μεταξύ της όξινης περιοχής της Mdm2 και της κεντρικής περιοχής της p53, μία επαφή απαραίτητη για την αποτελεσματική συμπίκνωση της p53.

#### 1.4.3.3 Αναστολείς της αλληλεπίδρασης μεταξύ p53 και Mdm2

Δεδομένου ότι το γονίδιο mdm2 έχει βρεθεί πως υπερεκφράζεται σε πολλούς ανθρώπινους καρκίνους, η ενεργοποίηση του p53 μονοπατιού έπειτα από αναστολή της Mdm2 αποτελεί μία νέα θεραπευτική στρατηγική [216-218]. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η καταστροφή της αλληλεπίδρασης μεταξύ p53 και Mdm2, με διάφορες μακρομοριακές τεχνικές ή με την καταστολή της έκφρασης της Mdm2, μπορεί να ενεργοποιήσει την p53 και να αναστείλει την αύξηση των όγκων.

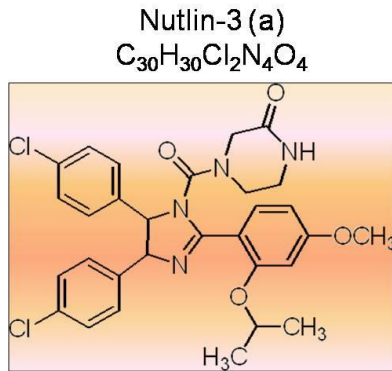
Υπάρχουν διάφοροι ανταγωνιστές της αλληλεπίδρασης p53-Mdm2, όπως τα α-πεπτίδια, κάποια φυσικά προϊόντα και μικρά μόρια. Τα α-πεπτίδια δημιουργήθηκαν από τη Novartis σε μία προσπάθεια να καθοριστεί η εξειδίκευση των θέσεων της Mdm2 για τη σύνδεση αμινοξέων, χρησιμοποιώντας βιβλιοθήκες συνθετικών πεπτιδίων που είχαν παραχθεί από την NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή της p53 [219].

Από τα φάρμακα φυσικής προέλευσης, μόνο τρία έχουν αναφερθεί ότι διαθέτουν ανασταλτική δράση έναντι της αλληλεπίδρασης p53-Mdm2, οι χαλκόνες, η χλωροφουσίνη και το εξιλτακονικό οξύ. Οι αναστολείς που βασίζονται στη χαλκόνη (1,3-diphenyl-2-propen-1-ones, chalcones) ήταν οι πρώτοι που αναφέρθηκαν και οι καλύτερα μελετημένοι [220]. Αλληλεπιδρούν με τη θήκη τρυπτοφάνης (tryptophan pocket) της Mdm2, αλλά υπάρχουν μόνο λίγες αναφορές για τη χρησιμοποίησή τους, καθώς δεν είναι πολύ ειδικοί ως προς την πρωτεΐνη-στόχο και προκαλούν τοξικότητα τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, πιθανά εξαιτίας μηχανισμών ανεξάρτητων από τη

σχέση p53-Mdm2 [221]. Η χλωροφουσίνη (chlorofusin) είναι ένας μεταβολίτης του μύκητα *Microcochium caespitosum*, που συνδέεται στην NH<sub>2</sub>-τελική επιφάνεια της Mdm2 [222]. Το εξλιτακονικό οξύ (hexylitaconic acid) απομονώθηκε από μία καλλιέργεια ζύμωσης ενός μύκητα *Arthriniium sp.*, που διαχωρίστηκε από ένα θαλάσσιο σπόγγο, αλλά η στερεοχημεία του ενεργού μορίου και η ακριβής λειτουργία δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστά [223].

Όσον αφορά τα μικρά μόρια, το πρώτο μη πεπτιδικό μικρό μόριο που σχεδιάστηκε *de novo* ήταν το Syc-7 [224], μιμούμενο την παρουσία των καταλοίπων Phe19 και Trp23 της p53 μέσα στη σχισμή πρόσδεσης της Mdm2. Οι σουλφοναμίδες (sulfonamides), που προέκυψαν με *in silico* τεχνικές, προσδένονται κατάλληλα στην Mdm2 στη θέση που κανονικά προσδένεται η p53, αλλά δεν έχουν γίνει περαιτέρω μελέτες. Οι βενζοδιαζεπινεδιόνες (benzodiazepinediones) βρέθηκαν με την τεχνική η οποία βασίζεται στη θεωρία ότι οι ουσίες που προσδένονται στην πρωτεΐνη-στόχο θα πρέπει να αυξήσουν τη θερμική σταθερότητα της πρωτεΐνης. Χρησιμοποιεί φθορίζουσες χρώσεις και ελέγχει τις πρωτεΐνες που δεν είναι διπλωμένες (ThermoFluor assay) [225]. Στην ίδια κατηγορία αναστολέων περιλαμβάνονται, επίσης, οι σπιρο-οξινδόλες (spiro-oxindoles) [226] και οι ισοϊνδολινόνες (isoindolinones) [227] χωρίς κάποια εφαρμογή σε *in vivo* συστήματα.

Ο πρώτος κατάλληλος και επιλεκτικός αναστολέας της αλληλεπίδρασης p53-Mdm2, αποτελεσματικός σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα, αναφέρθηκε το 2004 από τους επιστήμονες της Roche [228]. Παρόλο που θεωρούνταν πολύ δύσκολο να βρεθούν μικρά μόρια που να αναστέλλουν αυτήν την αλληλεπίδραση, η παρουσία των καλά ορισμένων υδροφοβικών θέσεων στην επιφάνεια της Mdm2 βοήθησε στην εύρεση τέτοιου μορίου. Έτσι, λοιπόν, αναγνωρίστηκε μία σειρά από cis-imidazoline ανάλογα που ονομάστηκαν Nutlins. Τα μόρια αυτά μιμούνται τον τρόπο που προσδένεται η p53 στην Mdm2 με μία μέση συγκέντρωση IC<sub>50</sub> (συγκέντρωση του αναστολέα που απαιτείται για την αναστολή της αλληλεπίδρασης κατά 50%) ίση με 100 έως 300 nM. Ένας δακτύλιος βρωμοφαινόλης του μορίου Nutlin κάθεται βαθιά στη θέση πρόσδεσης τρυπτοφάνης, το άλλο υποκατάστατο βρωμοφαινόλης εφαρμόζει στη θέση πρόσδεσης λευκίνης και η αλυσίδα στην πλευρά του αιθυλ-αιθέρα κατευθύνεται προς την θέση πρόσδεσης της φαινυλαλανίνης. Το πιο δραστικό από όλα τα cis-imidazoline ανάλογα είναι το ενεργό εναντιομερές (a) του Nutlin-3 (Εικ. 15).



**Εικόνα 15** Δομή του αναστολέα Nutlin-3a της αλληλεπίδρασης p53-Mdm2

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μία σειρά από πειράματα σε κυτταρικές σειρές και ζώα, ώστε να διαπιστωθεί εάν η αναστολή της αλληλεπίδρασης p53-Mdm2 επάγεται την ενεργοποίηση του p53 μονοπατιού. Τα μόρια Nutlins είναι αποτελεσματικά μόνο σε κύτταρα που εκφράζουν την άγριου-τύπου πρωτεΐνη p53 και όχι σε κύτταρα με απενεργοποιημένη μεταγραφικά ή μεταλλαγμένη p53. Συγκεκριμένα, ενεργοποιούν την p53 μέσω μετα-μεταφραστικών μηχανισμών αναστέλλοντας την αποδόμησή της, χωρίς να επηρεάζουν την ίδια τη μεταγραφή της p53. Η πρωτεΐνη p53 σταθεροποιείται και συσσωρεύεται, με αποτέλεσμα την επαγωγή του p53 μονοπατιού και τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων, p21 και Mdm2 [229].

#### 1.4.3.4 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν τη σταθερότητα της p53

Έπειτα από την επίδραση κάποιου στρες, η p53 υφίσταται φωσφορυλίωση και ακετυλίωση στην NH<sub>2</sub>- και COOH- τελική περιοχή, συσσωρεύεται και ενεργοποιείται [230]. Συγκεκριμένα, η βλάβη του DNA και άλλα στρες προκαλούν φωσφορυλίωση της p53 στις θέσεις S6, S9, S15, T18, S20, S33, S37, S46, T81 της NH<sub>2</sub>-τελικής περιοχής, στις θέσεις S315 και S392 της COOH-τελικής περιοχής και στις θέσεις T150, T155 και S149 της DBD περιοχής. Όμως, ακόμα και στα φυσιολογικά κύτταρα, τα κατάλοιπα T55, S376 και S378 φωσφορυλιώνονται [230]. Επιπρόσθετα, η Mdm2 φωσφορυλιώνεται μετά από βλάβη του DNA στη θέση Ser395 από την ATM κινάση [231], στη θέση Y394 από τη c-Abl [232], που μειώνει την ικανότητα της Mdm2 να αποδομήσει την p53 και στα κατάλοιπα 166 και 186 από την Akt, που επάγουν την είσοδο της Mdm2 στον πυρήνα και αυξάνουν την ουμπικιτυλίωση της p53 [233].

Φωσφορυλίωσεις στην NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή σταθεροποιούν την p53 αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση με την Mdm2. Μετά από βλάβη του DNA, οι κινάσες ATM και Chk2 φωσφορυλιώνουν την p53 στις θέσεις S15 και S20 αντίστοιχα [234, 235], ενώ η Chk1 τη φωσφορυλιώνει στις θέσεις S15 και S37 [86, 236]. Η βιολογική σημασία αυτών των

φωσφορυλιώσεων έχει προκύψει από μοντέλα σε ποντίκια με τη δημιουργία διάφορων μεταλλάξεων. Συχνά, όμως, τα ποντίκια δε δίνουν τους αναμενόμενους φαινοτύπους, καθώς κάποια θέση μπορεί να φωσφορυλιώνεται από διάφορες κινάσες ή μία κινάση μπορεί να φωσφορυλιώνει πολλά κατάλοιπα. Αυτή η ποικιλομορφία πιθανά αποτελεί έναν τρόπο για τη σωστή επιλογή της κατάλληλης απόκρισης σε διαφορετικά ερεθίσματα.

Τροποποιήσεις στην DBD περιοχή της p53 είναι λιγότερο χαρακτηρισμένες, αλλά έχουν βρεθεί ότι επηρεάζουν τη σταθερότητα της p53. Αντίθετα με τις NH<sub>2</sub>-τελικές φωσφορυλιώσεις που σταθεροποιούν την p53, φωσφορυλιώσεις στην DBD περιοχή (S149, T150 και T155) οδηγούν σε αποδόμησή της [237]. Άλλη τροποποίηση είναι η γλυκοζυλίωση στη θέση S149 της DBD περιοχής της p53, που σταθεροποιεί την p53 μπλοκάροντας την ουμπικιτυλίωση και αποδόμησή της [238].

Όσον αφορά την ουμπικιτυλίωση της p53, η Mdm2 συνδέεται στην NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή της p53 και ουμπικιτυλιώνει τις COOH-τελικές λυσίνες (K370, K372, K373, K381, K382 και K386), οι οποίες μπορούν επίσης να τροποποιηθούν από μόρια που μοιάζουν με ουμπικιτίνη, τα Nedd8 και SUMO-1. Η νεδυλίωση της p53 προάγεται από την Mdm2 στις λυσίνες K370, K372 και K373 [149], αλλά και από ένα μέλος της οικογένειας F-box, FBXO11, στις λυσίνες K320 και K321 [239], αναστέλλοντας τη μεταγραφική ενεργότητα της p53, μάλλον λόγω αναστολής της ακετυλίωσης αυτών των καταλοίπων. Η σουμοϋλίωση της p53 συμβαίνει στη θέση K386, αλλά η βιολογική της σημασία παραμένει άγνωστη, καθώς έχει βρεθεί ότι ρυθμίζει θετικά και αρνητικά τη λειτουργία της p53 [240-242]. Από τη στιγμή που αυτές οι τροποποιήσεις αφορούν τις ίδιες λυσίνες, είναι πιθανό να αναστέλλουν ή να διευκολύνουν η μία την άλλη.

Η σταθερότητα και ενεργότητα της p53 ρυθμίζεται, ακόμα, με ακετυλίωση των COOH-τελικών κατάλοιπων λυσίνης από τις πρωτεΐνες p300/CBP και PCAF, που ενεργοποιούν την p53-εξεργτώμενη μεταγραφή. Η PCAF ακετυλιώνει την p53 στη θέση K320 και τα ετεροδιμερή p300/CBP στρατολογούνται στην NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή της p53 και ακετυλιώνουν τις COOH-τελικές λυσίνες K370, K372, K373, K381, K382 και K386 [243, 244]. Η ακετυλίωση της p53 ρυθμίζεται από την απο-ακετυλάση HDAC-1 (Histone DeAcetylase1) ή το ρυθμιστή Sir2a (Silent Information Regulator 2a) [245, 246]. Η ακετυλίωση αναστέλλει την ουμπικιτυλίωση και σταθεροποιεί την p53, ενώ η απο-ακετυλίωση της p53 την οδηγεί σε ουμπικιτυλίωση και αποδόμηση. Όμοια με την ακετυλίωση, η μεθυλίωση της λυσίνης 370 επίσης σταθεροποιεί την p53 και ενεργοποιεί τα γονίδια-στόχους [247]. Έτσι, λοιπόν, θεωρείται ότι η διαδικασία της ουμπικιτυλίωσης είναι λίγο ανομοιογενής και εάν οι COOH-τελικές λυσίνες απομακρυνθούν, η λιγάση μετακινείται

πάνω σε άλλες λυσίνες. Πράγματι, η πρωτεΐνη p53 περιέχει 20 διαφορετικές λυσίνες, που δυνητικά χρησιμοποιούνται για τη σύζευξη της ουμπικιτίνης.

#### 1.4.4 Άλλες λιγάσες

Η πρωτεΐνη Mdmx είναι ένας άλλος ρυθμιστής της p53, δομικά σχετικός με την Mdm2 και έχει αναγνωριστεί ως προϊόν «χρωμοσωμικής ενίσχυσης», όπως και η Mdm2 [248]. Η Mdmx έχει αυξημένη ομολογία με την Mdm2. Περιέχει μία NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή για σύνδεση με την p53 και μία COOH-τελική RING περιοχή [249]. Παρά την παρουσία της RING περιοχής, η Mdmx δεν έχει ενδογενή ενεργότητα λιγάσης ουμπικιτίνης. Η Mdmx αλληλεπιδρά με την NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή της p53 με παρόμοιο τρόπο όπως η Mdm2 [250], αλλά αποτυγχάνει να ουμπικιτυλιώσει την p53 και να την οδηγήσει σε αποδόμηση [251, 252]. Η Mdm2 και η Mdmx ετεροδιμερίζονται η μία με την άλλη [253], ενώ η Mdmx συνεργάζεται με την Mdm2 όταν υπερεκφράζεται στα κύτταρα και επηρεάζει την ενεργότητα λιγάσης [254]. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η Mdmx παίζει σπουδαίο ρόλο στην αρνητική ρύθμιση της δράσης της p53. Από μελέτες σε ποντίκια που δεν εκφράζουν Mdmx, συμπεραίνεται ότι η Mdmx αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα της p53 ανεξάρτητα από την Mdm2, ενώ η Mdm2 απαιτείται για τη ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p53. Απώλεια της Mdmx δεν οδηγεί σε συσσώρευση της p53, που σημαίνει ότι η Mdmx δε ρυθμίζει τη σταθερότητα της p53 [255, 256].

Ο αριθμός των λιγασών που μπορούν να ουμπικιτυλιώσουν την p53 ανεξάρτητα από την Mdm2 συνεχώς αυξάνει. Οι μέχρι σήμερα γνωστές E3 λιγάσες ουμπικιτίνης που είναι ειδικές για την πρωτεΐνη p53 συνοψίζονται στον πίνακα 1. Η πρώτη λιγάση που αναφέρθηκε ότι δρα πάνω στην p53 ήταν η E6-AP (E6-associated protein), που ουμπικιτυλιώνει και αποδομεί την p53 σε κύτταρα που μολύνονται με τον ογκογόνο ιό HPV (human papilloma virus), όπου και σχηματίζει σύμπλοκο με την ιική πρωτεΐνη E6 [257].

Άλλες λιγάσες που έχουν αναφερθεί είναι η Pirh2 [258], η Cop1 [259], η CHIP (C-terminal of Hsp70-interacting protein) [260], η TOPORS [123, 261], η ARF-BP1 [262], η Synoviolin [263], η Carps [264], η WWP1 [265], η E4F1 [79] και η Cullin 7 [266] και όλες μπορούν να ουμπικιτυλιώνουν την p53 ανεξάρτητα από την Mdm2. Όμοια με την Mdm2, η Pirh2 και η Cop1 είναι γονίδια-στόχοι της p53 και ανήκουν στην οικογένεια των λιγασών με RING περιοχή [258, 259].

Λιγάσες Ουμπικιτίνης	Τάξη	Λειτουργία	Αναφορά
<b>Mdm2</b>	RING	Μονο- και πολυ-ουμπικιτυλίωση, αποδόμηση, έξοδος από τον πυρήνα	(175)
<b>Mdmx</b>	RING	Δεν ουμπικιτυλιώνει την p53, αναστέλλει τη μεταγραφική ενεργότητα της p53	(345, 346)
<b>Pirh2</b>	RING	Ουμπικιτυλίωση και αποδόμηση	(84)
<b>Cop1</b>	RING	Ουμπικιτυλίωση και αποδόμηση	(83)
<b>ARF-BP1/ HectH9/ MULE</b>	HECT	Ουμπικιτυλίωση και αποδόμηση	(185)
<b>E6-AP</b>	HECT	Ουμπικιτυλίωση και αποδόμηση	(181)
<b>CHIP</b>	U-box	Ουμπικιτυλίωση και αποδόμηση	(355)
<b>Cullin7</b>	RING	Μονο- και δι-ουμπικιτυλίωση, μειώνει την trans-ενεργοποίηση της p53	(356)
<b>E4F1</b>	atypical	K48 ουμπικιτυλίωση, τροποποιεί την ενεργότητα της p53 για να επάγει παύση του κυτταρικού κύκλου	(101)
<b>Synoviolin</b>	RING	Ουμπικιτυλίωση και αποδόμηση, απομόνωση στο κυτταρόπλασμα	(357)
<b>WWP1</b>	HECT	Ουμπικιτυλίωση, συσώρευση p53 στο κυτταρόπλασμα	(358)
<b>Topors</b>	RING	Ουμπικιτυλίωση και αποδόμηση	(178)
<b>Carps</b>	RING	Ουμπικιτυλίωση και αποδόμηση	(359)

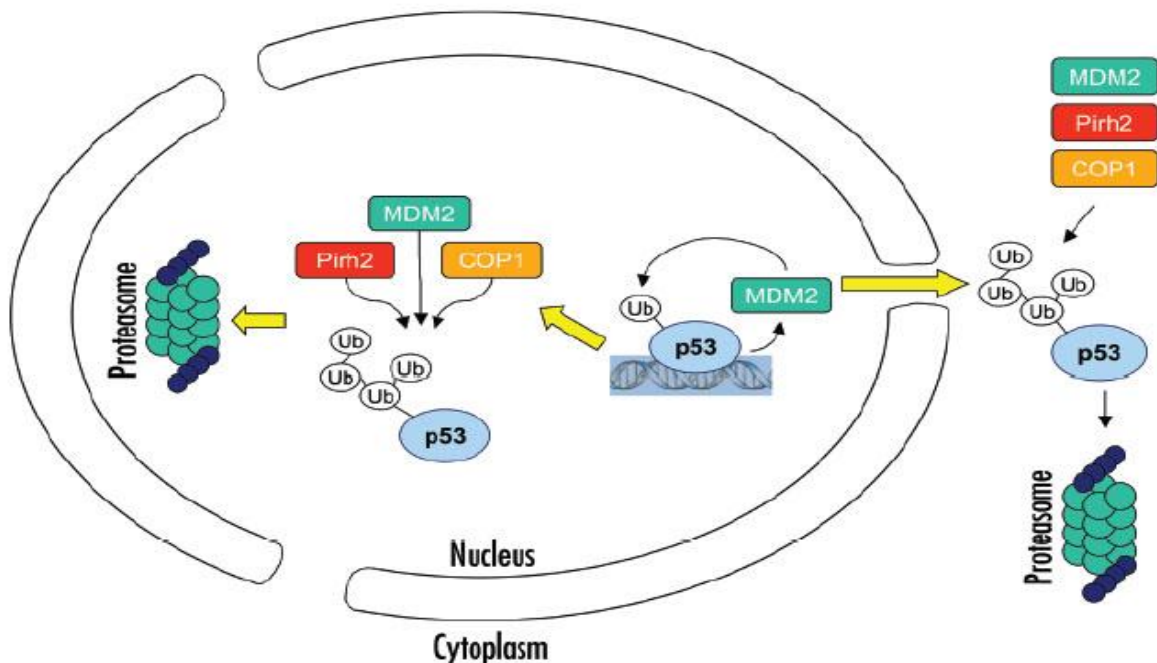
### Πίνακας 1 Λιγάσες ουμπικιτίνης της πρωτεΐνης p53

Η ARF-BP1/HectH9/Mule, μία λιγάση με HECT περιοχή, απομονώθηκε από κύτταρα χωρίς p53 (p53-null) σαν πρωτεΐνη που προσδέεται στην ARF. Η ARF αλληλεπιδρά με την ARF-BP1 και της αναστέλλει την ενεργότητα λιγάσης που διαθέτει, δείχνοντας ότι μπορεί να ελέγχει την p53 ως απόκριση στην ενεργοποίηση των ογκογονιδίων. Η Synoviolin και η CHIP είναι λιγάσες που σχετίζονται με το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER-associated ubiquitin ligases). Η Synoviolin ουμπικιτυλιώνει την p53 και την απομονώνει στο κυτταρόπλασμα, ως απόκριση σε στρες που αφορά το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER stress) [263]. Η CHIP ουμπικιτυλιώνει και αποδομεί την p53 που είναι προσδεμένη από τις συνοδές πρωτεΐνες Hsp70 και Hsp90, δηλαδή στέλνει για πρωτεόλυση μη φυσιολογικές πρωτεΐνες p53 [260, 267].

Οι περισσότερες από αυτές τις λιγάσες επηρεάζουν τη σταθερότητα της p53, με εξαίρεση την E4F1, που αλλάζει τη μεταγραφική ενεργότητα της p53 χωρίς να επιδρά στην πρωτεόλυσή της [79]. Η TOPORS μπορεί να συνδέσει είτε ουμπικιτίνη είτε SUMO στην



p53, χωρίς να έχει διευκρινιστεί ακόμα το βιολογικό αποτέλεσμα αυτής της σύζευξης [268]. Κάποιες από τις λιγάσες, όπως η CHIP, η Synoviolin και η Cullin-7 εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, επομένως ρυθμίζουν κυρίως την κυτταροπλασματική p53 πρωτεΐνη. Έχει βρεθεί, για παράδειγμα, ότι η p53 υπόκειται σε K63-ουμπικιτυλίωση που μεσολαβείται από το E2 ένζυμο Ubc13, αυξάνοντας τη σταθερότητά της και την εμφάνισή της στο κυτταρόπλασμα [124]. Φαίνεται, λοιπόν, ότι υπάρχει μία ποικιλία λιγασών που στοχεύουν την p53 και που είναι απαραίτητη για την εξειδικευμένη ρύθμιση της πρωτεΐνης αυτής στις αποκρίσεις έναντι των διάφορων τύπων στρες, αλλά η βιολογική τους σημασία χρίζει περαιτέρω διερεύνησης.



**Εικόνα 16 Η διαδικασία της ουμπικιτυλίωσης της p53 από τρία από τα κύρια E3 ένζυμα λιγάσες ουμπικιτίνης, Mdm2, Pirh2 και COP1**

Η p53 μπορεί να μονο-ουμπικιτυλιωθεί από την Mdm2 στον πυρήνα και στη συνέχεια να πολυ-ουμπικιτυλιωθεί από τα ένζυμα Mdm2, Pirh2 ή COP1 και να οδηγηθεί στο πρωτεόσωμα για αποδόμηση. Επίσης, μπορεί να βγει από τον πυρήνα και να ουμπικιτυλιωθεί στο κυτταρόπλασμα από ένα από αυτά τα ένζυμα ή από συνδυασμό πολλών μαζί και να αποδομηθεί από τα πρωτεοσώματα του κυτταροπλάσματος. Τι ακριβώς συμβαίνει και ποια λιγάση θα ενεργήσει σε συγκεκριμένη στιγμή δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί και εξαρτάται από το δεδομένο κυτταρικό τύπο και τη φάση ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται το κύτταρο.

## 1.4.5 Ρύθμιση της p53 από το σύστημα των συνοδών πρωτεϊνών

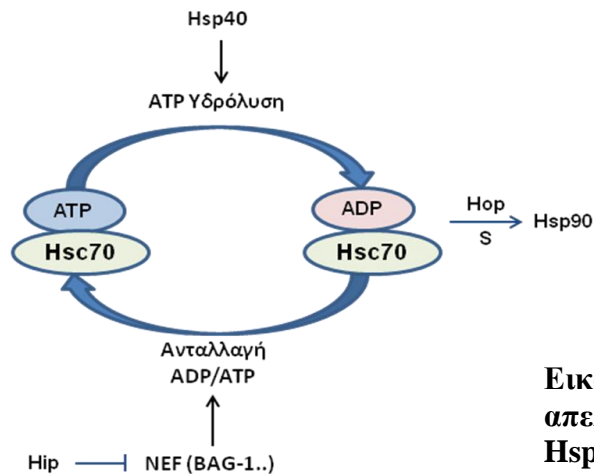
### 1.4.5.1 Συνοδές πρωτεΐνες (chaperones)

Αρχικά, οι επιστήμονες θεωρούσαν ότι η απαραίτητη πληροφορία για τη δημιουργία της τεταρτοταγούς δομής μίας πρωτεΐνης περιέχεται στην πρωτοταγή αλληλουχία των αμινοξέων [269]. Σήμερα, είναι πλέον γνωστό ότι οι περισσότερες νεοσχηματισθείσες πρωτεΐνες ενός κυττάρου δε θα μπορούσαν να διπλωθούν σωστά χωρίς τη βοήθεια πρόσθετων «μηχανών». Τα σημαντικά στοιχεία αυτών των «μηχανών» αποτελούν οι μοριακές συνοδές πρωτεΐνες ή σαπερόνες (molecular chaperones) και τρεις από τις πιο άφθονες τάξεις συνοδών πρωτεϊνών είναι οι Hsp70s, οι Hsp40s και οι Hsp90s. Οι πρωτεΐνες Hsp70s και Hsp40s εμποδίζουν τη συσσώρευση πρωτεϊνών (protein aggregation) και καταλύουν το σωστό δίπλωμα των πολυπεπτιδίων, καθώς προσδένονται στις υδρόφοβες ομάδες των πρωτεϊνών που δεν είναι διπλωμένες φυσιολογικά. Η λειτουργία της Hsp70 ρυθμίζεται από την Hsp40, από μόρια που αλληλεπιδρούν με την Hsp40 και από παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (Nucleotide Exchange Factors, NEFs). Οι πρωτεΐνες Hsp90 ρυθμίζονται από μία ειδική ομάδα πρωτεϊνών και παρόλο που έρχονται σε επαφή με τα πολυπεπτίδια, δε συνδέονται επιλεκτικά στα εκτεθειμένα υδρόφοβα αμινοξέα [270].

Οι Hsp70 πρωτεΐνες εντοπίζονται σε κάθε σημείο του κυττάρου και συμμετέχουν σε μία μεγάλη ποικιλία διεργασιών, στο σωστό δίπλωμα των νεοσχηματισθέντων πρωτεϊνών, στην αποφυγή σχηματισμού αγγρεσωμάτων, στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών, στη μετατόπιση των πρωτεϊνών κατά μήκος των μεμβρανών των οργανιδίων, στη δημιουργία και καταστροφή των πρωτεϊνικών συμπλόκων. Αποτελούνται από μία NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή ATPάσης ~45KDa, μία περιοχή για την πρόσδεση πεπτιδίων και μία COOH-τελική περιοχή ~10KDa, το «καπάκι». Διακρίνεται η μορφή Hsp70 που επάγεται από στρες και η μορφή που εκφράζεται συνεχώς στο κύτταρο, γνωστή ως Hsc70 [271]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η Hsp70 εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στο κύτταρο, αλλά επάγεται σε πολύ υψηλά επίπεδα έπειτα από έντονο στρες. Η Hsc70 δεν εξαρτάται από τους διάφορους τύπους στρες, αλλά εκφράζεται σταθερά στο κύτταρο.

Τα ομόλογα της Hsp70 πρωτεΐνης καταλύουν τις ξεχωριστές τους λειτουργίες μέσω κύκλων πρόσδεσης και απελευθέρωσης υποστρωμάτων, μία διαδικασία που ελέγχεται με υδρόλυση ATP [272] (Εικ. 17). Στην ATP μορφή, η Hsp70 συνδέεται στο υπόστρωμά της με πολύ χαμηλή συγγένεια. Στην ADP μορφή, η Hsp70 συνδέεται στο υπόστρωμά της με πολύ υψηλή συγγένεια. Η ενεργότητα ATPάσης της Hsp70 είναι πολύ αδύναμη ( $3 \times 10^{-4}$  έως  $1,6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) και αυτός ο ρυθμός δεν επαρκεί ώστε να επάγει σύνδεση υποστρώματος και δίπλωμα

προϊόντος [273, 274]. Για το λόγο αυτό, η σύνδεση του υποστρώματος καταλύεται από τις συν- συνοδές (co-chaperones) πρωτεΐνες Hsp40, οι οποίες διεγείρουν την υδρόλυση ATP της Hsp70 (Εικ. 17). Η πρώτη Hsp40 που αναγνωρίστηκε ήταν η DnaJ πρωτεΐνη στα βακτήρια, που ενισχύει την ενεργότητα ATPάσης της DnaK πρωτεΐνης, της αντίστοιχης Hsp70 των βακτηρίων [275, 276].



**Εικόνα 17** Κύκλος πρόσδεσης και απελευθέρωσης υποστρωμάτων από την Hsp70

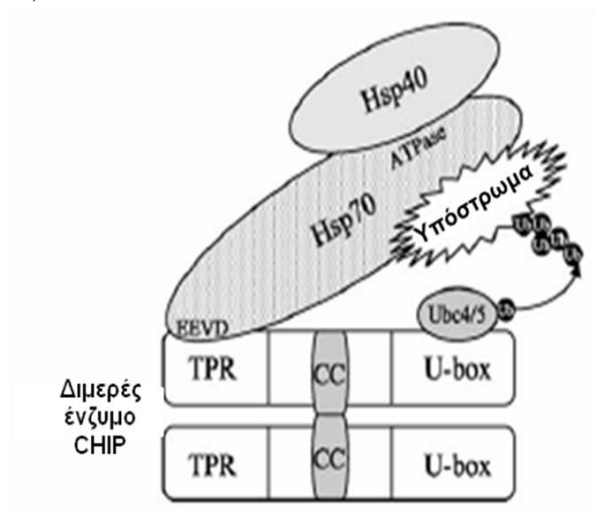
Από τους πιο σημαντικούς παράγοντες NEFs είναι η πρωτεΐνη BAG-1 (Bcl-2 athanogene 1), που επιταχύνει την ενεργότητα ATPάσης της Hsp70 ενισχύοντας την απελευθέρωση του ADP [277, 278]. Αντίθετα με τους NEFs, ένας αρνητικός ρυθμιστής της Hsc70, η πρωτεΐνη Hip (Hsc70-Interacting Protein), σταθεροποιεί το δεσμό Hsc70-ADP και καθυστερεί τον κύκλο ATPάσης. Έτσι, ευνοεί τη συνεργασία της Hsc70 με άλλα συστήματα συνοδών πρωτεϊνών, όπως η Hsp90 [279, 280] (Εικ. 17). Η Hsp90 συνεργάζεται με την Hsp70, προκειμένου να δεχτεί από την Hsp70 το υπόστρωμα που πρέπει να διπλωθεί σωστά, μία διαδικασία στην οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες Hip και Hop (Hsp70/Hsp90 organising protein) [281, 282] (Εικ. 17).

Η Hsp90 κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο για τη σταθερότητα και τη λειτουργία μεγάλου αριθμού κυτταρικών πρωτεϊνών [283]. Είναι μία από τις πιο άφθονες συνοδές πρωτεΐνες μες στο κύτταρο, ενώ εκφράζεται 2-10 φορές περισσότερο στους διάφορους καρκίνους, αποτελώντας 1-2 % του συνολικού πρωτεϊνικού φορτίου [284]. Η υπερέκφραση της Hsp90 στον καρκίνο του μαστού έχει συσχετιστεί με ανθεκτικότητα σε κάποιες μορφές χημειοθεραπείας [285]. Θεωρείται ότι η ενεργότητα σαπερόνης της Hsp90 πιθανά είναι κρίσιμη για τη σηματοδότηση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην εξέλιξη κάποιων τύπων καρκίνου. Για το λόγο αυτό, το 1994 διατυπώθηκε η άποψη ότι μία τάξη αντιβιοτικών, γνωστά ως ανσαμυκίνες βενζοκινόνης (benzoquinone ansamycins), συνδέονται ειδικά στην

Hsp90 και αναστέλλουν την ενεργότητά της, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση των υποστρωμάτων της [286]. Αργότερα, χρησιμοποιήθηκε ένα ανάλογο της γελδαναμυκίνης, ο αναστολέας 17AAG (17-Allylaminogeldanamycin), που μπλοκάρει τη δράση της Hsp90 και συνακόλουθα, το σωστό δίπλωμα των υποστρωμάτων της. Ο αναστολέας αυτός χρησιμοποιείται ήδη σε πολλαπλές κλινικές δοκιμές φάσης II και φαίνεται πως έχει αντικαρκινική δράση [287].

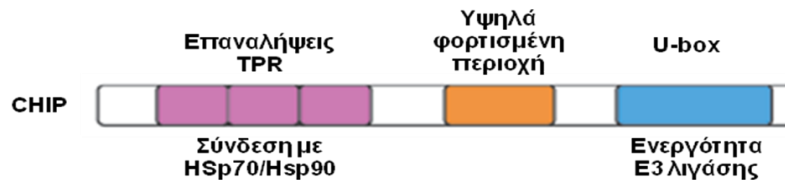
#### 1.4.5.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ Hsp70/Hsp90 και CHIP λιγάσης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η CHIP πρωτεΐνη είναι μία E3 λιγάση ουμπικιτίνης με χαρακτηριστική U-box περιοχή. Η CHIP (COOH-terminus of Hsp70-interacting protein) ή το ανθρώπινο ομόλογο STUB1 χαρακτηρίζεται ως μία συν-συνοδός πρωτεΐνη (co-chaperone protein), η οποία αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης Hsp70 [288]. Η CHIP είναι ένα διμερές ένζυμο μοριακού βάρους 35 KDa και αλληλεπιδρά αποτελεσματικά με τα E2 ένζυμα της οικογένειας UBCH5, τα οποία αποκρίνονται σε συνθήκες στρες (Εικ. 18).



**Εικόνα 18** Αλληλεπίδραση του διμερούς ενζύμου CHIP με τα E2 ένζυμα Ubc4/5 και με τις μοριακές συνοδούς Hsp70 και Hsp40

Το γονίδιο της CHIP εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16 και η πρωτεΐνη αποτελείται από 303 αμινοξέα. Επιπρόσθετα, η CHIP λιγάση λειτουργεί ως παράγοντας συγκρότησης των αλυσίδων ουμπικιτίνης, οπότε και αναφέρεται ως «E4» ένζυμο [130, 131]. Περιέχει τρεις λειτουργικές περιοχές, μία TPR (Tetratricopeptide Repeat) επανάληψη στο αμινοτελικό άκρο, μία U-box περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο και μία υψηλά φορτισμένη (coiled-coil) περιοχή [289] (Εικ. 19). Ο συνδυασμός των δύο περιοχών, U-box και TPR, σε μία πρωτεΐνη είναι ισχυρή ένδειξη ότι η πρωτεΐνη CHIP «ζευγαρώνει» δύο συστήματα, το σύστημα των συνοδών πρωτεϊνών και του 26S πρωτεοσώματος.



**Εικόνα 19** Δομή της CHIP λιγάσης

Η TPR περιοχή μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση με την Hsp90 και την Hsp70 (Εικ. 19), ρυθμίζοντας διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης και ελέγχου πρωτεϊνικής ποιότητας, γεγονός που χαρακτηρίζει την CHIP ως «quality control protein». Η CHIP προσδένεται και αναστέλλει την ενεργότητα ATPάσης των Hsc70/Hsp70 και μπλοκάρει την αντίδραση πρόσδεσης του υποστρώματος σε αυτές. Ουμπικιτυλιώνει αρκετά υποστρώματα, τα περισσότερα εκ των οποίων είναι μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις συνοδές πρωτεΐνες Hsp70 και/ή Hsp90 [132], μεταξύ των οποίων και την p53 [290-292]. Η CHIP μπλοκάρει τον κύκλο ATPάσης της Hsp70, εμποδίζει την απομάκρυνση των υποστρωμάτων και κατ' επέκταση διευκολύνει την ουμπικιτυλίωσή τους [130, 288].

Η υπερέκφραση της CHIP λιγάσης στα θηλαστικά κύτταρα οδηγεί σε ενισχυμένη αποδόμηση ενός αριθμού υποστρωμάτων των συνοδών πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών, ο ρυθμιστής της διαμεμβρανικής αγωγιμότητας στην κυστική ίνωση (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) και ο μεταγραφικός παράγοντας p53 [131, 260, 293].

#### **1.4.5.3 Ισορροπία μεταξύ του διπλώματος και της αποδόμησης της p53**

Έχουμε ήδη συζητήσει τη ρύθμιση της p53 πρωτεΐνης από την Mdm2 λιγάση, μέσω του αυτο-ρυθμιζόμενου κύκλου αρνητικής ανάδρασης [65, 66]. Ένας πρόσθετος μηχανισμός υπεύθυνος για τη ρύθμιση της σταθερότητας της p53 είναι η αλληλεπίδραση με τις μοριακές σαπερόνες Hsp70 και Hsp90 [294, 295]. Έχει, επίσης,δειχθεί ότι η πρόσδεση της Hsp90 στην p53 αναστέλλει την ικανότητα της Mdm2 να προάγει την ουμπικιτυλίωση και αποδόμηση της p53, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της μεταλλαγμένης p53 και της Mdm2 [296, 297]. Παρόλο που η Mdm2 παίζει κεντρικό ρόλο στην πρωτεοσωμική αποδόμηση της p53, πρόσθετες λιγάσες συμμετέχουν στα φυσιολογικά κύτταρα, όπως η p300, η Pirh2, η COP1 και η CHIP [258-260, 298]. Το 2004, αναγνωρίστηκε ένα μονοπάτι που σχετίζεται με την πρωτεϊνική αποδόμηση, το οποίο συνδυάζει τις σαπερόνες Hsp70 και Hsp90 με το 26S πρωτεόσωμα [299]. Βασικό ρόλο σε αυτό το μονοπάτι κατέχει η λιγάση ουμπικιτίνης CHIP, η οποία αλληλεπιδρά με τις σαπερόνες [288].

Ο Vojtesek και οι συνεργάτες του περιγράφουν τον κύριο ρόλο της CHIP λιγάσης στην αποδόμηση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών p53 που δεν είναι φυσιολογικά διπλωμένες. Αντίθετα, η CHIP έχει μικρό ή κανένα ρόλο στην αποδόμηση είτε της φυσικού τύπου είτε της μεταλλαγμένης p53 που είναι κανονικά διπλωμένες [300]. Η ρύθμιση της σταθερότητας των μη διπλωμένων p53 πρωτεϊνών συμβαίνει μέσω της Hsp90, κατά ένα μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης που οδηγεί είτε σε δίπλωμα είτε σε αποδόμηση της p53. Η αυξημένη ενεργότητα της Hsp90 και η επιλογή του διπλώματος είναι μία άλλη πολύ σημαντική κατάσταση για την έκφραση των υψηλών επιπέδων μεταλλαγμένης p53. Αυτή η ανακάλυψη εξηγεί γιατί τα ποντίκια που κληρονομούν ομόζυγες p53 μεταλλάξεις, εκφράζουν τη μεταλλαγμένη p53 σε χαμηλά επίπεδα σε διαφοροποιημένους ιστούς [301]. Οι μεταλλαγμένες p53 πρωτεΐνες που δε βρίσκονται σε διπλωμένη μορφή εμφανίζονται σε χαμηλά πρωτεϊνικά επίπεδα, δεικνύοντας ότι υπόκεινται σε υψηλό βαθμό αποδόμησης. Αυτές οι μεταλλάξεις απαιτούν την απουσία της Hsp90 ή την αναστολή της ενεργότητάς της, όπως επιτυγχάνεται με την εφαρμογή του 17AAG αναστολέα, προκειμένου να αποδομηθούν. Τέλος, οι μη διπλωμένες μεταλλαγμένες πρωτεΐνες p53 αλληλεπιδρούν με την Hsp70 και η CHIP που βρίσκεται σε σύμπλοκο με την Hsp70 επάγει την αποδόμησή τους.

Συμπερασματικά, σε φυσιολογικές συνθήκες στο κύτταρο, τα επίπεδα της p53 πρωτεΐνης βρίσκονται σε μία ισορροπία μεταξύ της διαδικασίας του διπλώματος και της πρωτεολυτικής αποδόμησης. Η νεοσυντιθέμενη ή μη διπλωμένη πρωτεΐνη p53 προσδένεται από την Hsp70 και σε συνεργασία με τις άλλες σαπερόνες, Hsp40 και Hop, η p53 μεταβαίνει στην επόμενη διαδικασία. Συγκεκριμένα, η Hop διευκολύνει τη σύνδεση του υποστρώματος της Hsp70 με την Hsp90 [302, 303]. Εκ φύσεως μη διπλωμένες μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, όπως η p53 R175H, σχηματίζουν σταθερό σύμπλοκο με τις σαπερόνες και η ενεργότητα της Hsp90 συμβάλλει ώστε να αποτραπεί η αποδόμησή τους. Εάν η ενεργότητα της Hsp90 είναι χαμηλή ή μπλοκάρει από τη δράση του αναστολέα 17AAG, τότε οι μη διπλωμένες πρωτεΐνες p53 συνδέονται στο σύμπλοκο Hsp70/CHIP. Η TPR περιοχή της CHIP λιγάσης συνδέεται στην COOH-τελική περιοχή της Hsp70 και η U-box περιοχή είναι υπεύθυνη για την ουμπικιτυλίωση των μη διπλωμένων p53 πρωτεϊνών. Η ουμπικιτυλιωμένη p53 πρωτεΐνη αποδομείται από το πρωτεόσωμα.

Η ύπαρξη ενός συμπλόκου μεταξύ των Hsp90, Hsp70 και CHIP, το οποίο ρυθμίζει τη σταθερότητα των διάφορων μεταλλαγμένων p53 πρωτεϊνών βοηθάει την κατανόησή μας σχετικά με την επίδραση της αυξημένης ενεργότητας της Hsp90 κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης. Η επίγνωση του ρόλου αυτών των μορίων στους διάφορους καρκίνους,

αλλά και σε άλλες κυτταρικές διαδικασίες, μπορεί να ανοίξει το δρόμο για τη θεραπεία των ανθρώπινων καρκίνων και άλλων ανωμαλιών, μέσω της στόχευσης της p53 πρωτεΐνης.

#### **1.4.6 Αποδόμηση της p53 από μηχανισμούς ανεξάρτητους από την ουμπικιτυλίωση**

Πέρα από την αποδόμηση της πρωτεΐνης p53 από το 26S πρωτεόσωμα με τη μεσολάβηση της ουμπικιτυλίωσης, η p53 μπορεί να αποδομηθεί από την 20S υπομονάδα του πρωτεοσώματος χωρίς προηγούμενη ουμπικιτυλίωση [176]. Αυτός ο μηχανισμός εξαρτάται από το ένζυμο NQO1 (NAD(P)H Quinone Oxidoreductase 1), που σχετίζεται με το 20S πρωτεόσωμα. Το NQO1 αλληλεπιδρά με την p53 και εμποδίζει την αποδόμησή της από το 20S. Με την εμφάνιση σημάτων λόγω βλάβης του DNA, η σχέση μεταξύ p53 και NQO1 γίνεται πιο δυνατή, σταθεροποιώντας την p53 [304]. Ωστόσο, μηχανισμοί ανεξάρτητοι της ουμπικιτίνης μάλλον κατέχουν μικρή σημασία στη σταθεροποίηση της p53 στα κύτταρα.

#### **1.4.7 Ρύθμιση της θέσης της πρωτεΐνης p53 μες στο κύτταρο**

Εκτός από τη διαδικασία της αποδόμησης, η ενεργότητα της πρωτεΐνης p53 τροποποιείται όταν αλλάζει η θέση της μες στο κύτταρο [305]. Είναι γνωστό ότι η πρωτεΐνη p53 ρυθμίζεται από μηχανισμούς που ρυθμίζουν την είσοδο ή την έξοδο της από τον πυρήνα [306]. Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, η p53 παλινδρομεί από τον πυρήνα όταν το κύτταρο βρίσκεται στη G1 και G1/S φάση προς το κυτταρόπλασμα όταν το κύτταρο βρίσκεται στην S φάση [307]. Υπάρχουν τρία σήματα NLS στην COOH-τελική περιοχή της p53, από τα οποία το πιο δραστικό περιέχει δύο βασικά μοτίβα K305-306 και K316-322 [308]. Στην NH<sub>2</sub>-τελική και στην COOH-τελική περιοχή υπάρχουν δύο σήματα NES (κατάλοιπα αμινοξέων 11-27 και 340-351 αντίστοιχα) που εξαρτώνται από τον υποδοχέα CRM-1 του πυρήνα για έξοδο από αυτόν [309, 310]. Σε πολλές μελέτες φαίνεται ότι η έξοδος της p53 από τον πυρήνα μεσολαβείται κυρίως από το σήμα c-NES [309, 311, 312], που βρίσκεται εντός της OD περιοχής και καλύπτεται όταν η p53 τετραμερίζεται. Η ουμπικιτυλίωση της COOH-τελικής περιοχής εκθέτει το c-NES σήμα, με αποτέλεσμα τον εντοπισμό της p53 στο κυτταρόπλασμα [309, 311, 312].

Όταν τα επίπεδα της Mdm2 είναι χαμηλά, η Mdm2 μονο-ουμπικιτυλιώνει την p53, η οποία στη συνέχεια εξέρχεται από τον πυρήνα [313-315]. Στις μέρες μας επικρατεί το μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η ουμπικιτυλίωση της p53 από την Mdm2 προκαλεί περαιτέρω τροποποιήσεις στην p53 από άλλες E3 λιγάσες, όπως η PIASγ, που οδηγεί σε απελευθέρωση της Mdm2 και έξοδο της p53 από τον πυρήνα [311]. Όμως, η p53 μπορεί να εξέλθει από τον πυρήνα και κατά ένα Mdm2-ανεξάρτητο τρόπο [309].

Επιπρόσθετα, η αλληλεπίδραση της p53 με άλλες πρωτεΐνες απομονώνει την p53 στο κυτταρόπλασμα. Η πρωτεΐνη Parc (λιγάση ουμπικιτίνης που μοιάζει με την Parkin λιγάση) σχηματίζει ένα σταθερό σύμπλοκο μεγέθους 1 MDa με την p53 στο κυτταρόπλασμα [316]. Η Parc παρ' ότι είναι λιγάση, δεν μπορεί να ουμπικιτυλιώσει την p53. Συνδέεται στην COOH-τελική περιοχή της p53, καλύπτει την περιοχή NLS και μπλοκάρει την είσοδό της στον πυρήνα [316]. Η λιγάση WWP1 ουμπικιτυλιώνει την p53 και αυξάνει την εμφάνισή της στο κυτταρόπλασμα, οδηγώντας σε απενεργοποίηση της p53 [265]. Το E2 ένζυμο Ubc13 προωθεί την ουμπικιτυλίωση και τον εντοπισμό της p53 στο κυτταρόπλασμα [124]. Η πρωτεΐνη Mot2, μέλος της οικογένειας των Hsp70 πρωτεϊνών συγκρατεί την p53 στο κυτταρόπλασμα [317]. Επομένως, ο επαναπροσδιορισμός της p53 στο κυτταρόπλασμα αποτελεί ένα μέσο αναστολής της μεταγραφικής ενεργότητας της p53, καθώς την κρατά μακριά από τα γονίδια-στόχους και/ή επάγει την αποδόμησή της από τα πρωτεοσώματα του κυτταροπλάσματος και επιτρέπει τη δράση της στους μηχανισμούς απόπτωσης του κυττάρου [318-320].

### 1.5 Πρωτεόσωμα και γήρανση

Το φαινόμενο της γήρανσης συνοδεύεται από διάφορες μη φυσιολογικές διαδικασίες σχετικά με την αποδόμηση και την πρωτεόλυση, οπότε είναι πολύ πιθανό το πρωτεόσωμα να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του φαινομένου [321, 322]. Οι αλλαγές που υφίσταται ο μηχανισμός του πρωτεοσώματος μπορεί να είναι ποσοτικές (αλλαγές σε επίπεδο πρωτεϊνικής έκφρασης) ή ποιοτικές (αλλαγές σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο), όμως και στις δύο περιπτώσεις το τελικό αποτέλεσμα αντανακλάται κυρίως επάνω στα επίπεδα των πρωτεοσωμικών ενεργοτήτων.

Έχει δειχθεί πως οι τρεις πρωτεολυτικές ενεργότητες (χυμοθρυψίνης, πεπτιδυλο-γλουταμυλο-υδρολάσης και τρυψίνης) του 20S πρωτεοσώματος μειώνονται κατά τη γήρανση διάφορων ιστών [323-325] και κατά την *in vitro* αναδιπλασιαστική γήρανση ανθρώπινων κυττάρων [326, 327]. Αξίζει να σημειωθεί πως όταν το πρωτεόσωμα ενεργοποιηθεί γενετικά μέσω υπερέκφρασης της καταλυτικής β<sub>5</sub> υπομονάδας [328] ή φυσικά μέσω φυτικών ουσιών [329], οι ενεργότητες και τα επίπεδα δομημένου / λειτουργικού πρωτεοσώματος αυξάνονται. Αυτά τα αυξημένα επίπεδα συμβάλλουν στην καθυστέρηση του φαινομένου της γήρανσης. Τα πειραματικά αυτά δεδομένα προτείνουν ότι το πρωτεόσωμα παίζει σπουδαίο ρόλο κατά την εξέλιξη του φαινομένου της γήρανσης, συνεπώς η προβληματική λειτουργικότητα του πρωτεοσώματος πιθανά ευθύνεται εν μέρει για το γηρασμένο φαινότυπο των κυττάρων.



### 1.5.1 Ποσοτικές διαφορές πρωτεοσώματος

Ορισμένες ερευνητικές ομάδες προτείνουν μείωση των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεοσωμικών υπομονάδων και κατ' επέκταση του συνόλου των πρωτεοσωμάτων στα γηρασμένα κύτταρα σε σύγκριση με τα νεαρά. Σύμφωνα με τις ομάδες αυτές, το συνολικό φορτίο των πρωτεοσωμάτων μειώνεται στα γηρασμένα κύτταρα, με αποτέλεσμα το μειωμένο βαθμό των πρωτεοσωμικών ενεργοτήτων [324-326, 330-332].

### 1.5.2 Ποιοτικές διαφορές πρωτεοσώματος

Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχουν αλλαγές στα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεοσωμικών υπομονάδων, παρά το γεγονός ότι δείχνουν μεταβολές στις ενεργότητες ανάμεσα σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα [333-335]. Οι μειωμένες πρωτεοσωμικές ενεργότητες δικαιολογούνται είτε μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που υφίστανται οι πρωτεοσωμικές υπομονάδες [334], είτε μέσω ανασταλτικής δράσης διάφορων παραγόντων, που εμφανίζονται στα γηρασμένα κύτταρα και που δρουν επάνω στις πρωτεοσωμικές ενεργότητες [333, 335-337]. Βέβαια, πρέπει να αναφερθεί η ανομοιογένεια ως προς τα πειραματικά συστήματα που μελετώνται και που μπορεί εν μέρει να δικαιολογήσει τις προαναφερθείσες διαφορές.

#### 1.5.2.1 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Οι Carrard και οι συνεργάτες του (2003) έδειξαν πως οι υπομονάδες των πρωτεοσωμάτων που προέρχονται από λεμφοκύτταρα δοτών από διάφορες ηλικίες παρουσιάζουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις προϊούσης της ηλικίας του δότη [334]. Οι τροποποιήσεις αυτές αφορούν, κατά κύριο λόγο, την οξειδωση, την ουμπικιτυλίωση, τη μη ενζυμική προσθήκη σακχάρων και την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Η σύνδεση των πρωτεοσωμικών υπομονάδων με HNE (4-Hydroxy-2-NonEnal), ένα από τα βασικά προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, οδηγεί πολλές φορές σε διασύνδεση των υπομονάδων μεταξύ τους. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις εμφανίζουν επιλεκτικότητα με βάση την υπομονάδα, αλλά και με βάση την ηλικία του δότη των κυττάρων. Τέτοιου είδους τροποποιήσεις έχουν αναφερθεί και παλαιότερα στη βιβλιογραφία με επίδραση στις πρωτεοσωμικές ενεργότητες τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* [330, 338].

#### 1.5.2.2 Αναστολή ενεργοτήτων μέσω λιποφουσκίνης και τροποποιημένων πρωτεϊνών

Έχει προταθεί πως η λιποφουσκίνη, τα επίπεδα της οποίας αυξάνονται στα γηρασμένα κύτταρα [333] και οι τροποποιημένες πρωτεΐνες (οξειδωμένες, τροποποιημένες με HNE [191]

ή πρωτεΐνες που έχουν διασυνδεθεί μεταξύ τους μέσω HNE (cross-linking by HNE) μπορούν να δράσουν ανασταλτικά επάνω στις πρωτεοσωμικές ενεργότητες και να τις μειώσουν. Συγκεκριμένα, οι οξειδωμένες πρωτεΐνες ενεργούν σαν πρωτεϊνικοί αναστολείς του πρωτεοσώματος απευθείας πάνω στα καταλυτικά του κέντρα και παρεμποδίζουν τη λειτουργία τους [339]. Δεδομένου ότι τέτοιου είδους πρωτεΐνες συσσωρεύονται κατά τη γήρανση [340], θεωρείται αναμενόμενο να παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα πρωτεοσωμικών ενεργοτήτων στα γηρασμένα κύτταρα [190].

### 1.6 p53 και γήρανση

Το θέμα της γήρανσης και της μακροζωίας αποσπούσε πάντα την προσοχή των ανθρώπων πολύ πριν καθιερωθούν οι επιστημονικές μέθοδοι για τη μελέτη του φαινομένου. Όμως, οι επιστήμονες βρέθηκαν πολύ κοντά στην απάντηση των ουσιαστικών ερωτημάτων μόνο πολύ πρόσφατα, όταν άρχισαν να μελετούν τα πρώτα μοντέλα οργανισμών, όπως ο *Caenorhabditis elegans*, η *Drosophila melanogaster* και ο *Saccharomyces cerevisiae*, στην αναζήτηση της βασικής πληροφορίας σχετικά με τη ρύθμιση της διάρκειας της ζωής. Είναι αξιοσημείωτο ότι κάποια από τα κυρίαρχα μονοπάτια έχουν διατηρηθεί από τη ζύμη μέχρι τον άνθρωπο.

Στα κύτταρα των θηλαστικών, η γήρανση που επάγεται από την p53 πρωτεΐνη συμβαίνει είτε όταν τα τελομερή εξαντλούνται, με αποτέλεσμα την αναδιπλασιαστική γήρανση (replicative senescence), είτε έπειτα από επιζήμια κυτταρική βλάβη, όπως είναι η κυτταρική γήρανση που επάγεται από στρες (stress-induced cellular senescence) [28]. Ως γήρανση περιγράφεται η μειωμένη ικανότητα των κυττάρων ή των ιστών να αναγεννούν κατάλληλα τον εαυτό τους και να αποκρίνονται σε διάφορα είδη στρες [341]. Ως μακροζωία χαρακτηρίζεται η ικανότητα της καθυστέρησης των συνεπειών της γήρανσης και η αύξηση της διάρκειας της ζωής πάνω από τα όρια που τυπικά απαντώνται σε ένα συγκεκριμένο είδος. Από την άποψη της εξέλιξης, για έναν οργανισμό είναι σημαντικό να ζει αρκετά, ώστε να αναπαράγει τον εαυτό του και να διευκολύνει την επιβίωση των γονιδίων του.

Η πρωτεΐνη p53 είναι πλέον γνωστό ότι παίζει ρόλο-κλειδί σε διάφορες διαδικασίες, όπως η απόκριση στο κυτταρικό στρες, η απόπτωση, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και η γήρανση. Επιπλέον, μαζί με τα άλλα μέλη της p53 οικογένειας, p63 και p73, έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των πολυκύτταρων οργανισμών. Πρόσφατα, διατυπώθηκε η κεντρική λειτουργία της πρωτεΐνης p53 στη γήρανση των οργανισμών [342]. Φυσικά, η λειτουργία της p53 πρέπει να εξηγηθεί μέσα από το πολύπλοκο δίκτυο των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά [343-346].

Για να διευκρινιστεί η επίδραση της p53 στη γήρανση των κυττάρων και των οργανισμών, έχουν διεξαχθεί πολυάριθμα *in vivo* πειράματα. Δυστυχώς, όμως, δε δίνουν το αναμενόμενο αποτέλεσμα, καθώς ποντίκια που δεν έχουν το p53 γονίδιο (p53 knock-out mice) εκδηλώνουν γενωμική αστάθεια, υποκύπτουν νωρίς σε νεοπλασίες και εμφανίζουν καρκίνο [347]. Από την άλλη πλευρά, γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που υπερεκφράζουν την p53 πρωτεΐνη πεθαίνουν νωρίς κατά την εμβρυική ανάπτυξη, εξαιτίας υπερβολικής απόπτωσης σε συγκεκριμένους ιστούς. Μία άλλη μελέτη αναφέρει μία μεταλλαγμένη κυτταρική σειρά ποντικού που εκφράζει μία παραλλαγή της p53 πρωτεΐνης, ευαίσθητη στη θερμοκρασία (temperature sensitive, ts), με μία υποκατάσταση από αλανίνη σε βαλίνη στη θέση 135 [348]. Αυτή η υποκατάσταση βοήθησε την πρωτεΐνη να μετατρέπεται από τη φυσικού τύπου (wt) (32°C) στη μεταλλαγμένη διαμόρφωση (37°C) και αντίστροφα, ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Έτσι, τα ποντίκια εμφάνισαν πρόωρη γήρανση στους ιστούς του ζώου που εκτίθονταν σε χαμηλή θερμοκρασία περιβάλλοντος (π.χ. δέρμα). Αυτό το απροσδόκητο αποτέλεσμα εξηγείται από το γεγονός ότι η p53 παραλλαγή βρίσκεται στη μη φυσιολογική μεταλλαγμένη διαμόρφωση σε κεντρικές περιοχές του ζώου, ενώ υιοθετεί τη wt μορφή σε πιο κρύα μέρη κοντά στην επιφάνεια του ζώου [348]. Πολλές άλλες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση μεταλλαγμένων αλληλόμορφων p53, προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος της p53 στο φαινόμενο της γήρανσης [349].

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι εναλλακτικό μάτισμα που συμβαίνει στο ανθρώπινο γονίδιο p53 δίνει διάφορες ισομορφές της πρωτεΐνης p53 [350, 351]. Αντίστοιχα, στον ποντικό, το εναλλακτικό μάτισμα αλλάζει το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης p53 [352]. Μέχρι το 2005, αυτές οι παρατηρήσεις δεν είχαν αξιολογηθεί σημαντικά. Μετέπειτα μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε πιο ευαίσθητη και σύγχρονη μεθοδολογία, αποκάλυψαν την ύπαρξη 8 ισομορφών της πρωτεΐνης p53, η ακριβής λειτουργία των οποίων παραμένει ακόμα άγνωστη [107, 353-355].

Πρόσφατα, μία μικρού μήκους ισομορφή της πρωτεΐνης p53 περιγράφηκε από δύο ανεξάρτητες μεταξύ τους ομάδες [353, 356], οι οποίες εστίασαν στη μελέτη της λειτουργίας της. Η πρωτεΐνη αυτή είχε προηγουμένα ανιχνευθεί στα Balb/c ποντίκια [357], αλλά δεν απέκτησε την απαιτούμενη προσοχή, παρόλο που βρέθηκε ότι σχετίζεται με την εμφάνιση όγκου στα ποντίκια. Η ισομορφή αυτή, που ορίστηκε ως p44 στον ποντικό και ως DNp53/DeltaNp53 στον άνθρωπο, εκφράζεται σε διάφορα κύτταρα και ιστούς και οδηγεί σε αυξημένη ενεργότητα και σταθεροποίηση της p53 [353]. Επιπλέον, παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την p53 m, το προϊόν από ένα κομμένο γονίδιο p53 που εκφράζει μόνο τα πέντε εξόνια που κωδικοποιούν για το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης, αλλά δεν

περιέχει τα έξι εξώνια στο 5' άκρο. Αυτή η ισομορφή προκύπτει μέσω έναρξης της μετάφρασης σε ένα εσωτερικό κωδικόνιο έναρξης AUG στη θέση 40 στον άνθρωπο ή 41 στον ποντικό κατ' αναλογία με την πλήρη πρωτεΐνη [348, 349].

Ο Yin και οι συνεργάτες του (2002) απέδειξαν ότι η μεταγραφή του γονιδίου p53 ρυθμίζεται από τη λιγάση Mdm2 μέσω εναλλακτικών θέσεων έναρξης, με αποτέλεσμα την παραγωγή τόσο της p53 όσο και της p44, η οποία δεν περιέχει την περιοχή σύνδεσης με την Mdm2 και την αμινοτελική μεταγραφική περιοχή. Η Mdm2 συνδέεται με το νεοσχηματισθέν πολυπεπτιδίο p53 και ακολουθεί αποδόμηση της πλήρους πρωτεΐνης p53, τείνοντας την ισορροπία προς την πρωτεΐνη p44 [356].

Αξίζει να αναφερθεί ότι η μικρή ισομορφή μοιάζει σε μεγάλο βαθμό με τις πρωτόγονες ισομορφές p53 που συναντώνται στους κατώτερους οργανισμούς, προτείνοντας ότι τα χαρακτηριστικά της p53 που οφείλονται στο αμινοτελικό τμήμα αποκτήθηκαν αργότερα κατά την εξέλιξη. Το πιο σημαντικό είναι ότι τα δύο άλλα μέλη της p53 οικογένειας, p63 και p73, εκφράζονται ως διάφορες ισομορφές που επίσης δεν έχουν το αμινοτελικό τμήμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι μεγαλύτερες ισομορφές έχουν παρόμοιες λειτουργίες με την πλήρη πρωτεΐνη p53, ενώ οι ισομορφές DNp63 και DNp73 εξουδετερώνουν αυτές τις δραστηριότητες. Γενικά, θεωρείται ότι οι μικρές ισομορφές μπορούν είτε να εξουδετερώνουν είτε να βελτιώνουν την ενεργότητα της πρωτεΐνης ανάλογα με το περιβάλλον [349].

Η έκφραση των μικρών ισομορφών p53 φαίνεται ότι ρυθμίζεται τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο μετάφρασης [358]. Η πρωτεΐνη DNp53, για παράδειγμα, μπορεί να μεταφραστεί από ένα κομμένο μετάγραφο p53 (p53EII) [359]. Εντούτοις, έχει δειχθεί ότι η έκφραση της DNp53 πρωτεΐνης ρυθμίζεται πρωταρχικά σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Γενικότερα, η επιμόλυνση κυτταρικών σειρών ποντικού που δεν περιέχουν το γονίδιο p53, οδηγεί στην έκφραση ισομορφών, τόσο κομμένων όσο και πλήρους μεγέθους [353, 360].

Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η πρωτεΐνη p53 είναι ικανή να ρυθμίζει τη δική της μετάφραση μέσω σύνδεσης στο 5'-UTR του δικού της mRNA [361]. Μόνο, όμως, η ολόκληρη πρωτεΐνη p53 μπορεί να προσαρμόζει αυτήν την mRNA σύνδεση, καθώς το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης που λείπει από την DN ισομορφή είναι υποχρεωτικό για αυτήν την αλληλεπίδραση [361]. Μία περίπτωση της κομμένης ισομορφής p53 (p44) στο κύτταρο φαίνεται ότι μειώνει την ικανότητα της πλήρους ισομορφής (p53) να μεταγράφει τα περισσότερα από τα γονίδια στόχους της [353, 356], τη στιγμή που ένα μέτριο επίπεδο της μικρής πρωτεΐνης ενισχύει το μεταγραφικό δυναμικό της μακρύτερης ισομορφής [349]. Έχει, ακόμα, αναφερθεί ότι αυξημένα επίπεδα DNp53 προκαλούν μία πρωταρχική κυτταροπλασματική μετατόπιση της ολόκληρης p53, οπότε εμποδίζουν τις μεταγραφικές

ιδιότητες και άλλες πυρηνικές λειτουργίες της πρωτεΐνης. Επομένως, η μικρού μήκους ισομορφή θα μπορούσε να επηρεάσει τις κυτταροπλασματικές ιδιότητες της p53 (πχ. απελευθέρωση του κυτοχρώματος c), εμποδίζοντας τελικά τις προ-αποπτωτικές της ιδιότητες [358, 362].

Υπάρχουν, πλέον, αρκετά δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι υψηλά επίπεδα της αγρίου-τύπου πρωτεΐνης p53 μπορούν, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, να προστατεύσουν τα ποντίκια έναντι του καρκίνου και της γήρανσης. Το γεγονός αυτό ενθαρρύνει το μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο αυξημένα επίπεδα p53 προστατεύουν τους οργανισμούς από νεοπλασίες και μετασχηματισμούς, χωρίς την ανεπιθύμητη εμφάνιση της πρόιμης γήρανσης. Πρόσφατα, μία ομάδα Ισπανών επιστημόνων δημιούργησε ένα νέο διαγονιδιακό ποντίκι, το οποίο ονόμασαν «super p53» [363]. Το ποντίκι αυτό παράγει αγρίου-τύπου p53 από τα δύο φυσιολογικά αλληλόμορφα που υπάρχουν στο γονιδίωμα, παρόμοια με το κανονικό ποντίκι. Επιπλέον, όμως, περιέχει ένα ή δύο αντίγραφα ενός πρόσθετου γονιδίου p53, αγρίου-τύπου, που εισήχθη ως διαγονίδιο. Τα πρόσθετα αντίγραφα εκφράζονται από το φυσιολογικό υποκινητή έτσι, ώστε τόσο το διαγονίδιο όσο και το ενδογενές γονίδιο να ρυθμίζονται κατά τον ίδιο τρόπο. Τα «super p53» ποντίκια είναι πιο ευαίσθητα σε βλάβη του DNA, καθώς τα υψηλά επίπεδα p53 οδηγούν σε αυξημένο ρυθμό απόπτωσης. Αντίθετα, προστατεύονται πιο αποτελεσματικά από χημικά επαγόμενους καρκίνους. Το αξιοσημείωτο είναι ότι τα «super p53» ποντίκια δε φέρουν κανένα σημάδι επιταχυνόμενης γήρανσης, πιθανά διότι το διαγονιδιακά εκφραζόμενο p53 ρυθμίζεται από το φυσιολογικό υποκινητή και επομένως, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 εκφράζεται όπως ακριβώς απαιτείται στο φυσιολογικό κυτταρικό περιβάλλον. Αυτή η πληροφορία ίσως αποτελεί την πρώτη απόδειξη για την ισχύ της ιδέας ότι η προστασία των κυττάρων έναντι των νεοπλασιών μπορεί να επιτευχθεί με την εισαγωγή των σωστών ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε προγονικά στελεχιαία κύτταρα.

Το ερώτημα που προκύπτει είναι γιατί η αυξημένη ενεργότητα της p53 οδηγεί σε πρόωρη γήρανση και σε μειωμένη διάρκεια ζωής των θηλαστικών. Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι η ενισχυμένη ενεργότητα της p53 πρωτεΐνης επάγει απόπτωση και παύση του κυτταρικού κύκλου, διαδικασίες που εξαντλούν τις δυνάμεις των οργανισμών να αναγεννήσουν συγκεκριμένους ιστούς και όργανα.

Η μικρού μήκους ισομορφή της p53 (p44/ $\Delta$ Np53) φαίνεται ότι επηρεάζει σημαντικά την εμφάνιση της γήρανσης και το μέγεθος του σώματος των θηλαστικών, καθώς αλλάζει την ικανότητα της κανονικού μεγέθους πρωτεΐνης p53 να λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας. Αυτό έχει αντίκτυπο στη σηματοδότηση από το μονοπάτι IGF (insulin-like growth factor), το οποίο διαφοροποιείται και προκαλεί την εμφάνιση πρώιμα γηρασμένου

φαινοτύπου [349]. Διάφορες μελέτες εμπλέκουν το μονοπάτι insulin/IGF1 στη ρύθμιση της γήρανσης [364, 365]. Ποια είναι, όμως, η σχέση μεταξύ p53, p44/ΔNp53, insulin/IGF1 και γήρανσης; Πριν από δύο δεκαετίες, η μικρή ισομορφή p53 παρουσιαζόταν ως καταστολέας της αύξησης παρουσία της πλήρους μεγέθους ισομορφής [357, 366], ενώ απουσία του μακρύτερου ομόλογού της ως ογκογενετική [367]. Όταν η ισορροπία των δύο ισομορφών p53 διαταράσσεται από την υπερέκφραση της p44/ΔNp53, η καταστολή της αύξησης που μεσολαβείται από την κομμένη πρωτεΐνη οδηγεί σε μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού, μικρό μέγεθος σώματος, κυτταρική γήρανση, μη φυσιολογική σηματοδότηση IGF και τελικά, σε πρόωμη γήρανση του οργανισμού [349].

Επομένως, διαγονιδιακά ποντίκια που σταθερά υπερεκφράζουν την p44 εμφανίζουν μειωμένο προσδόκιμο ζωής, πρόωμη στειρότητα (ειδικά τα αρσενικά ποντίκια) και σημάδια πρόωμης γήρανσης, όπως λорδοκύφωση από τον πέμπτο κιόλας μήνα και αισθητά μειωμένη οστική πυκνότητα. Απουσία της p53, η υπερέκφραση της p44 δεν έχει καμία επίδραση στο μέγεθος των ζώων, δεικνύοντας ότι η πλήρους μεγέθους p53 απαιτείται για την καταστολή της αύξησης σε επίπεδο κυττάρου και οργανισμού [349]. Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι το μονοπάτι της ινσουλίνης (insulin/IGF1) επηρεάζεται από την αύξηση της p44. Τα κύτταρα που απομονώνονται από τα p44 διαγονιδιακά ποντίκια εκφράζουν υψηλά επίπεδα από ορισμένες πρωτεΐνες, όπως ο υποδοχέας IGF1, η ενεργοποιημένη Akt, η φωσφορυλιωμένη p53 στη σερίνη 15, αλλά και οι δύο κύριοι μεταγραφικοί στόχοι της p53, Mdm2 και p21. Για όλα αυτά τα αποτελέσματα, απαιτείται η παρουσία της πλήρους πρωτεΐνης p53 [349].

Είναι δεδομένο, λοιπόν, ότι η p53 είναι υπεύθυνη για την επαγωγή και τη διατήρηση του γηρασμένου φαινοτύπου [368], αλλά σε περίπτωση απώλειας της p53 μόνο τα υψηλά επίπεδα του αναστολέα p16<sup>Ink4a</sup> είναι ικανά να κάνουν τη διαδικασία μη αντιστρεπτή. Εάν τα επίπεδα της p16 δεν είναι ικανοποιητικά υψηλά, ο γηρασμένος φαινότυπος πιθανά μπορεί να αντιστραφεί [369]. Επιπρόσθετα, η αυξημένη έκφραση της p16 έχει περιγραφεί ως δείκτης γήρανσης σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές ποντικών [370]. Σε μία σειρά πρόσφατων μελετών έχει δειχθεί το αντίκτυπο της p16 στα αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα [371], στα παγκρεατικά κύτταρα [372] και στα εγκεφαλικά κύτταρα [373]. Είναι προφανές ότι οι ογκοκατασταλτικές ιδιότητες της p53 εν μέρει εκτελούνται μέσω της επαγωγής της κυτταρικής γήρανσης και κατ' επέκταση της γήρανσης των οργανισμών [374, 375]. Παρόλ' αυτά, ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου η p53 και τα άλλα μέλη της οικογένειας επηρεάζουν τη γήρανση και τη μακροβιότητα βρίσκεται υπό συνεχή συζήτηση [376-379].

## 2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Υλικά

Τα πλαστικά αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν στην κυτταροκαλλιέργεια (φλάσκες, falcon, σωληνάρια universal, πιάτα 6 πηγαδιών, πιπέτες / αναρροφητήρια, ξύστρες) είναι της εταιρείας Sarstedt Ltd (Leicester, UK). Τα τρυβλία Petri είναι της εταιρείας Bioline Ltd (London, UK) και τα πλαστικά φιαλίδια κατάψυξης των κυττάρων είναι της εταιρείας Corning (Corning, NY). Τα θρεπτικά υλικά της κυτταροκαλλιέργειας (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM), ο ορρός εμβρύου βοός, τα μη απαραίτητα αμινοξέα, η γλουταμίνη, το διάλυμα των φωσφορικών αλάτων (PBS), το TRIzol® και τα αντιδραστήρια για το συμβατικό PCR είναι της εταιρείας Invitrogen Ltd (Carlsbad, CA, USA). Τα στερεά αντιδραστήρια για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών των βακτηρίων είναι των εταιρειών Difco (Detroit, MI, USA) και AppliChem (Darmstadt, Germany).

Το αντιδραστήριο Bradford, οι κυβέττες, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, το Quantum Prep™ Plasmid Midiprep Kit, τα iScript™ cDNA Synthesis και iQ™ SYBR Green Supermix Kit είναι της εταιρείας Bio-Rad Laboratories Inc (CA, USA). Το PIERCE ECL Western Blotting Substrate kit είναι της εταιρείας Pierce (Rockford, IL). Οι Prestained Protein Ladders είναι των εταιρειών Fermentas (St. Leon-Rot, Germany) και Invitrogen Ltd (Carlsbad, CA, USA), ενώ ο Low Molecular Weight DNA Ladder είναι της εταιρείας Bio-Labs (Boston, MA, U.S.A.). Τα πρωτογενή αντισώματα έναντι των p53 (sc126; 53 kDa), Mdm2 (sc965; 90 kDa), Hsp90 (sc1055; 90 kDa), Hsp70 (sc1060; 70 kDa), Hsp40 (sc28845; 40 kDa), Lamin A/C (sc-20681; 69/62 kDa),  $\alpha$ -tubulin (sc8035; 52 kDa), c-Myc (sc40; 62 kDa), Skp2 (sc-7164; 45 kDa), Rbx1 (sc-5200; 17 kDa), Bag1 (sc-939; 32 kDa), HA (sc-805), p16 (sc467; 16 kDa), p21 (sc817; 21 kDa), UBE2D (sc15000; 17 kDa), της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεύδης GAPDH (sc25778; 37 kDa), καθώς και τα δευτερογενή αντισώματα, οι φυσιολογικοί ορροί (IgGs), τα πρωτεΐνη A-σωματίδια αγαρόζης (protein A-agarose) και πρωτεΐνη G-σωματίδια αγαρόζης (protein G-agarose) είναι της εταιρείας Santa Cruz Biotechnology Inc (CA, USA). Τα πρωτογενή αντισώματα έναντι των πρωτεοσωμικών υπομονάδων  $\beta_1$  (PW8140; 29 kDa),  $\beta_2$  (PW8145; 28 kDa) και  $\beta_5$  (PW8895; 23 kDa) είναι της εταιρείας BIOMOL Research Products Ltd (Exeter, UK), ενώ των λιγασών CHIP (ab2917; 35 kDa) είναι της εταιρείας Abcam Plc (Cambridge, UK), Pirh2 (A300-357A; 32 kDa) της Bethyl Laboratories Inc (Montgomery, USA), TOPORS (H00010210-A01; 38 kDa) της Abnova Corporation (Taipei, Taiwan), Skp1 (32-3800; 19

kDa) και Cul-1 (32-2400; 84 kDa) της Zymed (San Francisco, California, USA) και COP1 (4466; 84 kDa) της Genentech Ltd (South San Francisco, CA). Το πρωτογενές αντίσωμα έναντι της αιμαγλουτινίνης HA (12CA5) είναι της εταιρείας Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

Οι πρωτεοσωμικοί αναστολείς, MG132 και εποξομισίνη, τα φλουροοπεπτίδια για τη μέτρηση των πρωτεοσωμικών ενεργοτήτων και τα αντισώματα έναντι των πρωτεοσωμικών υπομονάδων είναι της εταιρείας BIOMOL Research Products Ltd (Exeter, UK). Ο αναστολέας Nutlin-3 είναι της εταιρείας Sigma Aldrich Inc (St. Louis, MO, USA) και ο αναστολέας 17AAG της εταιρείας Calbiochem-Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Η επιμόλυνση των κυττάρων έγινε χρησιμοποιώντας το Effectene kit της Qiagen (Valencia, CA, USA) και τη Lipofectamine 2000 της Invitrogen Ltd (Carlsbad, CA, USA). Τα ολιγονουκλεοτίδια για την αποσιώπηση των γονιδίων CHIP και Mdm2 είναι της εταιρείας Dharmacon (Lafayette, CO, USA). Η τετρακυκλίνη είναι της εταιρείας Clontech Inc (Saint-Germain-en-Laye, France). Για την απομόνωση των κυτταροπλασματικών και των πυρηνικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε το ειδικό kit της εταιρείας Active Motif. Το Oxyblot™ Protein Oxidation Detection Kit είναι της εταιρείας Chemicon International (Temecula, CA). Η παραγωγή των εκκινητών για το συμβατικό PCR, αλλά και για το Real-Time PCR έγιναν από την MWG-Biotech (Ebersberg, Germany). Τα διάφορα χημικά αντιδραστήρια (αλάτια, διαλύτες, κλπ.) είναι των εταιρειών BDH Chemicals Ltd. (Poole, England), Fluka Chemie (Buchs, Switzerland), Sigma (St. Louis, MO, USA) και Scharlau (Barcelona, Spain).

Το όχημα έκφρασης που περιέχει το cDNA για τη β5 πρωτεοσωμική υπομονάδα (πλασμίδιο pBJ1-neo.subunit β5) προσφέρθηκε από το Δρ. K. Tanaka. Το πλασμίδιο pcDNA3.1/Myc-His-CHIP που περιέχει το cDNA για την ανθρώπινη CHIP λιγάση προσφέρθηκε από το Δρ. C. Patterson, ενώ το πλασμίδιο pMT123, το οποίο περιέχει 8 επαναλήψεις ουμπικιτίνης σημασμένης με αιμαγλουτινίνη από το Δρ. W. Zwerschke.

## 2.2 Μέθοδοι

Τα πρωτόκολλα μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν μπορούν να βρεθούν στα βιβλία:

- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Harlow E and Lane D (1999) Using antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.



### 2.2.1 Κυτταροκαλλιέργεια

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. Φυσιολογικοί εμβρυϊκοί ανθρώπινοι ινοβλάστες πνεύμονα, HFL-1, οι οποίοι αγοράστηκαν από την Ευρωπαϊκή Συλλογή Κυτταροκαλλιεργειών (European Collection of Cell Cultures).
2. Αθανατοποιημένοι ανθρώπινοι ινοβλάστες (WI38/T) [380].
3. Φυσιολογικοί και αθανατοποιημένοι ινοβλάστες ποντικού (MEFs, mouse embryonic fibroblasts) που διαθέτουν (άγριου-τύπου, wt) ή όχι (CHIP knock-out) το γονίδιο που κωδικοποιεί την CHIP λιγάση (προσφέρθηκαν από το Δρ. C. Patterson).
4. Ινοβλάστες Li-Fraumeni που εκφράζουν υπό συνθήκη, μέσω ενός συστήματος Tet<sup>off</sup>, την πρωτεΐνη p53.

- **Ανακαλλιέργεια**

Όλες οι κυτταρικές σειρές και τα πρωτογενή κύτταρα διατηρήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Forma) σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> και σχετική υγρασία 95%. Καλλιεργήθηκαν σε πλήρες μέσο καλλιέργειας DMEM στο οποίο είχαν προστεθεί 10% (v/v) ορός εμβρύου βοός, 2 mM γλουταμίνη και 1% (v/v) μη απαραίτητα αμινοξέα. Η κυτταροκαλλιέργεια όλων των κυττάρων πραγματοποιήθηκε όπως έχει ήδη περιγραφεί από τους Hayflick και Moorhead [4]. Συνοπτικά, το υγρό καλλιέργειας ανανεώνεται δύο φορές εβδομαδιαίως. Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 80% της επιφάνειας της φλάσκας ή είναι αναγκαίο να χωρισθούν σε συγκεκριμένες αραιώσεις, τότε ανακαλλιεργούνται. Πλένονται με διάλυμα PBS (διάλυμα φωσφορικών αλάτων) και επωάζονται στους 37°C για 1 λεπτό παρουσία θρυψίνης. Αφού προστεθεί θρεπτικό υλικό προκειμένου να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη, τα αποκολλημένα κύτταρα φυγοκεντρώνται (1500 rpm, 5 λεπτά, 4°C). Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε θρεπτικό υλικό και μετά τη μέτρησή τους τοποθετούνται σε καινούριες φλάσκες ανάλογα με την απαιτούμενη συγκέντρωση και αραιώση αυτών.

Για τα φυσιολογικά κύτταρα που πραγματοποιούν συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, προτού φτάσουν στο σημείο της μη αντιστρεπτής παύσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (αναδιπλασιαστική γήρανση, replicative senescence), μία αραιώση 1:2 ισοδυναμεί με έναν κύκλο διπλασιασμού. Για τους ανθρώπινους εμβρυϊκούς ινοβλάστες HFL-1, ως νεαρά *in vitro* κύτταρα θεωρούνται αυτά που βρίσκονται σε CPD < 40 και ως γηρασμένα τα κύτταρα που βρίσκονται σε CPD > 58 (όπου cpd είναι ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων στην καλλιέργεια, cell population doubling). Για τα ανθρώπινα

(WI38/T) και ποντικίσια (MEFs) αθανатоποιημένα κύτταρα δεν υπολογίζονται κυτταρικοί διπλασιασμοί, εφόσον αυτές οι κυτταρικές σειρές είναι αθάνατες.

Οι ινοβλάστες MDAH041 φυσιολογικά δεν περιέχουν λειτουργική πρωτεΐνη p53 (p53-null). Τα κύτταρα αυτά, που απομονώνονται από ασθενείς με σύνδρομο Li-Fraumeni, εάν επιμολυνθούν σταθερά με το ανθρώπινο cDNA της αγρίου-τύπου p53 πρωτεΐνης, δημιουργούν κλώνους TR9-7. Οι κλώνοι αυτοί, μέσω ενός συστήματος Tet<sup>off</sup>, παρουσία τετρακυκλίνης εκφράζουν την πρωτεΐνη p53 σε πολύ χαμηλά επίπεδα, τα οποία είναι ανεπαρκή για την επαγωγή του γονιδίου στόχου p21<sup>Waf1</sup> και την περαιτέρω παύση του κυτταρικού κύκλου. Η απομάκρυνση της τετρακυκλίνης από το μέσο καλλιέργειας επιτρέπει την έκφραση της p53 πρωτεΐνης, αλλά και των γονιδίων στόχων της [381], γεγονός το οποίο τελικά μπορεί να οδηγήσει σε παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Ο αριθμός διπλασιασμού του κυτταρικού πληθυσμού προσδιορίζεται με βάση το μαθηματικό τύπο:  $\log N / \log 2$ , όπου N ο αριθμός των κυττάρων σε μία πλήρη καλλιέργεια διαιρούμενος με τον αρχικό αριθμό των κυττάρων που τοποθετήθηκαν στη φλάσκα. Οι μετρήσεις των κυττάρων πραγματοποιούνται σε τρία δείγματα με τη βοήθεια μετρητή κυττάρων Coulter Z2 Counter (Coulter Corporation) και οι τιμές παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος αυτών των τιμών  $\pm$  την τυπική απόκλιση (standard deviation, SD), που υπολογίζεται με τη βοήθεια του Microsoft Excel.

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### Πλήρες μέσο καλλιέργειας

Υγρό καλλιέργειας DMEM στο οποίο έχει προστεθεί:

10% (v/v) ορός εμβρύου βοός (για την παροχή των απαραίτητων αυξητικών παραγόντων)

2 mM γλουταμίνη

1% (v/v) μη απαραίτητα αμινοξέα

### Διάλυμα PBS

10x PBS σε απεσταγμένο νερό προκειμένου να γίνει 1x

### Διάλυμα θρυψινοποίησης

1% (v/v) θρυψίνη σε διάλυμα PBS / 0,02% αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό EDTA (ethylene-diaminetetra-acetate)

### • Κατάψυξη και Απόψυξη Κυττάρων

Για μακροχρόνια αποθήκευση των κυτταρικών σειρών και των πρωτογενών κυττάρων, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται, συλλέγονται μετά από φυγοκέντρηση, επαναιωρούνται σε υγρό

κατάψυξης και μεταφέρονται σε πλαστικά φιαλίδια (ampoules, Corning). Έπειτα από σταδιακή ψύξη ( $-20^{\circ}\text{C}$  για 2 ώρες και  $-80^{\circ}\text{C}$  για  $> 16$  ώρες) αποθηκεύονται σε δοχεία υγρού αζώτου. Αντίθετα, η διαδικασία απόψυξης γίνεται γρήγορα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $37^{\circ}\text{C}$ . Το περιεχόμενο του πλαστικού φιαλιδίου αραιώνεται σε 5 ml θεραπευτικού υλικού και φυγοκεντρείται (1500 rpm, 5 λεπτά). Μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 10 ml θεραπευτικού υλικού και μεταφέρονται σε φλάσκες καλλιέργειας.

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### Υγρό κατάψυξης κυττάρων

40% (v/v) πλήρες θεραπευτικό υλικό

50% (v/v) ορρός εμβρύου βοός

10% (v/v) dimethyl sulphoxide (DMSO)

Φυλάσσεται στους  $4^{\circ}\text{C}$  και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για 1 μήνα από την ημέρα παρασκευής του.

### 2.2.2 Επίδραση κυττάρων με αναστολείς

Νεαρά ή/και γηρασμένα HFL-1 κύτταρα δέχτηκαν την επίδραση των υπό μελέτη αναστολέων. Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής: οι πρωτεοσωμικοί αναστολείς MG132 και εποξομισίνη, ο ειδικός αναστολέας Nutlin-3a της αλληλεπίδρασης p53-Mdm2 και ο αναστολέας 17AAG της ενεργότητας της Hsp90 πρωτεΐνης. Ειδικότερα, ο MG132 είναι ένα συνθετικό ανάλογο λευπεπτίνης, προσδένεται ανταγωνιστικά πάνω στο ενεργό κέντρο χυμοθρυψίνης και προκαλεί αντιστρεπτή αναστολή του πρωτεοσώματος. Η εποξομισίνη παράγεται από ακτινομύκητες και προκαλεί μη αντιστρεπτή αναστολή του πρωτεοσώματος, καθώς προσδένεται πάνω στα ενεργά κέντρα και τα τροποποιεί μόνιμα.

Οι συγκεντρώσεις των αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 20 nM εποξομισίνη, ποσότητα που προκαλεί μερική αναστολή του πρωτεοσώματος, 20  $\mu\text{M}$  MG132, ποσότητα που προκαλεί πλήρη αναστολή του πρωτεοσώματος, 10  $\mu\text{M}$  Nutlin-3a και 4  $\mu\text{M}$  17AAG. Όλοι οι αναστολείς ήταν διαλυμένοι σε DMSO. Παράλληλα, υπήρχαν και κύτταρα-μάρτυρες που καλλιεργήθηκαν απουσία αναστολέων, αλλά εκτίθονταν στο διαλύτη των αναστολέων DMSO για το ίδιο χρονικό διάστημα. Συνοπτικά, η διαδικασία επίδρασης των κυττάρων με τους αναστολείς ήταν η εξής:

Στην περίπτωση της εποξομισίνης:  $2 \times 10^5$  κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία petri με πλήρες μέσο καλλιέργειας και 24 ώρες μετά, προστέθηκαν σε αυτά 20 nM αναστολέα. Πραγματοποιήθηκε συνεχόμενη αγωγή του αναστολέα στα κύτταρα για 4 ημέρες, μία

διαδικασία που οδηγεί σε πρόωρα επαγόμενη κυτταρική γήρανση λόγω αναστολής του πρωτεοσώματος, όπως έχει προηγούμενα δειχθεί [327]. Ο αναστολέας ανανεωνόταν καθημερινά, προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανή απενεργοποίησή του λόγω συνεχούς παραμονής του στους 37°C. Σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία προστέθηκε ίσος όγκος DMSO, που αποτελεί το διαλύτη του αναστολέα.

Στην περίπτωση των υπόλοιπων αναστολέων:  $4 \times 10^5$  κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία petri με πλήρες μέσο καλλιέργειας και 24 ώρες μετά, προστέθηκαν σε αυτά 10  $\mu$ M Nutlin-3 ή 4  $\mu$ M 17AAG για 24 ώρες και/ή 20  $\mu$ M MG132 για 6 ώρες. Σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία προστέθηκε ίσος όγκος DMSO, που αποτελεί το διαλύτη του αναστολέα.

Ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων, μέτρηση των ενεργοτήτων του πρωτεοσώματος, καθώς και εκχύλιση πρωτεϊνών.

### 2.2.3 Καλλιέργεια κυττάρων παρουσία παραγόντων οξειδωτικού στρες

$4 \times 10^5$  φυσιολογικοί ανθρώπινοι εμβρυικοί ινοβλάστες HFL-1 επιστρώθηκαν σε τρυβλία petri και καλλιεργήθηκαν παρουσία των παραγόντων οξειδωτικού στρες και συγκεκριμένα, με 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 20 ώρες ή με 0,1 mM FeCl<sub>3</sub> (παρουσία 0,5 mM ADP / 25 mM L-ασκορβικού οξέος) για 2,5 ώρες.

### 2.2.4 Χρώση β-γαλακτοσιδάσης

Μέχρι σήμερα, ο καλύτερος δείκτης για την *in situ* ανίχνευση του φαινοτύπου της γήρανσης θεωρείται ότι είναι η χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης [18]. Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση της λυσοσωμικής β-γαλακτοσιδάσης σε pH 6.0 στα γηρασμένα κύτταρα, αν και το βέλτιστο pH στο οποίο λειτουργεί είναι 4.0 [382]. Στα γηρασμένα κύτταρα, ο αριθμός και το μέγεθος των λυσοσωμάτων αυξάνει, οπότε είναι δυνατή η ανίχνευση του ενζύμου. Αντίθετα, στα νεαρά κύτταρα που ο αριθμός και το μέγεθος των λυσοσωμάτων είναι μειωμένος, δεν είναι ανιχνεύσιμα τα επίπεδα της ενεργότητας του ενζύμου σε pH 6.0. Συνοπτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

- ✓  $1.5 \times 10^5$  κύτταρα τοποθετούνται σε μικρά τρυβλία.
- ✓ 24 ώρες μετά, μονιμοποιούνται (διάλυμα μονιμοποίησης) για 5 λεπτά.
- ✓ Ακολουθεί επώαση για 24 ώρες στους 37°C παρουσία του διαλύματος χρώσης SA-β-γαλακτοσιδάσης και απουσία CO<sub>2</sub> (σε επωαστήρα χωρίς παροχή CO<sub>2</sub>).
- ✓ Τα κύτταρα πλένονται με διάλυμα PBS και καταμετρούνται αυτά που δίνουν θετική χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης. Η χρώση εκφράζεται ως μπλε χρώμα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων που φέρουν την ενεργότητα του ενζύμου.

**ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ****Διάλυμα μονιμοποίησης των κυττάρων**

0.2% (v/v) γλουταραλδεΰδη

2% (v/v) φορμαλδεΰδη

**Διάλυμα χρώσης SA-β-γαλακτοσιδάσης**

150 mM NaCl

2 mM MgCl<sub>2</sub>

5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>

40 mM C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>

12 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.0

1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside (X-gal)

Το διάλυμα παρασκευάζεται ακριβώς πριν από τη χρήση του.

**X-gal solution (2% w/v)**

X-gal διαλύεται σε διμεθυλ-φορμαμίδιο σε συγκέντρωση 20mg/ml

Το διάλυμα διατηρείται στους -20°C σε σκοτεινό μπουκάλι, καθώς είναι φωτοευαίσθητο.

**2.2.5 Απομόνωση RNA**

Η απομόνωση ολικού RNA έγινε με τη μέθοδο TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen Ltd) και το RNA που απομονώθηκε, αποθηκεύτηκε στους -80°C. Το TRIZOL είναι ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης, το οποίο διατηρεί την ακεραιότητα του RNA, ενώ διαταράσσει τα κύτταρα και διαλυτοποιεί τα κυτταρικά διαμερίσματα. Πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ο σύντομος χρόνος και η ευκολία απομόνωσης, η υψηλή απόδοση RNA, τόσο σε ποιότητα όσο και σε ποσότητα, αλλά και η καθολικότητά του, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση RNA τόσο από κύτταρα όσο και από ιστούς, οποιασδήποτε ποσότητας και προελεύσεως, ανθρώπινης, ζωικής, φυτικής ή βακτηριακής. Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του RNA αποστειρώθηκαν για την απομάκρυνση ριβονουκλεασών (RNase) και στα σχετικά διαλύματα χρησιμοποιήθηκε δισαπεσταγμένο νερό (ddH<sub>2</sub>O) που είχε επεξεργαστεί με διαιθυλ-πυροκαρβονικό οξύ (diethyl pyrocarbonate, DEPC). Συνοπτικά η διαδικασία έχει ως εξής:

- ✓ Θρυψινοποίηση των κυττάρων, πλύσιμο με παγωμένο διάλυμα PBS και καταβύθιση με φυγοκέντρηση (1500 rpm, 5 λεπτά, 4°C).

- ✓ Αναδιάλυση των κυττάρων σε 1ml TRIzol και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων.
- ✓ Προσθήκη 0,2 ml χλωροφορμίου, βίαιη ανάδευση (vortex) για 15 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2,5 λεπτά.
- ✓ Φυγοκέντρηση (12000 g, 15 λεπτά, 4°C), στο τέλος της οποίας παρατηρείται σχηματισμός τριών φάσεων. Διακρίνεται η οργανική κάτω φάση φαινόλης-χλωροφορμίου (ροζ χρώμα), η οποία περιέχει τις πρωτεΐνες, η μεσόφαση, η οποία περιέχει το DNA και η υδατική επάνω φάση (διαφανής), η οποία περιέχει το RNA.
- ✓ Μεταφορά της υδατικής φάσης σε καινούριο σωλήνα μικροφυγοκέντρου και προσθήκη περίπου ίσης ποσότητας ισοπροπανόλης (0,5 ml) για την καταβύθιση του RNA. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
- ✓ Φυγοκέντρηση (12000 g, 10 λεπτά, 4°C), απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 1 ml 75% διαλύματος αιθανόλης στο ίζημα για τον καθαρισμό του RNA.
- ✓ Φυγοκέντρηση (7600 g, 5 λεπτά, 4°C), απομάκρυνση της αιθανόλης, αναδιάλυση του ιζήματος RNA σε TE και θέρμανση στους 65°C για 10 λεπτά (προκειμένου να επιτευχθεί η πλήρης διαλυτοποίηση του RNA).
- ✓ Φωτομέτρηση του RNA σε κυβέττα χαλαζία. Η συγκέντρωση του RNA καθορίζεται μετρώντας την οπτική πυκνότητα (OD) στα 260nm ( $1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g RNA/ml}$ ). Η καθαρότητα του RNA υποδηλώνεται από το λόγο  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ , ο οποίος πρέπει ιδανικά να είναι  $> 1,65$ .

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### DEPC

Σε 1000 ml ddH<sub>2</sub>O προστίθενται 1000 μl DEPC. Το διάλυμα διατηρείται στους 37°C κατά τη διάρκεια της νύχτας υπό ανάδευση και αποστειρώνεται την επόμενη μέρα.

### TE

10 mM Tris

1 mM EDTA (pH 8.0)

### 2.2.6 Αντίστροφη μεταγραφή

Με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής επιτυγχάνεται η μετατροπή των mRNA, δηλαδή των εκφραζόμενων γονιδίων του κυττάρου, σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αυτό έγινε με τη βοήθεια του πακέτου iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit της BIORAD. Το συγκεκριμένο πακέτο παρέχει

ένα γρήγορο, ευαίσθητο και εύκολο τρόπο αντίστροφης μεταγραφής του mRNA σε cDNA, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια τόσο σε παραδοσιακό RT-PCR όσο και σε PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR). Η αντίστροφη μεταγραφάση iScript RNase H<sup>+</sup>, που περιέχει το kit, είναι πολύ πιο ευαίσθητη από τα RNase H<sup>-</sup> ένζυμα και έτσι μπορεί να συνθέσει cDNA από μία πολύ μεγάλη ποικιλία αρχικού RNA. Επίσης, το μίγμα περιέχει αναστολείς ριβονουκλεασών, αλλά και ένα μοναδικό συνδυασμό ολιγο-dT και τυχαίους εξαμερείς εκκινητές, που δουλεύουν πολύ καλά με ένα μεγάλο εύρος στόχων. Η αντίδραση πραγματοποιείται ως εξής:

Σε μικρό σωλήνα μικροφυγοκέντρου προστίθενται τα παρακάτω:

- ✓ 1 μg ολικού RNA, το οποίο θα μετατραπεί σε cDNA
- ✓ 1 μl αντίστροφη μεταγραφάση iScript
- ✓ 4 μl 5x iScript μίγμα
- ✓ ddH<sub>2</sub>O, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20 μl

Οι χρησιμοποιούμενες συνθήκες είναι οι εξής:

1. 25°C για 5 λεπτά για την ενεργοποίηση του ενζύμου.
2. 42°C για 30 λεπτά οπότε και πραγματοποιείται η αντίδραση δημιουργίας του cDNA.
3. 85°C για 5 λεπτά προκειμένου να απενεργοποιηθεί το ένζυμο.

Το cDNA που παράγεται, αραιώνεται με ddH<sub>2</sub>O σε αναλογία 1:5 και στη συνέχεια, είτε χρησιμοποιείται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είτε αποθηκεύεται στους -20°C.

### 2.2.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επιτυγχάνεται η ενίσχυση συγκεκριμένου γονιδίου σε σημαντικό βαθμό, ώστε μετά το πέρας της αντίδρασης, αυτό να είναι ανιχνεύσιμο. Για τα συγκεκριμένα πειράματα, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ποιότητα του προϊόντος, αλλά και να εξασφαλιστεί ότι παράχθηκε ίση ποσότητα cDNA από κάθε δείγμα με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Για το σκοπό αυτό, ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της GAPDH, τα επίπεδα έκφρασης του οποίου είναι σταθερά μες στο κύτταρο. Η αντίδραση πραγματοποιείται ως εξής:

Σε μικρό σωλήνα μικροφυγοκέντρου προστίθενται τα παρακάτω:

- ✓ 10 μl cDNA που περιέχει την αλληλουχία που θα ενισχυθεί μέσω της αντίδρασης.
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο δρα το ένζυμο σε τέτοια ποσότητα, ώστε η συγκέντρωσή του μέσα στο μίγμα της αντίδρασης από 10x να γίνει 1x.
- ✓ 1,5 mM γλωριούχο μαγνήσιο για τους συγκεκριμένους εκκινητές.

- ✓ 0,4  $\mu\text{M}$  από κάθε εκκινητή (πρόσθιο και αντίστροφο).
- ✓ 400  $\mu\text{M}$  5'-τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (deoxynucleoside-5'-triphosphate, dNTPs).
- ✓ 2,5 units Taq πολυμεράσης.
- ✓ ddH<sub>2</sub>O, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50  $\mu\text{l}$ .
- ✓ 50  $\mu\text{l}$  ορυκτέλαιο, που προστίθενται επάνω από το μίγμα, προκειμένου να αποφευχθεί η εξάτμισή του κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης.

Οι χρησιμοποιούμενες συνθήκες είναι οι εξής:

1. 94°C για 1 λεπτό, όπου μετουσιώνεται το DNA, δηλαδή αποδιατάσσεται η δίκλωνη δομή του σε μονόκλωνη.
2. 52°C για 1 λεπτό, όπου πραγματοποιείται σύνδεση (υβριδισμός) των εκκινητών με την κατάλληλη αλληλουχία.
3. 72°C για 1 λεπτό, όπου επιτυγχάνεται επιμήκυνση του DNA μέσω της DNA πολυμεράσης με την προσθήκη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των εκκινητών.
4. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 25 κύκλους για να ενισχυθεί το προϊόν.
5. Στο τέλος, ακολουθεί θέρμανση στους 72°C για 10 λεπτά.

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται σε 1% πήκτωμα αγαρόζης σημασμένο με 0,05% (v/v) βρωμιούχο αιθίδιο. Για τον καθορισμό του μοριακού βάρους των προϊόντων χρησιμοποιείται ο Low Molecular Weight DNA Ladder (Bio-Labs). Οι εκκινητές του GAPDH που χρησιμοποιήθηκαν στο PCR συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

### **2.2.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο με τη χρωστική SYBR-green I (Real-Time PCR SYBR-green I)**

Για την ποσοτικοποίηση της αρχικής ποσότητας cDNA που υπάρχει στο υπό μελέτη δείγμα, ακολουθείται η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση του kit iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix της BIORAD. Κατά το Real-Time PCR, στο τέλος κάθε κύκλου (για αυτό και η ονομασία «αντίδραση σε πραγματικό χρόνο») καταγράφεται η ποσότητα φθορισμού που παράγεται από τη δημιουργία του υπό μελέτη προϊόντος. Το SYBR-green I αποτελεί μία χρωστική, η οποία προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA, αλλά όχι σε μονόκλωνο DNA.

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται ακριβώς στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του φθορισμού αυτής της χρωστικής όταν είναι προσδεμένη σε δίκλωνο DNA, η ποσότητα του οποίου (και κατ' επέκταση και της προσδεμένης φθορίζουσας ουσίας) αυξάνει εκθετικά σε κάθε κύκλο



PCR. Το σήμα φθορισμού μετρείται στο τέλος της κάθε φάσης επιμήκυνσης. Προκειμένου να υπολογιστεί το ποσό της μήτρας DNA που υπήρχε σε κάθε δείγμα, χρησιμοποιείται η μέθοδος σύγκρισης των οριακών κύκλων (comparative  $C_T$  method). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί μια πρότυπη καμπύλη για κάθε υπό μελέτη γονίδιο και το ποσό αυτού σε κάθε υπό μελέτη δείγμα δίνεται σε σχέση με το αντίστοιχο ποσό στην καμπύλη αναφοράς. Η βασική παράμετρος που υπολογίζεται στη μέθοδο είναι ο κύκλος  $C_T$  (threshold cycle), που αποτελεί τον κύκλο στον οποίο για πρώτη φορά εμφανίζεται μία στατιστικά σημαντική διαφορά στο σήμα φθορισμού. Κατά τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται κι ένα γονίδιο αναφοράς, προκειμένου να γίνει η κανονικοποίηση (normalization) των τιμών που λαμβάνονται. Οι υπολογισμοί που πραγματοποιούνται είναι οι εξής:

A. Υπολογίζεται η διαφορά ανάμεσα στα  $C_T$  του υπό μελέτη γονιδίου και του αντίστοιχου γονιδίου-αναφοράς.

$$\Delta C_T = C_T (\text{υπό μελέτη γονιδίου}) - C_T (\text{γονιδίου αναφοράς})$$

B. Ένα από τα δείγματα που εξετάζονται, επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί ως δείγμα-αναφοράς (baseline). Υπολογίζεται η διαφορά ανάμεσα στο  $\Delta C_T$  του κάθε δείγματος και στο  $\Delta C_T$  του δείγματος αναφοράς.

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T (\text{δείγματος}) - \Delta C_T (\text{δείγματος αναφοράς})$$

Εάν το δείγμα αναφοράς αποτελεί το ελάχιστο έκφρασης, το  $\Delta \Delta C_T$  θα είναι αρνητικό, καθώς το  $\Delta C_T$  του δείγματος αναφοράς θα είναι το μέγιστο διότι θα παρουσιάζει το μέγιστο  $C_T$ .

Γ. Προκειμένου να μετατραπούν οι σχετικές τιμές σε απόλυτες τιμές (ποσοστό έκφρασης) χρησιμοποιείται ο τύπος:  $2^{-\Delta \Delta C_T}$  που δίνει πόσες φορές μεγαλύτερη ή μικρότερη έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου παρατηρείται στα δείγματα σε σχέση με αυτήν που παρατηρείται στο δείγμα αναφοράς (<http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>).

Τέλος, για να επιβεβαιωθεί η ειδικότητα των προϊόντων του PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών, τα προϊόντα υποβάλλονται σε ανάλυση της καμπύλης τήξης αυτών και σε ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται τρεις φορές η καθεμιά σε iCycler (Bio-Rad). Οι τελικές συνθήκες αντίδρασης είναι:

- ✓ 10  $\mu$ l cDNA από κάθε υπό μελέτη δείγμα
- ✓ 1x ρυθμιστικό διάλυμα iQ SYBR Green
- ✓ 0,4  $\mu$ M από κάθε έναν εκκινητή
- ✓ Απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 50  $\mu$ l

Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε πλακίδια μικροτιτλοποίησης 96-φρεατίων και οι συνθήκες θερμοκρασίας είναι:

1. 3 λεπτά σε 95°C (αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA και ενεργοποίησης της DNA πολυμεράσης).
2. 15 δευτερόλεπτα στους 95°C και 30 δευτερόλεπτα στους 60°C (οι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί έτσι, ώστε να προσδένονται σταθερά επάνω στο DNA που αναγνωρίζουν σε αυτήν τη θερμοκρασία). Επανάληψη της διαδικασίας για 40 κύκλους.

Στις παρούσες αναλύσεις τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GAPDH (γονίδιο αναφοράς) χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικοί μάρτυρες, προκειμένου να γίνει η κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου CHIP στα διάφορα δείγματα, ενώ ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα από το σύνολο των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πλακίδιο μικροτιτλοποίησης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

Εκκινητής	Αλληλουχία
<b>GAPDH-R</b>	5'-CATGGGTGGAATCATATTGGAA-3'
<b>GAPDH-F</b>	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3'
<b>CHIP-R</b>	5'-GCG AAC GCC CAC CCT TAA GAG G-3'

## Πίνακας 2 Αλληλουχίες των PCR εκκινητών

R: οπίσθιος εκκινητής, F: πρόσθιος εκκινητής.

### 2.2.9 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Προκειμένου να ελεγχθούν τα προϊόντα που παράγονται από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, ακολουθεί η ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο με τέτοιο τρόπο, ώστε καθώς το αρνητικά φορτισμένο DNA μετακινείται προς το θετικό πόλο, να διαχωρίζεται με βάση το μοριακό του βάρος. Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν πήκτωμα 1% αγαρόζης σημασμένα με 0,05% (v/v) βρωμιούχο αιθίδιο και ο Low Molecular Weight DNA Ladder για τον καθορισμό του μοριακού βάρους των προϊόντων. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- ✓ Ανάμιξη 3 g αγαρόζης με 150 ml διαλύματος 1x TAE (Tris-Acetic acid-EDTA).
- ✓ Θέρμανση του μίγματος σε φούρνο μικροκυμάτων, ώστε να λιώσει η αγαρόζη.

- ✓ Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο μίγμα σε συγκέντρωση 0,5% (v/v), όταν η θερμοκρασία του υγρού πηκτώματος έχει μειωθεί αρκετά.
- ✓ Μεταφορά του υγρού πηκτώματος στο «καλούπι» και τοποθέτηση της «χτένας», με τη βοήθεια της οποίας θα δημιουργηθούν τα «πηγαδάκια» στα οποία φορτώνονται τα δείγματα.
- ✓ Διατήρηση του πηκτώματος σε σταθερό μέρος προκειμένου να πήξει.
- ✓ Όταν ολοκληρωθεί η πήξη, ακολουθεί αφαίρεση της «χτένας» και μεταφορά του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία γεμίζει με διάλυμα 1x TAE έως ότου καλυφθεί το πήκτωμα με το διάλυμα.
- ✓ Προσθήκη χρωστικής φορτώματος στα δείγματα, ώστε να επιτευχθεί καλύτερο φόρτωμα των δειγμάτων καθώς και να ελεγχθεί η εξέλιξη της ηλεκτροφόρησης.
- ✓ Φόρτωση των δειγμάτων στα «πηγαδάκια» του πηκτώματος.
- ✓ Ηλεκτροφόρηση σε 100 V για περίπου 1 ώρα.
- ✓ Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί παρατήρηση του πηκτώματος κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία, όπου το DNA γίνεται ορατό καθώς αντιδρά με το βρωμιούχο αιθίδιο.

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### 50x TAE

242 g Tris

57,1 ml οξικό οξύ (Acetic acid, CH<sub>3</sub>COOH)

100 ml 0,5 mM EDTA, pH 8,0

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,5 με υδροχλωρικό οξύ (Hydrochloric acid, HCl). Ο όγκος του διαλύματος συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O έως 1000 ml.

### 1x TAE (working solution)

2 ml 50x TAE και 98 ml ddH<sub>2</sub>O

### Πήκτωμα Αγαρόζης (1% w/v)

1 g αγαρόζη σε 100 ml διαλύματος 1x TAE

0,05% (v/v) βρωμιούχο αιθίδιο

## 2.2.10 Απομόνωση πρωτεϊνών

Κατά την απομόνωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται διαχωρισμός των πρωτεϊνικών μορίων από τα υπόλοιπα βιομόρια, όπως είναι τα λίπη, τα σάκχαρα, τα νουκλεϊκά οξέα, κτλ. Όλη η πειραματική διαδικασία της απομόνωσης των πρωτεϊνών πρέπει να πραγματοποιηθεί

σε χαμηλή θερμοκρασία (4°C), προκειμένου να αποφευχθούν προβλήματα πρωτεόλυσης των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Για τον ίδιο λόγο, προστίθενται διάφοροι αναστολείς πρωτεασών μέσα στα διαλύματα λύσης των πρωτεϊνών.

### 2.2.10.1 Ολικές πρωτεΐνες

Η απομόνωση πρωτεϊνών για τη διεξαγωγή ανοσοστυπώματος κατά Western (Western blot) γίνεται με τη χρήση διαλύματος Laemmli [383]. Με αυτήν τη μέθοδο απομονώνονται ολικές πρωτεΐνες (total cell lysates) συμπεριλαμβανομένων και πρωτεϊνών που βρίσκονται μέσα σε μεμβράνες ή σε οργανίδια. Αυτό οφείλεται στη χρήση SDS που υποβοηθά στη διάσπαση όλων των κυτταρικών συστατικών. Συνοπτικά, η διαδικασία που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:

- ✓ Πλύσιμο των κυττάρων που είναι προσκολλημένα στον πυθμένα της φλάσκας με παγωμένο διάλυμα PBS για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.
- ✓ Συλλογή των κυττάρων σε διάλυμα PBS με αποκόλληση από το υπόστρωμα (scrapping).
- ✓ Φυγοκέντρηση (1500 rpm, 5 λεπτά, 4°C) και πλύσιμο του ιζήματος με παγωμένο διάλυμα PBS.
- ✓ Φυγοκέντρηση (1500 rpm, 5 λεπτά, 4°C) και αναδιάλυση του ιζήματος σε διάλυμα Laemmli.
- ✓ Βρασμός σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 95°C για 5 λεπτά. Τα δείγματα φυλάσσονται στους -20°C για μικρό χρονικό διάστημα, ενώ για αποθήκευση μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος φυλάσσονται στους -80°C.

### 2.2.10.2 Πρωτεΐνες για τη μέτρηση των πρωτεοσωμικών ενεργοτήτων

Η απομόνωση των πρωτεϊνών για τη μέτρηση των ειδικών πρωτεολυτικών ενεργοτήτων γίνεται με τη χρήση του διαλύματος λύσης για ενεργότητες πρωτεοσώματος. Το ειδικό αυτό διάλυμα σε συνδυασμό με τις ήπιες συνθήκες λύσης (όχι vortex) και τη διατήρηση των εκχυλισμάτων σε πάγο εξασφαλίζουν τη διατήρηση των απομονωμένων πρωτεϊνών στη γηγενή τους μορφή (native form) και κατ' επέκταση σε μορφή που είναι ενεργές και πλήρως λειτουργικές, γεγονός απαραίτητο για τη μέτρηση των ενεργοτήτων του πρωτεοσώματος. Η διαδικασία που ακολουθείται για την απομόνωση των πρωτεϊνών για τη μέτρηση των ειδικών πρωτεολυτικών ενεργοτήτων του πρωτεοσώματος είναι η εξής:

- ✓ Πλύσιμο των κυττάρων με παγωμένο διάλυμα PBS για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας.

- ✓ Θρυψινοποίηση των κυττάρων, πλύσιμο με μέσο καλλιέργειας και καταβύθιση με φυγοκέντρηση (1500 rpm, 5 λεπτά, 4°C).
- ✓ Πλύσιμο του ιζήματος με παγωμένο διάλυμα PBS και φυγοκέντρηση (1500 rpm, 5 λεπτά, 4°C).
- ✓ Αναδιάλυση του ιζήματος σε διάλυμα λύσης για ενεργότητες πρωτεοσώματος, διατήρηση για 30 λεπτά στον πάγο με περιοδική ανακίνηση κάθε 5 λεπτά. Αποφεύγεται η βίαιη ανάδευση (με χρήση vortex), προκειμένου να αποφευχθεί η διάσπαση των διάφορων πρωτεοσωμικών συμπλόκων (20S:19S, 20S:11S).
- ✓ Φυγοκέντρηση (12000 rpm, 10 λεπτά, 4°C). Συλλογή υπερκείμενου.
- ✓ Φωτομέτρηση και στη συνέχεια, μέτρηση των πρωτεοσωμικών ενεργοτήτων.

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### **Διάλυμα Laemmli για την απομόνωση των πρωτεϊνών για ανοσοστύπωμα**

60 mM Tris-HCl, pH 6,8

2% (w/v) SDS

10% (v/v) Γλυκερόλη

0,01% (w/v) Μπλε της βρωμοφαινόλης

1 M DTT

### **Μπλε της βρωμοφαινόλης (0,4% w/v)**

4 mg μπλε της βρωμοφαινόλης σε 1 ml ddH<sub>2</sub>O

Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

### **Διάλυμα λύσης για πρωτεοσωμικές ενεργότητες (Lysis Buffer)**

20 mM Tris-HCl, pH 7,6

250 mM NaCl

3 mM EDTA

0,5% (v/v) Triton X-100

Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C. Σε κάθε χρήση του διαλύματος προστίθενται αναστολείς των πρωτεασών (1,15 μg/ml απροτινίνη και 50 mM PMSF), προκειμένου να αποφευχθούν φαινόμενα πρωτεόλυσης κατά τη διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών.

### 2.2.10.3 Διαχωρισμός και απομόνωση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών που εντοπίζονται στο κυτταροπλασματικό και πυρηνικό κλάσμα του κυττάρου χρησιμοποιήθηκε το ειδικό kit της Active Motif. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση υποτονικού διαλύματος το οποίο προκαλεί τη διαλυτοποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και κατά συνέπεια των κυτταρικών πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, η σχεδόν αδιάρρηκτη πυρηνική μεμβράνη διαρρηγνύεται με ειδικό διάλυμα λύσης και απομονώνονται οι πυρηνικές πρωτεΐνες. Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- ✓ Απομάκρυνση του υπερκείμενου και πλύση των κυττάρων με παγωμένο διάλυμα PBS παρουσία αναστολέων και φωσφατασών.
- ✓ Συλλογή των κυττάρων και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 500 rpm σε θερμοκρασία δωματίου 4°C.
- ✓ Απομάκρυνση του υπερκείμενου και διατήρηση του ιζήματος στον πάγο.
- ✓ Αναδιάλυση του ιζήματος σε υποτονικό διάλυμα και επώαση στο πάγο για 15 λεπτά.
- ✓ Προσθήκη απορρυπαντικού και βίαη ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα.
- ✓ Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στα 14000g στους 4°C.
- ✓ Το υπερκείμενο αποτελεί το κυτταροπλασματικό κλάσμα και διατηρείται στους 4°C.
- ✓ Το ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα λύσης και αναδεύεται βίαη για 10 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί επώαση στο πάγο με ήπια και συνεχή ανάδευση για 30 λεπτά.
- ✓ Βίαη ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα.
- ✓ Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g στους 4°C.
- ✓ Το υπερκείμενο αποτελεί το πυρηνικό κλάσμα και αποθηκεύεται στους -20°C.

#### ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

**Διάλυμα PBS παρουσία αναστολέων και φωσφατασών** (παρέχεται από το kit)

**Υποτονικό διάλυμα** (παρέχεται από το kit)

**Διάλυμα DTT** (παρέχεται από το kit)

10 mM DTT

**Διάλυμα ολικής λύσης**

10 mM DTT

**Διάλυμα λύσης** (παρέχεται από το kit)

**Μείγμα αναστολέων των πρωτεασών**

### 2.2.11 Μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των ήδη απομονωθέντων πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η μέθοδος Bradford. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, συγκεκριμένος όγκος κάθε εξεταζόμενου δείγματος αντιδρά για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με το αντιδραστήριο Bradford, το οποίο είναι αραιωμένο με απεσταγμένο νερό σε αναλογία όγκων 1:5 (Bradford:νερό). Ταυτόχρονα, με το ίδιο αντιδραστήριο και για το ίδιο χρονικό διάστημα αντιδρούν και γνωστές ποσότητες (2, 4, 6, 8, 10 και 15  $\mu\text{g}$ ) πρότυπης πρωτεΐνης, η οποία στα παρόντα πειράματα είναι η αλβουμίνη ορρού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται 1 ml από το αραιωμένο αντιδραστήριο Bradford. Η αντίδραση των πρωτεϊνών με το αντιδραστήριο Bradford δίνει χρωματισμένο προϊόν, το οποίο απορροφά στα 595 nm. Έτσι, μετά την επώαση των δειγμάτων, γνωστών και αγνώστων, ακολουθεί η φωτομέτρησή τους. Στη συνέχεια, από το ίδιο το φωτόμετρο, σχεδιάζεται πρότυπη καμπύλη οπτικής απορρόφησης σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της πρότυπης πρωτεΐνης και με βάση αυτή, υπολογίζεται η συγκέντρωση των άγνωστων δειγμάτων.

### 2.2.12 Μέτρηση των ειδικών πρωτεολυτικών ενεργοτήτων

Οι ειδικές πρωτεολυτικές ενεργότητες του πρωτεοσώματος (ενεργότητα χυμοθρυψίνης, ενεργότητα πεπτιδυλογλουταμυλο-υδρολάσης και ενεργότητα θρυψίνης) υπολογίζονται με βάση την υδρόλυση ειδικών φλουοροπεπτιδίων. Χρησιμοποιήθηκε το πεπτίδιο Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin (LLVY-AMC) για τη μέτρηση της ενεργότητας της χυμοθρυψίνης, το N-Cbz-Leu-Leu-Glu- $\beta$ -naphthylamine (LLE-NA) για τη μέτρηση της ενεργότητας της πεπτιδυλογλουταμυλο-υδρολάσης και το N-Cbz-Leu-Leu-Leucinal (LSTR-AMC) για τη μέτρηση της ενεργότητας της θρυψίνης. Η μέτρηση της κάθε ενεργότητας γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M HEPES pH 7.3, όπου και προστίθενται σε τελική συγκέντρωση 10  $\mu\text{M}$  (για το LLVY-AMC), 20  $\mu\text{M}$  (για το LLE-NA) και 100  $\mu\text{M}$  (για το LSTR-AMC) τα αντίστοιχα φλουοροπεπτίδια, σε αντίδραση τελικού όγκου 200  $\mu\text{l}$ .

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η ειδικότητα της μέτρησης, για κάθε δείγμα παρασκευάζεται και δεύτερο πανομοιότυπο δείγμα όπου προστίθεται ο ειδικός αναστολέας του πρωτεοσώματος MG132 σε τελική συγκέντρωση 400  $\mu\text{M}$ . Η μέτρηση που λαμβάνεται από αυτό το δείγμα αφαιρείται από αυτήν που λαμβάνεται από το αντίστοιχο δείγμα που δεν έχει προστεθεί αναστολέας. Η διαφορά των τιμών αποτελεί την καθαρή μέτρηση που οφείλεται αποκλειστικά στη δράση του πρωτεοσώματος. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 30 λεπτά στους 37°C, όπως έχει ήδη περιγραφεί από τους [170, 188] και λήγει με την προσθήκη 300  $\mu\text{l}$  διαλύματος A για τις αντιδράσεις με πεπτίδια που φέρουν αμινο-

μεθυλοκουμαρίνη (AMC) και 300  $\mu$ l αιθανόλης για τις αντιδράσεις με πεπτίδια που φέρουν ναφθυλαμίνη (NA). Η μέτρηση του ειδικού φθορισμού στο διάλυμα που προκύπτει μετά την πρωτεόλυση των φλουοροπεπτιδίων από το πρωτεόσωμα γίνεται με φθορισμοφωτόμετρο (Perkin Elmer 650-40 fluorescence spectrophotometer). Για τα πεπτίδια με αμινομεθυλοκουμαρίνη, το μήκος κύματος διέγερσης (excitation) είναι 350 nm και το μήκος κύματος εκπομπής (emission) είναι 440 nm. Για τα πεπτίδια με ναφθυλαμίνη, το μήκος κύματος διέγερσης (excitation) είναι 333 nm και το μήκος κύματος εκπομπής (emission) είναι 410 nm.

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### Ρυθμιστικό διάλυμα Hepes

0,1 M Hepes σε ddH<sub>2</sub>O

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7,3 με HCl.

### Διάλυμα λήξης της αντίδρασης των πρωτεοσωμικών ενεργοτήτων (Διάλυμα A)

30 mM CH<sub>3</sub>COONa

70 mM CH<sub>3</sub>COOH

100 mM chloro-CH<sub>3</sub>COONa, pH 4,3

### 2.2.13 Ανοσοκατακρήμιση για τον προσδιορισμό των επιπέδων ουμπικιτυλίωσης της CHIP *in vivo*

Με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμισης είναι δυνατή η καταβύθιση και απομόνωση της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντος, καθώς και των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν και προσδένονται σε αυτήν. Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση ειδικού αντισώματος, που αναγνωρίζει την υπό μελέτη πρωτεΐνη και στην αλληλεπίδραση αυτού του αντισώματος με την πρωτεΐνη A ή G (πρωτεΐνη που απομονώνεται από μύκητες και παρουσιάζει ενδογενή τάση να συνδέεται με αντισώματα), η οποία με τη σειρά της είναι συνδεδεμένη με σφαιρίδια αγαρόζης τα οποία υποβοηθούν, κατά τη φυγοκέντρηση του μείγματος, την καθίζηση του συμπλόκου αντιγόνο-αντίσωμα-πρωτεΐνη A ή G / σφαιρίδια αγαρόζης.

Ανάλογα με τις συνθήκες αλατότητας κάτω από τις οποίες γίνεται το πείραμα (ήπιες ή ισχυρές, οι οποίες σχετίζονται με τη διατήρηση ή όχι των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις διάφορες πρωτεΐνες, αντίστοιχα), μαζί με το αντιγόνο που μελετάται συμπαρασύρονται ή όχι και οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με αυτό. Εδώ χρησιμοποιήθηκαν ισχυρές συνθήκες, προκειμένου να σπάσουν όλες οι πρωτεϊνικές



αλληλεπιδράσεις της CHIP με άλλα μόρια και να διασφαλιστεί ότι ανιχνεύονται τα επίπεδα ουμπικιτυλίωσης αποκλειστικά της CHIP λιγάσης.

Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- ✓ Πλύσιμο των κυττάρων με παγωμένο διάλυμα PBS για την απομάκρυνση υπολειμμάτων του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και θρυψινοποίηση.
- ✓ Συλλογή των κυττάρων και στο ίζημα προστίθενται 100μl διαλύματος TSD.
- ✓ Βρασμός (7 λεπτά, 95°C).
- ✓ Προσθήκη 950 μl διαλύματος TNN και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά στον πάγο.
- ✓ Φυγοκέντρηση (1200 rpm, 3 λεπτά, 4°C) και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο eppendorf.
- ✓ Επώαση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων με 2 μg αντισώματος (μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ειδικά τη Myc πρωτεΐνη) για 2 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση. Παράλληλα, στο ίδιο χρονικό διάστημα, η ίδια ποσότητα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος επωάζεται με ορρό ποντικού (δεδομένου ότι το μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιείται έχει αναπτυχθεί σε ποντίκι) και αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα.
- ✓ Προσθήκη σφαιριδίων αгарόζης συνδεδεμένα με πρωτεΐνη G για 16 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση.
- ✓ Φυγοκέντρηση (3000 rpm, 2 λεπτά, 4°C). Πλύσιμο ανοσοκατακρημνισμένων πρωτεϊνικών συμπλόκων (ίζημα που είναι σύμπλοκο των πρωτεϊνών με τα σφαιρίδια αгарόζης – αντίσωμα Myc) 4 φορές με διάλυμα πλύσης.
- ✓ Βρασμός για 5 λεπτά (τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα απελευθερώνονται από τα σφαιρίδια κατά το στάδιο αυτό).
- ✓ Φυγοκέντρηση (3000 rpm, 5 λεπτά, 4°C). Λήψη υπερκείμενου.

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### TNN, Non-denaturing

50 mM Tris-HCl, pH 7.5

250 mM NaCl

5 mM EDTA

0,5% (v/v) NP-40

Σε κάθε χρήση του διαλύματος προστίθενται οι παρακάτω αναστολείς πρωτεασών προκειμένου να αποφευχθούν φαινόμενα πρωτεόλυσης κατά τη διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών: 10 μg/ml λευπεπτίνη, 10 μg/ml πεπστατίνη και 5 μg/ml απροτινίνη.

### TSD, Denaturing

50 mM Tris-HCl, pH 7.5

1% (v/v) SDS

5 mM DTT

**Διάλυμα πλύσης**

1% (v/v) NP-40

#### **2.2.14 Ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης πρωτεϊνών σε πήκτωμα SDS-Πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)**

Τα πειράματα ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE) πραγματοποιήθηκαν όπως έχουν περιγραφεί από τον Laemmli [384]. Χρησιμοποιήθηκαν 10% και 8% αποδιατακτικά πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου. Πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός των πολυπεπτιδίων με βάση το μοριακό τους βάρος, προστίθεται το πήκτωμα συμύκνωσης (6%) (stacking gel), το οποίο χρησιμεύει προκειμένου να εξασφαλιστεί η ταυτόχρονη και ομοιόμορφη είσοδος όλων των πολυπεπτιδίων στο πήκτωμα διαχωρισμού. Το διάλυμα των πρωτεϊνών αναμιγνύεται με διάλυμα φόρτωσης πρωτεϊνών, βράζεται για 5 λεπτά στους 95°C και φορτώνεται στην κορυφή κατακόρυφου αποδιατακτικού πηκτώματος SDS-πολυακρυλαμιδίου. Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει γλυκερόλη που υποβοηθά το φόρτωμα των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων, SDS που αποδίδει αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες, ώστε αυτές να διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος και όχι με βάση το φορτίο τους και μπλε της βρωμοφαινόλης ώστε να διευκολύνεται το φόρτωμα των πρωτεϊνών, αλλά και να παρακολουθείται η πορεία της ηλεκτροφόρησης. Παράλληλα με τα δείγματα, φορτώνονται και δείκτες πρωτεϊνών με γνωστά μοριακά βάρη προκειμένου να αναγνωρίζεται ευκολότερα η υπό μελέτη πρωτεΐνη, με βάση το αναμενόμενο μοριακό βάρος της. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε 150V, σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης, για χρόνο που εξαρτάται από το μοριακό βάρος της υπό μελέτη πρωτεΐνης και τη συγκέντρωση των πηκτωμάτων συμύκνωσης και διαχωρισμού (για τις πρωτεοσω-μικές υπομονάδες και για τα πηκτώματα 6% (συμπύκνωσης) και 10% (διαχωρισμού) απαιτείται ~1 ώρα).

#### **ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ**

##### **4x Tris-HCl-SDS, pH 6.8 (Stacking buffer)**

0.5 M Tris

0.4% (w/v) SDS

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 6.8 με τη χρήση HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

**4x Tris-HCl-SDS, pH 8.8 (Resolving buffer)**

1.5 M Tris

0.4% (w/v) SDS

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 8.8 με τη χρήση HCl. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

**Διάλυμα Ακρυλαμιδίου (40%) (Acrylamide Solution)**

38 g ακρυλαμίδη

2 g 1,2-διϋδρόξυ-αιθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο

Ο όγκος του διαλύματος συμπληρώνεται με ddH<sub>2</sub>O έως 100 ml και μετά το φιλτράρισμα φυλάσσεται στους 4°C.

**Πήκτωμα Συμπύκνωσης Ακρυλαμιδίου (6%) (Stacking Gel)**

6% (v/v) διάλυμα ακρυλαμιδίου

1x Tris-HCl, pH 6.8

1% (v/v) APS

0.2% (v/v) TEMED

**Πήκτωμα Διαχωρισμού Ακρυλαμιδίου (10 ή 12%) (Separating Gel)**

10 ή 12 % (v/v) διάλυμα ακρυλαμιδίου

1x Tris-HCl-SDS, pH 8.8

1% (v/v) APS

0.2% (v/v) TEMED

**Διάλυμα Φόρτωσης Πρωτεϊνών (Protein Loading Buffer)**

0.125 M Tris-HCl, pH 7.5

4% (w/v) SDS

20% (v/v) Γλυκερόλη

2 mM EDTA, pH 8

0.01% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης

**1x Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης (Running Buffer)**

25 mM Tris

192 mM Γλυκίνη

0.1% (w/v) SDS

**Stock APS (10%)**

1gr APS σε 10 ml ddH<sub>2</sub>O

Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C για περίπου 10 μέρες.

**Μπλε της βρωμοφαινόλης (0.4% w/v)**

4 mg μπλε της βρωμοφαινόλης σε 1 ml ddH<sub>2</sub>O  
 Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.

### 2.2.15 Χρώση Πρωτεϊνών

Προκειμένου να ελεγχθεί το ισόποσο φόρτωμα των πρωτεϊνών μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων, αλλά και να γίνουν ορατές οι πρωτεΐνες, χρησιμοποιείται η μέθοδος χρώσης των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται μόνο χρώση των πρωτεϊνών και δεν ακολουθεί ανοσοαποτύπωμα. Συνοπτικά η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- ✓ Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου βυθίζεται σε διάλυμα χρώσης πρωτεϊνών Coomassie brilliant blue σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά, υπό συνεχή ανάδευση.
- ✓ Ακολουθεί αποχρωματισμός του πηκτώματος με διάλυμα αποχρωματισμού πρωτεϊνών, κατά τη διάρκεια του οποίου οι πρωτεΐνες γίνονται ορατές.

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### Διάλυμα Χρώσης Πρωτεϊνών

45% (v/v) Μεθανόλη

10% (v/v) CH<sub>3</sub>COOH

0,033% (w/v) Coomassie Brilliant Blue

### Διάλυμα Αποχρωματισμού Πρωτεϊνών

45% (v/v) Μεθανόλη

10% (v/v) CH<sub>3</sub>COOH

### 2.2.16 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western blot)

Προκειμένου να εξεταστούν τα επίπεδα έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών, οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μεταφέρονται σε στερεό υπόβαθρο, δηλαδή σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, με τη βοήθεια συσκευής ηλεκτροφόρησης Bio-rad. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- ✓ Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου τοποθετείται σε επαφή με φύλλο νιτροκυτταρίνης ίδιου μεγέθους, μέσα σε πλέγμα που βρίσκεται σε ηλεκτρικό πεδίο. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετείται προς το θετικό πόλο, ενώ το πήκτωμα με τις πρωτεΐνες προς τον αρνητικό πόλο. Οι πρωτεΐνες έχουν ομοιόμορφο αρνητικό φορτίο λόγω του SDS που υπάρχει στο διάλυμα φόρτωσης των πρωτεϊνών. Μετά την

επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, οι πρωτεΐνες θα μεταφερθούν προς το θετικό πόλο, όπου βρίσκεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

- ✓ Η μεταφορά των πρωτεϊνών γίνεται μέσα σε ειδικό διάλυμα μεταφοράς για 1 ώρα και 45 λεπτά σε 400 mA.
- ✓ Μετά τη μεταφορά, ακολουθεί χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με διάλυμα Ponceau S για 1 λεπτό υπό ανάδευση και αποχρωματισμό με ddH<sub>2</sub>O. Οι πρωτεΐνες γίνονται ορατές πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και έτσι ελέγχεται αν έχει γίνει σωστή μεταφορά των πρωτεϊνών επάνω στη μεμβράνη καθώς και το ισόποσο φόρτωμα πρωτεϊνών μεταξύ των δειγμάτων.
- ✓ Στη συνέχεια, η μεμβράνη αποχρωματίζεται πλήρως με πλύσιμο με ddH<sub>2</sub>O και είναι έτοιμη για ανοσοστύπωμα κατά Western.

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### 1x Διάλυμα Μεταφοράς Πρωτεϊνών

48 mM Tris

37 mM γλυκίνη

20% (v/v) μεθανόλη

0,04% (w/v) SDS

### Διάλυμα Ponceau S

2% (w/v) Ponceau S σε 30% (v/v) τριγλωροξικό οξύ

### Διάλυμα αποχρωματισμού

Απεσταγμένο νερό

### 2.2.17 Ανοσοστύπωμα πρωτεϊνών κατά Western (Immunoblotting)

Με τη μέθοδο του ανοσοστυπώματος πρωτεϊνών κατά Western επιτυγχάνεται η ανίχνευση της υπό μελέτη πρωτεΐνης χάρη στη βοήθεια ειδικού αντισώματος ελέγχου. Συνοπτικά, η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- ✓ Επώαση της μεμβράνης υπό συνεχή ανάδευση με διάλυμα blocking (5% (w/v) γάλα με χαμηλά λιπαρά) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης.
- ✓ Επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα (αντίσωμα-ελέγχου), το οποίο είναι ειδικά παρασκευασμένο, ώστε να αναγνωρίζει συγκεκριμένο επίτοπο της υπό μελέτη πρωτεΐνης, διαλυμένο σε διάλυμα blocking για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (ή για ~16 ώρες στους 4°C) υπό ανάδευση.

- ✓ Πλύσιμο της μεμβράνης με διάλυμα πλύσης 3 φορές για 10 λεπτά, υπό ανάδευση, για να διασπαστούν οι μη ειδικές συνδέσεις.
- ✓ Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα διαλυμένο σε διάλυμα blocking για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει τη συντηρημένη περιοχή Fc του αντισώματος-ελέγχου και είναι συζευγμένο με ένα μόριο ιχνηθέτη. Στα συγκεκριμένα πειράματα, το μόριο αυτό είναι το ένζυμο υπεροξειδάσης αγριοραπανίδας (Horse Radish Peroxidase, HRP), το οποίο με το κατάλληλο υπόστρωμα δίνει αντίδραση χημειοφωταύγειας.
- ✓ Πλύσιμο μεμβράνης με διάλυμα πλύσης 3 φορές για 10 λεπτά, υπό ανάδευση, για να διασπαστούν και πάλι οι μη ειδικές συνδέσεις.
- ✓ Ανίχνευση του συμπλέγματος αντιγόνου (υπό μελέτη πρωτεΐνη) - αντισώματος (δευτερογενές αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με το πρωτογενές) με τη χρήση του ειδικού πακέτου ECL (ECL kit), το οποίο περιέχει δύο αντιδραστήρια. Το υπεροξειδίο (αντιδραστήριο A), το οποίο αποτελεί υπόστρωμα για το ένζυμο υπεροξειδάση αγριοραπανίδας, και τη λουμινόλη (αντιδραστήριο B), η οποία αποτελεί ενισχυτή της χημειοφωταύγειας. Τα αντιδραστήρια A και B (0,125 ml/cm<sup>2</sup>) αναμιγνύονται και προστίθενται στην επιφάνεια της μεμβράνης για 1 λεπτό.
- ✓ Έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ ακτίνων X (Fuji) σε σκοτεινό θάλαμο για συγκεκριμένη χρονική διάρκεια (κυμαίνεται από 30 δευτερόλεπτα μέχρι 1 ώρα), η οποία εξαρτάται από την ένταση της ζώνης του συμπλέγματος, η οποία σχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης της υπό μελέτη πρωτεΐνης αλλά και με τα επίπεδα συγγένειας της υπό μελέτη πρωτεΐνης με το πρωτογενές αντίσωμα.
- ✓ Εμφάνιση του φιλμ με μεταφορά του σε ειδικό διάλυμα εμφάνισης για περίπου 3 λεπτά, ξέπλυμα με νερό βρύσης και μονιμοποίηση σε ειδικό διάλυμα μονιμοποίησης για 3 πάλι λεπτά.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 3.

Αντίσωμα	Εταιρεία	Δευτερογενές αντίσωμα	Αραίωση	Μοριακό βάρος πρωτεΐνης (kDa)
<b>β1</b>	Biomol	anti-mouse	1:1000	29
<b>β2</b>	Biomol	anti-mouse	1:1000	28
<b>β5</b>	Biomol	anti-rabbit	1:1000	23
<b>p53</b>	Santa Cruz	anti-mouse	1:5000	53
<b>Mdm2</b>	Santa Cruz	anti-mouse	1:500	90
<b>Hsp90</b>	Santa Cruz	anti-goat	1:1000	90
<b>Hsp70</b>	Santa Cruz	anti-goat	1:1000	70
<b>Hsp40</b>	Santa Cruz	anti-rabbit	1:1000	40
<b>Lamin A/C</b>	Santa Cruz	anti-rabbit	1:5000	69/62
<b>a-tubulin</b>	Santa Cruz	anti-mouse	1:1000	52
<b>c-Myc</b>	Santa Cruz	anti-mouse	1:1000	62
<b>p16</b>	Santa Cruz	anti-rabbit	1:5000	16
<b>p21</b>	Santa Cruz	anti-mouse	1:5000	21
<b>UBE2D</b>	Santa Cruz	anti-goat	1:1000	17
<b>HA</b>	Santa Cruz	anti-mouse	1:1000	-
<b>GAPDH</b>	Santa Cruz	anti-rabbit	1:10000	37
<b>CHIP</b>	Abcam	anti-rabbit	1:1000	35
<b>Pirh2</b>	Bethyl Laboratories	anti-rabbit	1:1000	32
<b>TOPORS</b>	Abnova Corporation	anti-mouse	1:1000	38
<b>COP1</b>	Genentech	anti-mouse	1:1000	84
<b>HA (12CA5)</b>	Roche	anti-mouse	1:1000	-
<b>Skp1</b>	Zymed	anti-mouse	1:1000	19
<b>Skp2</b>	Santa Cruz	anti-rabbit	1:1000	45
<b>Cul1</b>	Zymed	anti-rabbit	1:1000	84
<b>Rbx1</b>	Santa Cruz	anti-goat	1:1000	17
<b>Bag1</b>	Santa Cruz	anti-rabbit	1:1000	32

### Πίνακας 3 Πρωτογενή αντισώματα

Στον πίνακα φαίνονται τα ειδικά αντισώματα έναντι των συγκεκριμένων πρωτεϊνών, η εταιρεία από την οποία προμηθεύτηκαν, το δευτερογενές αντίσωμα, οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και τα μοριακά βάρη (MB) των πρωτεϊνών εκφρασμένα σε kDa.

### 2.2.18 Αφαίρεση αντισώματος από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Stripping)

Η κάθε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στην οποία έχει γίνει μεταφορά πρωτεϊνών είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί περισσότερες της μιας φορές. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στην περίπτωση που πρέπει να ελεγχθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων που μελετώνται ή όταν τα υπό μελέτη δείγματα είναι σπάνια και δεν υπάρχει δυνατότητα να δημιουργηθούν πολλές πανομοιότυπες μεμβράνες λόγω της περιορισμένης ποσότητας των δειγμάτων. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η μεμβράνη επάνω στην οποία έχει ήδη γίνει ιχνηθέτηση με κάποιο αντίσωμα, υποβάλλεται στη διαδικασία αφαίρεσης του αντισώματος. Μετά την αφαίρεση των αντισωμάτων, η μεμβράνη είναι έτοιμη για επαναχρησιμοποίηση, δηλαδή για ένα εκ νέου ανοσοστύπωμα κατά Western. Για τον έλεγχο του ισοφορτώματος, χρησιμοποιείται μία πρωτεΐνη, τα επίπεδα της οποίας δεν αλλάζουν κατά τις συνθήκες πραγματοποίησης του πειράματος. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ο έλεγχος αυτός έγινε με ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεύδης (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH).

Η διαδικασία που ακολουθείται για την αφαίρεση του αντισώματος από τη μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης είναι η εξής:

- ✓ Επώαση της μεμβράνης με διάλυμα stripping στους 65°C για 45 λεπτά.
- ✓ Πλύσιμο της μεμβράνης 3 φορές για 10 λεπτά με διάλυμα πλύσης.
- ✓ Στέγνωμα της μεμβράνης και φύλαξη στους 4°C ή έναρξη ενός νέου ανοσοστυπώματος κατά Western.

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### Διάλυμα stripping

2% (w/v) SDS

50 mM Tris

50 mM DTT

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7 με HCl.

### Διάλυμα πλύσης

1x TBS/0,1% (v/v) Tween-20

### 2.2.19 Ανοσοεντοπισμός (Confocal)

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατός ο *in situ* εντοπισμός διάφορων κυτταρικών αντιγόνων (στα παρόντα πειράματα, πρωτεΐνες) μέσα στα κύτταρα. Χρησιμοποιούνται πρωτογενή αντισώματα που αναγνωρίζουν τα υπό έλεγχο αντιγόνα και δευτερογενή αντισώματα που



αναγνωρίζουν τα πρωτογενή αντισώματα και φέρουν κάποιον ιχνηθέτη προκειμένου το σύμπλοκο που δημιουργείται (αντιγόνο-πρωτογενές αντίσωμα-δευτερογενές αντίσωμα) να γίνει ανιχνεύσιμο. Ο ιχνηθέτης που χρησιμοποιήθηκε στα παρόντα πειράματα είναι η φθορίζουσα χρωστική FITC. Συνοπτικά, η διαδικασία που πραγματοποιείται είναι η εξής:

- ✓ Καλλιέργεια των κυττάρων πάνω σε καλυπτρίδες. Την ημέρα του πειράματος, πριν τη διαδικασία ανοσοεντοπισμού, οι καλυπτρίδες που φέρουν επάνω τους τα κύτταρα, πλένονται 3 φορές με διάλυμα PBS.
- ✓ Μονιμοποίηση των κυττάρων με 4% παραφορμαλδεΐδη σε διάλυμα PBS.
- ✓ Διάνοιξη των μεμβρανών με 0.2% Triton X-100 σε διάλυμα PBS.
- ✓ Επώαση των κυττάρων με διάλυμα blocking ανοσοϊστοχημείας για 50 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Επώαση των κυττάρων με το πρωτογενές αντίσωμα (αντίσωμα-ελέγχου) διαλυμένο σε διάλυμα blocking ανοσοϊστοχημείας για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Πλύσιμο των κυττάρων με διάλυμα πλύσης ανοσοϊστοχημείας 3 φορές για 5 λεπτά, υπό ανάδευση.
- ✓ Επώαση των κυττάρων με το δευτερογενές αντίσωμα (ανάλογα με το πρωτογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε) διαλυμένο σε διάλυμα blocking ανοσοϊστοχημείας για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει τη συντηρημένη περιοχή Fc του αντισώματος-ελέγχου και είναι συζευγμένο με ένα μόριο ιχνηθέτη (FITC φθορίζουσα ουσία).
- ✓ Προσθήκη 80% γλυκερόλης σε αντικειμενοφόρο πλάκα και βύθιση της καλυπτρίδας που φέρει τα δείγματα σε αυτή (mounting). Τα δείγματα στεγανοποιούνται με κάλυψη των καλυπτρίδων και μονιμοποίηση αυτών με βερνίκι νυχιών. Τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους 4°C μέχρι την παρατήρησή τους με συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης. Ως τυφλά χρησιμοποιούνται α) δείγματα χωρίς το πρωτογενές αντίσωμα και β) δείγματα με προσθήκη κανονικού ορρού (από τον οργανισμό στον οποίο παράχθηκε το πρωτογενές αντίσωμα) αντί για πρωτογενές αντίσωμα.

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### Διάλυμα πλύσης ανοσοϊστοχημείας

1x PBS/0.05% (v/v) Tween-20

### Διάλυμα blocking ανοσοϊστοχημείας

3% (w/v) BSA σε 1x PBS/0.05% (v/v) Tween-20

### 2.2.20 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

Η μέθοδος στηρίζεται στις παρατηρήσεις των Mandel και Higa, οι οποίοι έδειξαν ότι τα βακτηριακά κύτταρα που επωάζονται με παγωμένο διάλυμα  $\text{CaCl}_2$  και στη συνέχεια θερμαίνονται γρήγορα στους  $37^\circ\text{C}$  ή στους  $42^\circ\text{C}$ , μπορούν να υποστούν επιμόλυνση με το DNA του βακτηριοφάγου λ [385]. Κατά την προετοιμασία των δεκτικών κυττάρων, όλοι οι χειρισμοί γίνονται με ήπιες κινήσεις ώστε τα κύτταρα να μην υποστούν βλάβες. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- ✓ Σε σωλήνα τύπου universal προστίθενται υπό άσηπτες συνθήκες 5 ml θρεπτικού υλικού L-Broth (LB) και 100 μl βακτηρίων *E. coli* του στελέχους XL1 blue. Η καλλιέργεια διατηρείται στους  $37^\circ\text{C}$ , υπό ανακίνηση για περίπου 16 ώρες.
- ✓ Την επόμενη ημέρα: σε 100 ml LB προστίθενται, υπό άσηπτες συνθήκες, 2 ml βακτηριακής καλλιέργειας. Η καινούρια καλλιέργεια τοποθετείται σε κλίβανο, υπό ανακίνηση, στους  $37^\circ\text{C}$ , έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600 nm να λάβει την τιμή 0,6. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γίνεται περιοδικά και ως μάρτυρας-τυφλό χρησιμοποιείται μέρος του θρεπτικού υλικού.
- ✓ Όταν η καλλιέργεια παρουσιάζει οπτική πυκνότητα ίση με 0,6 στα 600 nm, μεταφέρεται υπό άσηπτες συνθήκες σε σωλήνα τύπου falcon και η καλλιέργεια διατηρείται στον πάγο για 10 λεπτά.
- ✓ Φυγοκέντρωση της καλλιέργειας σε 4000 rpm για 10 λεπτά στους  $4^\circ\text{C}$ , προκειμένου να κατακρημνιστούν τα βακτηριακά κύτταρα. Απόρριψη του υπερκειμένου και διατήρηση του σωλήνα αναποδογυρισμένου για 1 λεπτό (στράγγισμα).
- ✓ Επαναιώρηση των κυττάρων σε 10 ml παγωμένου διαλύματος 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  με τη βοήθεια ακροφυσίου πιπέτας, με ήπιους χειρισμούς και διατήρηση στον πάγο για 30 λεπτά.
- ✓ Φυγοκέντρωση σε 4000 rpm για 10 λεπτά σε  $4^\circ\text{C}$ . Απόρριψη του υπερκειμένου και διατήρηση του σωλήνα αναποδογυρισμένου για 1 λεπτό (στράγγισμα).
- ✓ Επαναιώρηση των κυττάρων σε 2 ml παγωμένου διαλύματος 0,1M  $\text{CaCl}_2$ .
- ✓ Προσθήκη αποστειρωμένης γλυκερόλης σε συγκέντρωση 15% και αποθήκευση στους  $-80^\circ\text{C}$ .

## ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

### L-Broth (LB)

1% (w/v) bacto-tryptone

0,5% (w/v) bacto-yeast extract

1% (w/v) NaCl

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7, με 5N υδροξείδιο του νατρίου (sodium hydroxide, NaOH). Αποστείρωση.

### 2.2.21 Μετασηματισμός βακτηρίων (Transformation)

Η αρχή του μετασηματισμού των βακτηρίων στηρίζεται στο γεγονός ότι τα δεκτικά πλέον βακτήρια μπορούν να παραλάβουν DNA, σε μορφή πλασμιδίου, από το διάλυμα και να το εκφράσουν υπό κατάλληλες συνθήκες. Κατά το μετασηματισμό των βακτηρίων, εκτός από το κανονικό δείγμα, το οποίο περιέχει τα δεκτικά κύτταρα και το πλασμίδιο με το οποίο θα μετασηματισθούν τα κύτταρα, υπάρχει πάντα ένα δείγμα που αποτελεί το θετικό μάρτυρα και ένα που αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα. Το πλασμίδιο, εκτός από την έκφραση του γονιδίου που θέλουμε, αποδίδει επίσης ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό επιλογής. Ο θετικός μάρτυρας αποτελείται από τα δεκτικά κύτταρα και μία συγκεκριμένη ποσότητα γνωστού πλασμιδίου που επίσης κωδικοποιεί για ένα γονίδιο που αποδίδει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό επιλογής. Ο αρνητικός μάρτυρας περιέχει μόνο τα δεκτικά κύτταρα [385]. Στην προκειμένη περίπτωση, η πρωτεΐνη που παράγεται από το γονίδιο ανθεκτικότητας είναι η β-λακταμάση και ως αντιβιοτικό επιλογής χρησιμοποιείται η αμπικιλίνη. Η διαδικασία που πραγματοποιείται είναι η εξής:

- ✓ Σε κάθε έναν από τους σωλήνες μικροφυγοκέντρου προστίθενται 100 μl δεκτικών κυττάρων. Στον αρνητικό μάρτυρα δεν προστίθεται τίποτα άλλο, στο θετικό μάρτυρα προστίθενται 5 ng συγκεκριμένου πλασμιδίου και στο κανονικό δείγμα προστίθενται 10 ng του πλασμιδίου που μας ενδιαφέρει. Τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 30 λεπτά, στη συνέχεια στους 42°C για 1 λεπτό και επαναφέρονται στον πάγο.
- ✓ Ύστερα από 10 λεπτά, τα κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία τα οποία περιέχουν άγαρ που φέρει το αντιβιοτικό επιλογής, δηλαδή την αμπικιλίνη.
- ✓ Τα τρυβλία τοποθετούνται ανεστραμμένα σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C για 15-24 ώρες.
- ✓ Την επόμενη μέρα καταμετρούνται οι αποικίες τόσο του δείγματος όσο και του θετικού μάρτυρα. Η απόδοση του μετασηματισμού εκφράζεται σε αριθμό αποικιών ανά μg DNA που χρησιμοποιήθηκε.

**ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ****Αμπικιλλίνη (50 mg/ml)**

1 g Pentrexyl σε 10 ml ddH<sub>2</sub>O και 10 ml αιθανόλης 100%

**Άγαρ**

1% (w/v) bacto-tryptone

0,8% (w/v) NaCl

1,2% (w/v) άγαρ

Ακολουθεί αποστείρωση του άγαρ. Όταν η θερμοκρασία φτάσει στους 40°C, προστίθεται η αμπικιλλίνη (ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 100 µg/ml), το άγαρ μοιράζεται στα τρυβλία, τα οποία διατηρούνται σε σταθερό μέρος για να στερεοποιηθεί το άγαρ. Τα τρυβλία διατηρούνται για περίπου 24 ώρες στους 37°C και αποθηκεύονται στους 4°C.

- **Μικρές καλλιέργειες**

Σε σωλήνα τύπου universal προστίθενται 5 ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού Super Broth (SB), μία βακτηριακή αποικία, η οποία φέρει το πλασμίδιο προς απομόνωση και αμπικιλλίνη σε τελική συγκέντρωση 400 µg/ml. Οι καλλιέργειες αυτές επωάζονται υπό ανακίνηση στους 37°C για περίπου 16 ώρες.

- **Μεσαίες καλλιέργειες**

Σε μεγάλες φλάσκες προστίθενται 500 ml αποστειρωμένου SB, 2 ml βακτηριακών κυττάρων και αμπικιλλίνη, προκειμένου η τελική συγκέντρωση αυτής να είναι 400 µg/ml. Οι καλλιέργειες αυτές επωάζονται υπό ανακίνηση στους 37°C για περίπου 16 ώρες.

**2.2.22 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA**

Για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκε το Quantum Prep™ Plasmid Midiprep Kit της BIORAD, το οποίο εφαρμόζει ένα βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο αλκαλικής λύσης και ένα πατενταρισμένο καλούπι πρόσδεσης DNA, το οποίο αποτελείται από τον εξωσκελετό διοξειδίου του πυριτίου των διατόμων. Παρέχει υψηλή απόδοση και καθαρότητα μέσω μίας απλής και σύντομης διαδικασίας. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι τα εξής:

- ✓ Μεταφορά 40 ml των μεσαίων καλλιεργείων σε σωλήνες φυγοκέντρου των 50 ml και καταβύθιση των βακτηρίων με φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 5 λεπτά.

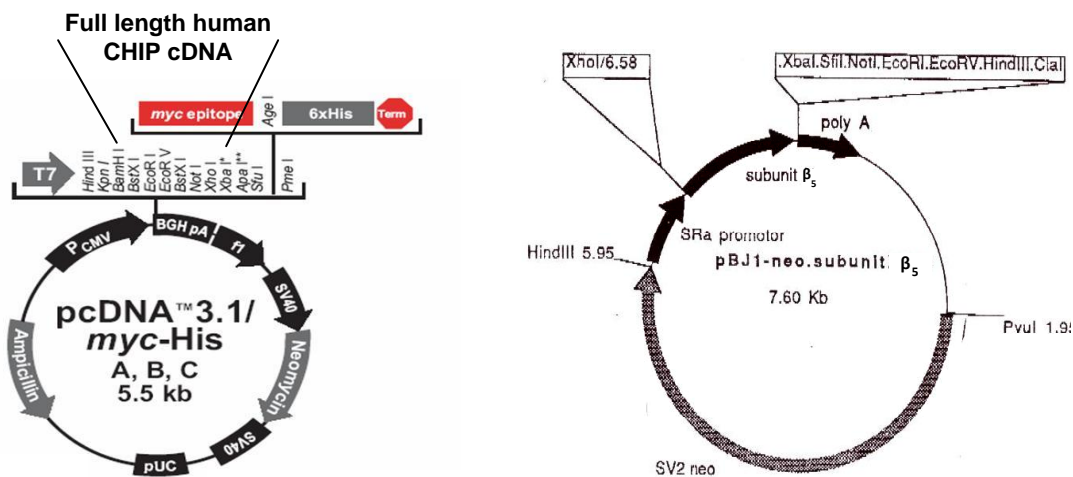
- ✓ Απόρριψη του υπερκειμένου και αναδιάλυση του ιζήματος των βακτηριακών κυττάρων με τη βοήθεια vortex σε 5 ml διαλύματος αναδιάλυσης των κυττάρων (Cell Resuspension Solution).
- ✓ Προσθήκη 5 ml διαλύματος λύσης των κυττάρων (Cell Lysis Solution) και ανακίνηση του σωλήνα 6-8 φορές, ώστε να αναμιχθούν τα διαλύματα.
- ✓ Προσθήκη 5 ml διαλύματος Neutralization Solution και ήπια ανάδευση, αναποδογυρίζοντας τα φιαλίδια 6-8 φορές.
- ✓ Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 8000 rpm για 10 λεπτά και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα.
- ✓ Προσθήκη 1 ml διαλύματος Quantum Prep matrix, ήπια ανάδευση για 15-30 δευ/πτα και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 8000 rpm.
- ✓ Απόρριψη του υπερκειμένου, προσθήκη 10 ml διαλύματος πλύσης στο ίζημα και αναδιάλυση του ιζήματος με ανάδευση.
- ✓ Φυγοκέντρηση σε 8000 rpm για 2 λεπτά, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 600 µl διαλύματος πλύσης.
- ✓ Μεταφορά του αναδιαλυμένου ιζήματος σε μία ειδική κολώνα φυγοκέντρησης μέσα σε ένα συλλεκτικό σωλήνα των 2 ml και φυγοκέντρηση για 30 δευ/πτα στις 12000 g.
- ✓ Αφαίρεση του διαλύματος πλύσης από τον πάτο του σωλήνα και προσθήκη 500 µl διαλύματος πλύσης στην κολώνα.
- ✓ Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 12000 g και αφαίρεση του διαλύματος πλύσης από τον πάτο του σωλήνα.
- ✓ Ακολουθούν άλλες δύο φυγοκεντρήσεις στις 14000 rpm για 2 λεπτά για να απομακρυνθεί το εναπομείναν διάλυμα πλύσης και έπειτα μεταφέρεται η κολώνα φυγοκέντρησης σε ένα νέο συλλεκτικό σωλήνα των 2 ml.
- ✓ Προσθήκη 600 µl TE στην κολώνα και φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 2 λεπτά.
- ✓ Απομάκρυνση της κολώνας και αποθήκευση του πλασμιδιακού DNA στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Φωτομέτρηση σε κυβέττες χαλαζία. Προκειμένου να υπολογιστεί η συγκέντρωση του DNA σε κάθε δείγμα, μετρίεται η οπτική του πυκνότητα στα 260 nm και στα 280 nm. Διάλυμα DNA με οπτική πυκνότητα 1 στα 260 nm περιέχει 50 µg DNA/ml. Η καθαρότητά του υποδηλώνεται από το λόγο  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ , ο οποίος πρέπει να είναι  $> 1.8$ .

### 2.2.23 Πέψεις DNA με τη χρήση των περιοριστικών ενδονουκλεασών

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι απομονώθηκε το σωστό πλασμίδιο, ακολούθησε πέψη του πλασμιδίου με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. Συγκεκριμένα, σε ένα μικρό σωλήνα μικροφυγοκέντρου προστίθενται τα παρακάτω:

1. 1  $\mu\text{g}$  DNA το οποίο θα υποστεί πέψη.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο δρα το ένζυμο, ώστε η συγκέντρωσή του στο μίγμα της αντίδρασης, από 10x να γίνει 1x.
3. Ο συνολικός όγκος του ενζύμου δεν πρέπει να ξεπερνά το 10% του συνολικού όγκου της πέψης (3 units ενζύμου/1  $\mu\text{g}$  DNA). Αυτό γιατί τα ένζυμα διατηρούνται μέσα σε γλυκερίνη, η οποία όμως σε αναλογία > 10% μέσα στο μίγμα της αντίδρασης, δρα ως απενεργοποιητής των ενζύμων. Εάν σε μια πέψη χρησιμοποιηθούν περισσότερα από ένα ένζυμα, ο παραπάνω περιορισμός ισχύει για το άθροισμα της ποσότητας των ενζύμων και όχι για καθένα ξεχωριστά.
4. ddH<sub>2</sub>O έως τελικό όγκο 20  $\mu\text{l}$ .

Το μίγμα επωάζεται για 180 λεπτά στους 37°C και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.



#### Εικόνα 20 Χάρτες Πλασμιδίων

Το πλασμίδιο pcDNA3.1/Myc-His-CHIP που περιέχει το cDNA για την ανθρώπινη CHIP λιγάση και το πλασμίδιο pBJ1-neo.subunitβ5 που περιέχει το cDNA για τη β5 πρωτεοσωμική υπομονάδα.

### 2.2.24 Επιμόλυνση των κυττάρων

- **Σταθερή επιμόλυνση κυττάρων (stable transfection)**

Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι το DNA που πρόκειται να εισαχθεί στο κύτταρο, περιβάλλεται από λιπιδικά μόρια. Στη συνέχεια, είτε αλληλεπιδρά άμεσα με την κυτταρική μεμβράνη είτε προσλαμβάνεται από το κύτταρο με ενδοκυττάρωση απουσία υποδοχέα. Η μέθοδος της επιμόλυνσης των κυττάρων με τη χρήση των λιπιδίων στηρίζεται αρχικά στη συμπύκνωση του μορίου DNA που πρόκειται να εισαχθεί στο κύτταρο κι αυτό εξασφαλίζεται ρυθμίζοντας την ιονική ισχύ και το pH του διαλύματος. Τα υψηλού βαθμού συμπύκνωσης μόρια DNA περιβάλλονται από λιπίδια που έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν μυκήλια και έτσι δημιουργούνται συμπυκνωμένα σύμπλοκα λιπιδίων-μορίων DNA. Τα σύμπλοκα αυτά, καθώς περιβάλλονται από μυκήλια προσκολλώνται και τελικά συντήκονται με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση των αθανατοποιημένων κυττάρων WI38/T με το πλασμίδιο pBJ1-neo.subunit β<sub>5</sub>. Χρησιμοποιήθηκε το kit της Qiagen, το οποίο παρέχει τα διαλύματα που απαιτούνται και συγκεκριμένα:

- α) το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer EC) που εξασφαλίζει το pH για την αντίδραση συμπύκνωσης του DNA,
- β) το διάλυμα ενίσχυσης της συμπύκνωσης των μορίων DNA (Enhancer),
- γ) τα λιπιδικά μόρια που θα περιβάλλουν τα συμπυκνωμένα μόρια του DNA κι έτσι θα μεταφερθούν στο εσωτερικό του κυττάρου (Effectene Transfection Reagent).

Συνοπτικά, τα στάδια είναι τα εξής:

- ✓ 4 x 10<sup>5</sup> κύτταρα επιστρώνονται σε τρυβλία petri παρουσία πλήρους θρεπτικού υλικού και καλλιεργούνται υπό τις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας (37°C και 5% CO<sub>2</sub>). 48 ώρες αργότερα, όταν η πυκνότητα των κυττάρων είναι περίπου 50 % ακολουθεί η επιμόλυνση.
- ✓ Αραίωση 1 μg DNA, διαλυμένου σε TE, με το Buffer EC μέχρι του όγκου των 150 μl και προσθήκη 8 μl διαλύματος Enhancer.
- ✓ Ανάμιξη με vortex για 1 δευτερόλεπτο και επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- ✓ Προσθήκη στο μίγμα της προηγούμενης αντίδρασης 25 μl διαλύματος Effectene Transfection Reagent και ανάμιξη με vortex για 10 δευτερόλεπτα.
- ✓ Επώαση του μίγματος για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να σχηματιστούν τα σύμπλοκα της επιμόλυνσης.

- ✓ Κατά τη διάρκεια της επώασης αυτής, πραγματοποιείται απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από τα κύτταρα και ξέπλυμα με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Προσθήκη 4 ml πλήρους θρεπτικού μέσου στα κύτταρα.
- ✓ Προσθήκη 1 ml πλήρους θρεπτικού μέσου στο σωλήνα που περιέχει τα σύμπλοκα της επιμόλυνσης και ανάμιξη με ήπιο πιπετάρισμα. Τέλος, το παραπάνω μίγμα προστίθεται στα κύτταρα και με ελαφρά ανακίνηση κατανέμεται ομοιόμορφα στο τρυβλίο.

Επειδή πρόκειται για σταθερή επιμόλυνση, τα επιμολυσμένα κύτταρα χωρίζονται σε διάφορες αραιώσεις ύστερα από 48 ώρες και διατηρούνται σε επιλεκτικό μέσο καλλιέργειας που περιέχει G418/νεομυκίνη ως αντιβιοτικό επιλογής. Έτσι, γίνεται επιλογή κυττάρων που έχουν ενσωματώσει το πλασμιδιακό DNA στο γονιδίωμά τους και εκφράζουν παράλληλα με το υπό μελέτη γονίδιο και το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο παραπάνω αντιβιοτικό, στο οποίο υπό κανονικές συνθήκες τα ευκαρυωτικά κύτταρα δεν επιβιώνουν. Το επιλεκτικό μέσο ανανεώνεται κάθε 3-4 ημέρες. Αποικίες σταθερών, αμιγών κλώνων απομονώνονται ύστερα από 3-4 εβδομάδες επιλογής/ανάπτυξης στο παραπάνω μέσο. Η απομόνωση των κλώνων γίνεται με τη χρήση πλαστικών κρίκων διαμέτρου 0,6 cm, οι οποίοι προσκολλώνται στο υπόστρωμα του τρυβλίου για να περιβάλλουν κάθε αποικία ξεχωριστά. Τα κύτταρα αποκολλώνται με τη βοήθεια θρυψίνης και κάθε κλώνος μεταφέρεται σε 24-well τρυβλίο. Όταν δημιουργηθεί πλήρες ταπήτιο, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και μεταφέρονται σε 6-well τρυβλίο και τέλος σε φλάσκα 75 cm<sup>2</sup>. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα επιμολυσμένα κύτταρα ελέγχονται ως προς την έκφραση των αντίστοιχων επιμολυσμένων γονιδίων με ανοσοστύπωμα κατά Western.

- **Προσωρινή επιμόλυνση κυττάρων**

Η προσωρινή επιμόλυνση των κυττάρων **α)** για την υπερέκφραση των πλασμιδίων pcDNA3.1/Myc-His-CHIP και PMT123 (HA-Ub), καθώς και των οχημάτων έκφρασης (πλασμίδια έκφρασης που δε φέρουν το cDNA των γονιδίων του ενδιαφέροντος) και **β)** για την αποσιώπηση των γονιδίων Mdm2 και CHIP με τα κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια siRNA (small interfering RNA), έγινε με τη χρήση της Lipofectamine 2000 της Invitrogen. Συνοπτικά, τα στάδια είναι τα εξής:

- ✓ Η κατάλληλη ποσότητα του DNA ή των siRNA διαλύεται σε μέσο καλλιέργειας χωρίς την προσθήκη ορμού (Opti-MEM) και ακολουθεί ήπια ανάμιξη.
- ✓ Αντίστοιχη ποσότητα λιποφεκταμίνης αναμιγνύεται με Opti-MEM και επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



- ✓ Η διαλυμένη λιποφεκταμίνη συνδυάζεται και αναμιγνύεται με το διαλυμένο DNA ή τα διαλυμένα siRNAs με ήπια ανακίνηση. Ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Τα σύμπλοκα προστίθενται στα κύτταρα και με ελαφρά ανακίνηση κατανέμονται ομοιόμορφα στο τρυβλίο.

Στην περίπτωση της υπερέκφρασης των γονιδίων, έπειτα από 24 ώρες, τα κύτταρα συλλέγονται και ακολουθεί ανάλυση κατά Western. Στην περίπτωση της αποσιώπησης του γονιδίου Mdm2, τα κύτταρα επιμολύνθηκαν δύο φορές με τα siRNA ολιγονουκλεοτίδια αφήνοντας διάστημα 24 ωρών να μεσολαβήσει μεταξύ των επιμολύνσεων και αναλύθηκαν με Western 48 ώρες αργότερα. Όμως, για την αποσιώπηση του γονιδίου CHIP, τα κύτταρα επιμολύνθηκαν δύο φορές αφήνοντας διάστημα 48 ωρών να μεσολαβήσει μεταξύ των επιμολύνσεων και αναλύθηκαν με Western 48 ώρες αργότερα. Σαν κύτταρα-μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επιμολύνθηκαν με ολιγονουκλεοτίδια siRNA που δεν περιείχαν κανένα στόχο (siCON). Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 4.

siMdm2	GCCAGUAUAUUAUGACUAA, GAACAAGAGACCCUGGUUA, GAAUUUAGACAACCUGAAA, GAUGAGAAGCAACAACAUA	On-target Smartpool (Dharmacon)
siCHIP	CGCUGGUGGCCGUGUAUUA, GUGGAGGACUACUGAGGUU, GAAGGAGGUUAUUGACGCA, UGGAAGAGUGCCAGCGAAA	On-target Smartpool (Dharmacon)

**Πίνακας 4 Ολιγονουκλεοτίδια siRNA**

### 2.2.25 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση και τα γραφήματα πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του Microsoft Excel. Η πυκνομετρική ανάλυση, δηλαδή η ποσοτικοποίηση των ανοσοστυπωμάτων κατά Western, έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος Image Quant 5.2. Όλες οι τιμές τόσο στους πίνακες όσο και στα γραφήματα, απεικονίζονται ως ο μέσος όρος 3 ανεξάρτητων μετρήσεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση (standard deviation, SD), εκτός αν αναφέρεται κάτι διαφορετικό. Οι μετρήσεις εκφράζονται ως % ποσοστά, όπου ως 100% ορίζεται, αυθαίρετα

κάθε φορά, η μέτρηση στα κύτταρα - μάρτυρες (CON, control). Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου ελέγχου διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA Single Factor Test) και η τιμή  $p$  (p-value) χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να καθοριστεί το επίπεδο σημαντικότητας των αποτελεσμάτων. Στα παρόντα πειράματα, το επίπεδο σημαντικότητας ( $\alpha$ ) ορίστηκε ως  $\alpha > 99\%$ , με  $p < 0,01$  ή  $p < 0,05$ , δηλαδή η πιθανότητα οι αναφερόμενες διαφορές στις τιμές μεταξύ των συγκρινόμενων δειγμάτων να οφείλονται σε τυχαιότητα και να μην είναι αληθείς, να είναι μικρότερη του 1% ή του 5%, αντίστοιχα.

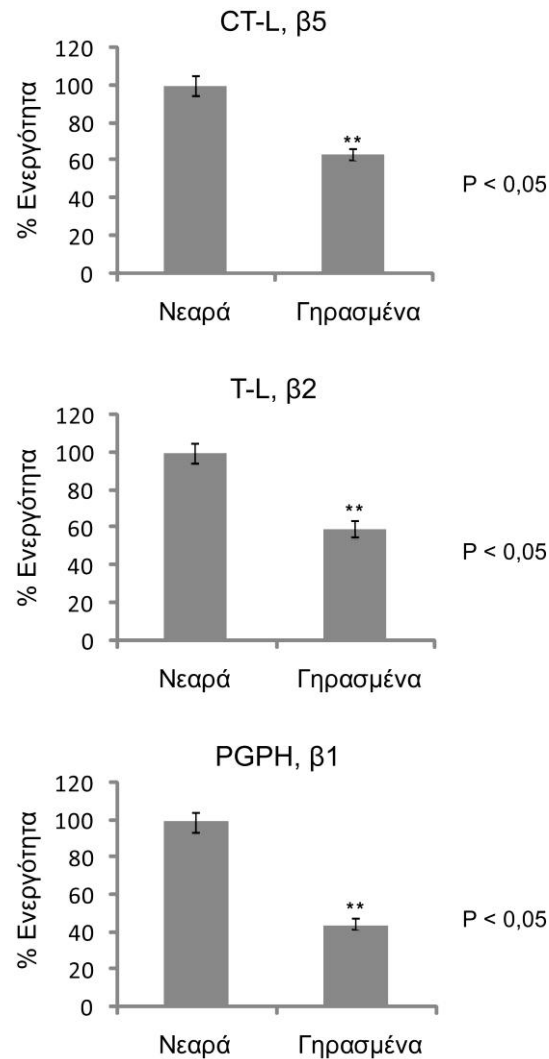
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Κυτταρική γήρανση HFL-1 εμβρυικών ινοβλαστών

Προτού προχωρήσουμε στη μελέτη του πρωτεολυτικού συστήματος των HFL-1 κυττάρων, ελέγξαμε συγκεκριμένους δείκτες κυτταρικής γήρανσης, όπως είναι οι μειωμένες πρωτεολυτικές ενεργότητες και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης p16. Οι δείκτες αυτοί είναι ενδεικτικοί για τη γήρανση άλλων κυτταρικών σειρών, όπως οι ανθρώπινοι εμβρυϊκοί ινοβλάστες WI38, IMR90 και MRC5 [386, 387].

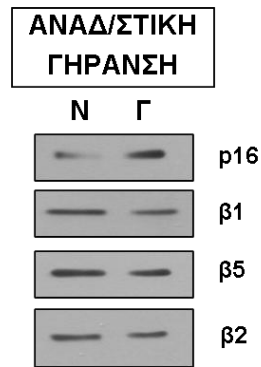
Για το λόγο αυτό, ανθρώπινοι εμβρυϊκοί ινοβλάστες HFL-1 καλλιεργήθηκαν έως τη φάση της μη αντιστρεπτής απώλειας της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας και απομονώθηκαν πρωτεΐνες από νεαρά (CPD < 25) και γηρασμένα (CPD > 57) *in vitro* κύτταρα. Αρχικά, μετρήθηκαν οι ειδικές πρωτεολυτικές ενεργότητες του πρωτεοσώματος, ενώ πραγματοποιήθηκε και ανάλυση κατά Western των β-καταλυτικών υπομονάδων του πρωτεοσώματος. Στην εικόνα 21, τα γραφήματα απεικονίζουν τα επίπεδα των ενεργοτήτων χυμοθρυψίνης ( $\beta_5$ ), πεπτιδυλογλουτάμυλο-υδρολάσης ( $\beta_1$ ) και θρυψίνης ( $\beta_2$ ) ανάμεσα σε νεαρά και γηρασμένα *in vitro* HFL-1 κύτταρα. Οι τρεις ειδικές ενεργότητες βρέθηκαν στατιστικά σημαντικά μειωμένες στα γηρασμένα κύτταρα σε σχέση με τα νεαρά (1,56 φορές για την ενεργότητα χυμοθρυψίνης, 1,6 φορές για την ενεργότητα πεπτιδυλογλουτάμυλο-υδρολάσης και 2,27 φορές για την ενεργότητα θρυψίνης) με μεγαλύτερη μείωση στην ενεργότητα πεπτιδυλογλουτάμυλο-υδρολάσης (Εικ. 21).

Στη συνέχεια, ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης των β-καταλυτικών υπομονάδων του πρωτεοσώματος με ανάλυση κατά Western (Εικ. 22). Τα επίπεδα των υπομονάδων που αποτελούν τα καταλυτικά κέντρα του πυρήνα του πρωτεοσώματος,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  και  $\beta_5$ , που φέρουν τα ενεργά κέντρα για τις ενεργότητες πεπτιδυλογλουτάμυλο-υδρολάσης, θρυψίνης και χυμοθρυψίνης αντίστοιχα [388-391], βρέθηκαν μειωμένα στα γηρασμένα κύτταρα σε σχέση με τα νεαρά, σε συμφωνία και με προηγούμενη μελέτη [386].



### Εικόνα 21 Ενεργότητες πρωτεοσώματος σε νεαρά και γηρασμένα HFL-1 κύτταρα

Οι ενεργότητες εκφράστηκαν ως εκατοστιαία ποσοστά, όπου σαν 100% ορίστηκε ο μέσος όρος των τιμών ενεργοτήτων που ανιχνεύτηκαν στα νεαρά κύτταρα. Και οι τρεις ενεργότητες βρέθηκαν σημαντικά μειωμένες ( $p < 0,05$ ) στα γηρασμένα κύτταρα σε σχέση με τα νεαρά. Η ανίχνευση των ενεργοτήτων έγινε με 10 μg πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κάθε δείγμα. Η κλίμακα που χρησιμοποιείται στον κάθετο άξονα είναι λογαριθμική. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων μετρήσεων  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD). Οι τιμές που αναγράφονται δίπλα από κάθε γράφημα αποτελούν τις τιμές  $p$  ( $p$ -value) που προκύπτουν από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του ελέγχου διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA Single Factor Test). Οι τιμές αυτές προκύπτουν από τη σύγκριση των τιμών ενεργοτήτων των διαφορετικών, ανεξάρτητων μετρήσεων για τα γηρασμένα κύτταρα και για κάθε ενεργότητα ξεχωριστά με τις αντίστοιχες τιμές για τα νεαρά κύτταρα. Τιμή  $p < 0,05$  σημαίνει ότι η πιθανότητα οι παρατηρούμενες διαφορές στις ενεργότητες ανάμεσα στα νεαρά και στα γηρασμένα κύτταρα, να οφείλονται σε τυχαιότητα και να μην είναι αληθείς, είναι μικρότερη του 5%.



**Εικόνα 22** Ανάλυση κατά Western των καταλυτικών υπομονάδων του 20S πρωτεοσωμικού συμπλόκου σε νεαρά και γηρασμένα HFL-1 κύτταρα

Ανοσοστύπωμα κατά Western πρωτεοσωμικών υπομονάδων του 20S ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  και  $\beta_5$ ). Ηλεκτροφορήθηκαν 10  $\mu\text{g}$  ολικής πρωτεΐνης. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο γηρασμένος φαινότυπος των κυττάρων, στη μεμβράνη έγινε και ανίχνευση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης p16. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

**Συμπέρασμα 1:**

Επομένως, τα HFL-1 κύτταρα είναι ιδανικά για τη μελέτη των πρωτεολυτικών μηχανισμών που ενδιαφέρουν αυτήν τη διατριβή, δεδομένου ότι παρουσιάζουν τους χαρακτηριστικούς δείκτες οι οποίοι είναι ενδεικτικοί του φαινομένου της κυτταρικής γήρανσης.

### 3.2 Μελέτη της έκφρασης συγκεκριμένων τύπων E3 ενζύμων (λιγάσες ουμπικιτίνης) σε νεαρά και γηρασμένα HFL-1 κύτταρα

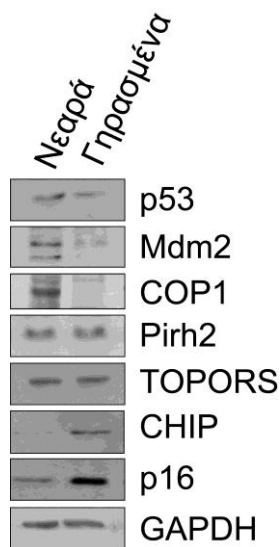
Είναι πλέον γνωστό ότι καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και ιδιαίτερα στην απόφαση για παύση του πολλαπλασιασμού και είσοδο του κυττάρου σε φάση γήρανσης διαδραματίζει ο μεταγραφικός παράγοντας p53, αλλά και τα μόρια – αναστολείς των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών, p21 και p27. Αυτά τα μόρια συνεχώς παράγονται και αποδομούνται από το 26S πρωτεόσωμα με τη συμβολή συγκεκριμένων ενζύμων, των E3 λιγασών. Ειδικότερα, η ουμπικιτυλίωση της p53 μεσολαβείται από αρκετά μόρια, πέντε από τα οποία θεωρούνται μέχρι σήμερα ότι είναι τα πιο βασικά, Mdm2, COP1, CHIP, Pirh2 και Topors (βλ. §1.4.3 και §1.4.4). Αντίθετα, η αποδόμηση των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου, p21 και p27, ρυθμίζεται από το σύμπλοκο SCF που διαθέτει μία υπομονάδα με ενεργότητα λιγάσης (βλ. Εικ. 10). Προκειμένου να μελετηθεί η συμβολή και ο πιθανός ρόλος αυτών των ενζύμων στη ρύθμιση της p53 και των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου, ανθρωπίνοι εμβρυικοί ινοβλάστες πνεύμονα HFL-1 καλλιεργήθηκαν *in vitro* μέχρι την παύση του πολλαπλασιασμού τους και απομονώθηκαν από τα κύτταρα αυτά πρωτεΐνες και RNA, για τη μελέτη της έκφρασης της p53 πρωτεΐνης και των λιγασών αυτής, καθώς και των υπομονάδων του συμπλόκου SCF, σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα.

#### 3.2.1 Βιοχημική μελέτη της έκφρασης της p53 πρωτεΐνης και των λιγασών αυτής κατά τη γήρανση των ινοβλαστών HFL-1

##### 3.2.1.1 Αναδιπλασιαστική γήρανση

Πολύ συχνά αναφέρεται η δράση των E3 λιγασών της πρωτεΐνης p53 σε διάφορους τύπους καρκίνους, όπου συνήθως υπερεκφράζονται, αλλά πολύ λίγα είναι γνωστά για το ρόλο τους στα φυσιολογικά κύτταρα και ιδιαίτερα στην εξέλιξη του φαινομένου της αναδιπλασιαστικής γήρανσης. Για το σκοπό αυτό, HFL-1 ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν έως τη φάση της μη αντιστρεπτής απώλειας της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας και απομονώθηκαν πρωτεΐνες από νεαρά (CPD<25) και γηρασμένα (CPD>57) *in vitro* κύτταρα για την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της p53 και των λιγασών αυτής. Όπως φαίνεται στην εικόνα 23, η p53 βρέθηκε μειωμένη στα γηρασμένα κύτταρα σε σχέση με τα αρχικά της επίπεδα, όπως αυτά παρουσιάζονται στους νεαρούς ινοβλάστες. Πάντως, το πρότυπο ουμπικιτυλίωσης και πρωτεόλυσης της p53 φαίνεται να αλλάζει καθώς τα κύτταρα γερνάνε. Ειδικότερα, ο έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων των λιγασών της p53 αποκάλυψε ότι η Mdm2 και η COP1

μειώνονται σημαντικά, ενώ η Pirh2 και η Topors δε διαφοροποιούνται. Η μείωση που παρατηρήθηκε στα επίπεδα των λιγασών Mdm2 και COP1 μπορεί να εξηγηθεί πιθανά από το γεγονός ότι αποτελούν μεταγραφικούς στόχους της p53. Η μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση της p53 μπορεί να συνεπάγεται και μειωμένη λειτουργικότητα ως προς τη μεταγραφική δράση της p53, που δεν επιτρέπει τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων της Mdm2 και COP1. Αντίθετα, η CHIP είναι η μόνη λιγάση από αυτές που μελετήθηκαν, η οποία έχει αξιοσημείωτα αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα στη φάση γήρανσης των κυττάρων.



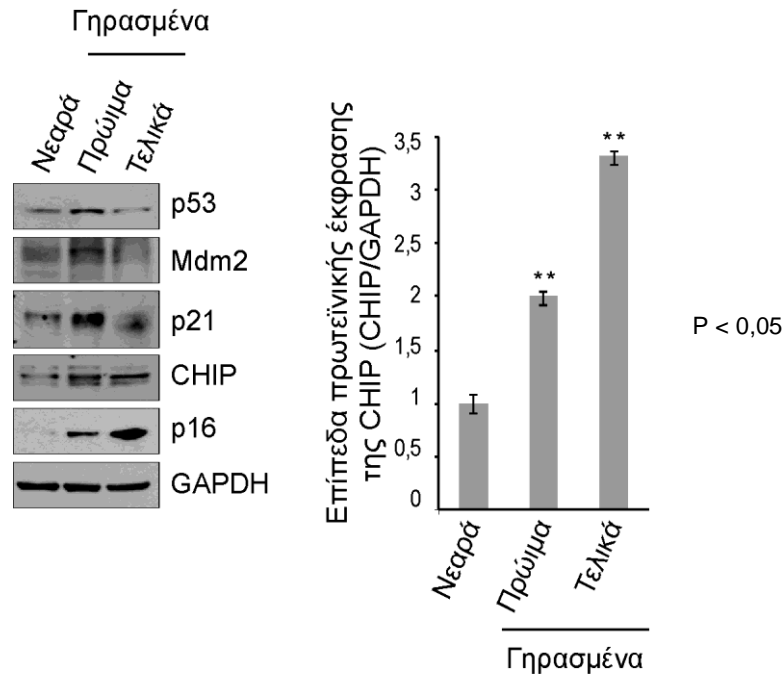
### Εικόνα 23 Ανάλυση κατά Western των E3 λιγασών της p53 πρωτεΐνης σε νεαρούς και γηρασμένους ινοβλάστες

Ανοσοστύπωμα κατά Western της p53 και των E3 ενζύμων Mdm2, COP1, Pirh2, TOPORS και CHIP. Ηλεκτροφορήθηκαν 50 μg ολικής πρωτεΐνης. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο γηρασμένος φαινότυπος των κυττάρων, στη μεμβράνη έγινε και ανίχνευση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης p16. Για τον έλεγχο του ισόποσου φορτώματος μεταξύ των διάφορων δειγμάτων, ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα έκφρασης της GAPDH. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

Για να καθοριστεί το πρότυπο έκφρασης της CHIP λιγάσης σε σύγκριση με την p53 καθώς οι ινοβλάστες γερνάνε, αναλύθηκαν τα πρωτεϊνικά τους επίπεδα σε νεαρά, πρώιμα γηρασμένα (μέσης ηλικίας) και τελικά γηρασμένα κύτταρα. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [342, 392, 393], η πρωτεΐνη p53 και τα γονίδια-στόχοι της, p21 και Mdm2, βρέθηκαν αυξημένα κατά τις πρώιμα γηρασμένες συνθήκες, ενώ μειώθηκαν σημαντικά μόλις τα κύτταρα τελικά γέρασαν. Σε αντίθεση, τα επίπεδα έκφρασης της CHIP λιγάσης βαθμιαία αυξάνονταν, φτάνοντας σε ένα επίπεδο περίπου 3,5 φορές υψηλότερο στους τελικά γηρασμένους ινοβλάστες (Εικ. 24).

Λόγω της αυξημένης έκφρασης της CHIP λιγάσης σε επίπεδο πρωτεΐνης κατά την εξέλιξη του φαινομένου της γήρανσης, ελέγχθηκε η πιθανότητα η αύξηση αυτή να οφείλεται σε ρύθμιση και σε μεταγραφικό επίπεδο. Απομονώθηκε RNA από νεαρά και γηρασμένα HFL-1 κύτταρα και ελέγχθηκαν τα επίπεδα mRNA έκφρασης της CHIP με τη χρήση PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR). Όπως φαίνεται στην εικόνα 25, τα επίπεδα έκφρασης

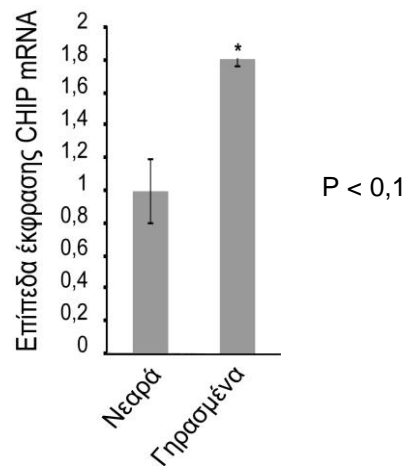
της CHIP λιγάνης αυξάνονται στα γηρασμένα σε σύγκριση με τα νεαρά κύτταρα κατά 1,8 φορές.



#### Εικόνα 24 Ανάλυση κατά Western της έκφρασης της CHIP λιγάνης κατά την εξέλιξη του φαινομένου της αναδιπλασιαστικής γήρανσης

Απομονώθηκαν πρωτεΐνες από νεαρά, μέσης ηλικίας (πρώιμα γηρασμένα) και τελικά γηρασμένα κύτταρα. Ηλεκτροφορήθηκαν 50  $\mu$ g ολικής πρωτεΐνης. Για τον έλεγχο του ισόποσου φορτώματος μεταξύ των δειγμάτων, ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα έκφρασης της GAPDH. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι. Στο δεξί μέρος της εικόνας απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση της CHIP από το ανοσοστύπωμα με τη βοήθεια πυκνομετρητή. Η κλίμακα που χρησιμοποιείται στον κάθετο άξονα είναι λογαριθμική. Οι τιμές έχουν εκφραστεί ως % ποσοστά, όπου ως 1 (100%) έχει οριστεί η τιμή στα νεαρά κύτταρα. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων μετρήσεων  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD). Η τιμή p (p-value) προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια ελέγχου διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA Single Factor Test). Τιμή  $p < 0,05$  σημαίνει ότι η πιθανότητα οι παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα στα νεαρά και γηρασμένα κύτταρα, να οφείλονται σε τυχαιότητα και να μην είναι αληθείς, είναι μικρότερη του 0,05 %.





**Εικόνα 25 RNA επίπεδα έκφρασης της CHIP λιγάσης σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα**  
Ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα RNA έκφρασης της CHIP λιγάσης σε νεαρά και γηρασμένα HFL-1 κύτταρα. Ο μέσος όρος των τιμών RNA έκφρασης στα νεαρά κύτταρα ορίστηκε ως 1. Η κλίμακα που χρησιμοποιείται στον κάθετο άξονα είναι λογαριθμική. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων μετρήσεων  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD). Η τιμή p (p-value) προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια ελέγχου διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA Single Factor Test). Τιμή  $p < 0,1$  σημαίνει ότι η πιθανότητα οι παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα στα νεαρά και γηρασμένα κύτταρα, να οφείλονται σε τυχαιότητα και να μην είναι αληθείς, είναι μικρότερη του 0,1 %.

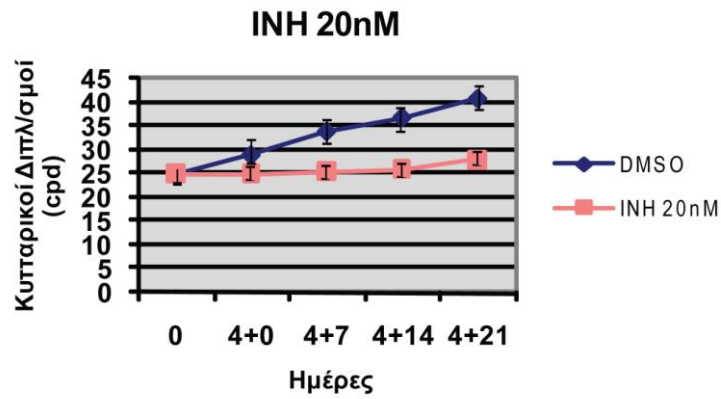
### 3.2.1.2 Πρώιμα επαγόμενη γήρανση λόγω μερικής πρωτεοσωμικής αναστολής

Με βάση τις παραπάνω αναλύσεις είναι φανερό ότι η CHIP λιγάση διαδραματίζει κάποιο ιδιαίτερο ρόλο στη ρύθμιση της p53 κατά την εξέλιξη του φαινομένου της γήρανσης, καθώς αυξάνει τόσο σε μεταγραφικό όσο και πρωτεϊνικό επίπεδο. Προκειμένου να επιβεβαιωθούν αυτά τα αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκε μερική και συνεχής αναστολή της δράσης του πρωτεοσώματος για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα σε νεαρά, φυσιολογικά, εμβρυϊκά κύτταρα, μία διαδικασία η οποία έχει προηγουμένως δειχθεί ότι οδηγεί σε πρόιμη κυτταρική γήρανση [30, 327]. Για την αναστολή της δράσης του πρωτεοσώματος στα νεαρά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός πρωτεοσωμικός αναστολέας, η εποξομισίνη. Πρόκειται για ένα μη αντιστρεπτό αναστολέα, που αναστέλλει κυρίως τις ενεργότητες χυμοθρυψίνης και θρυψίνης και σε χαμηλότερο επίπεδο την ενεργότητα πεπτιδυλογλουτάμυλο-υδρολάσης. Δεδομένου ότι πλήρης αναστολή του πρωτεοσώματος για μεγάλα χρονικά διαστήματα ενεργοποιεί τον αποπτωτικό μηχανισμό [394], ο αναστολέας αυτός χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη συνεχούς (καθ' όλης της διάρκειας του πειράματος) αλλά μερικής (όσον αφορά στα

επίπεδα εναπομένουσας ενεργότητας στα κύτταρα) αναστολής του πρωτεοσώματος, ώστε να επιτραπεί η επιβίωση των κυττάρων.

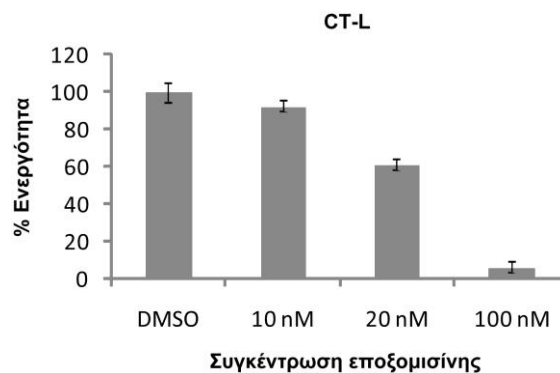
Εξετάστηκε ένα εύρος διαφορετικών συγκεντρώσεων εποξομισίνης (10 nM έως 100 nM) για διάφορα χρονικά διαστήματα (1 ώρα έως 4 ημέρες) και βρέθηκε πως η χρήση 20 nM εποξομισίνης σε νεαρά HFL-1 κύτταρα προσομοιάζε τα επίπεδα πρωτεοσωμικών ενεργοτήτων που ανιχνεύονται στα φυσιολογικά γηρασμένα HFL-1 κύτταρα (μείωση περίπου 40% - 60% της ενεργότητας των νεαρών κυττάρων, κυρίως όσον αφορά την ενεργότητα χυμοθρυψίνης).

Όπως έχει προηγουμένα αναφερθεί, η προσθήκη 20 nM εποξομισίνης σε WI38 κύτταρα συνεχόμενα για 4 ημέρες οδηγεί σε πρόιμη γήρανση των κυττάρων [327]. Ταυτόχρονα, κατά την αφαίρεση του αναστολέα από το μέσο καλλιέργειας, οι πρωτεοσωμικές ενεργότητες των κυττάρων δεν επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα, όπως αυτά ήταν πριν από την προσθήκη του αναστολέα. Σε συμφωνία με αυτήν τη μελέτη, η χορήγηση 20 nM εποξομισίνης σε HFL-1 κύτταρα συνεχόμενα για 4 ημέρες οδήγησε σε απώλεια της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων, μία κατάσταση που προσομοιάζει το φαινόμενο της επαγόμενης γήρανσης. Συγκεκριμένα, νεαρά κύτταρα HFL-1 δέχτηκαν την επίδραση 20nM εποξομισίνης για 4 συνεχόμενες ημέρες (προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανή απενεργοποίηση του αναστολέα κατά τη συνεχή παραμονή του στους 37°C, η προσθήκη αυτού ανανεωνόταν καθημερινά) και τα κύτταρα παρέμειναν στην καλλιέργεια για δύο επιπλέον εβδομάδες μετά την απομάκρυνση του αναστολέα. Στη συνέχεια, καταμετρήθηκε ο αριθμός των κυτταρικών διπλασιασμών (Εικ. 26), αλλά και οι πρωτεοσωμικές ενεργότητες (Εικ. 27) και εξετάστηκε η αντίδραση των κυττάρων σε χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης (Εικ. 28), που αποτελεί δείκτη κυτταρικής γήρανσης.



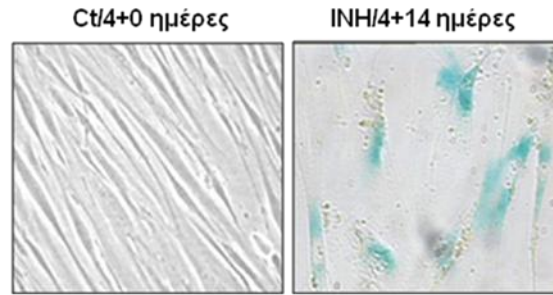
**Εικόνα 26** Κυτταρικοί διπλασιασμοί HFL-1 κυττάρων έπειτα από επίδραση με 20nM εποξιομίσινης

Τα κύτταρα δέχτηκαν την επίδραση 20 nM εποξιομίσινης (INH) ή του διαλύτη DMSO για 4 συνεχόμενες ημέρες και καταμετρήθηκαν, από όπου προέκυψε ο αριθμός των κυτταρικών διπλασιασμών που πραγματοποίησαν αμέσως μετά την αγωγή (4+0 μέρες) του αναστολέα, μία (4+7 μέρες), δύο (4+14 μέρες) και τρεις (4+21 μέρες) εβδομάδες μετά την απομάκρυνσή του. Τα κύτταρα ξεκίνησαν από cpd ίσο με 25 και τα μεν κύτταρα μάρτυρες (ct, DMSO) έφτασαν σε cpd ίσο με 40 περίπου μετά από τρεις εβδομάδες (4+21 μέρες), ενώ αυτά που δέχτηκαν την επίδραση της εποξιομίσινης παρέμειναν σχεδόν στα ίδια επίπεδα. Η κλίμακα που χρησιμοποιείται στον κάθετο άξονα είναι λογαριθμική. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων μετρήσεων  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD).



**Εικόνα 27** Ενεργότητα χυμοθρυψίνης HFL-1 κυττάρων έπειτα από επίδραση για 2 ώρες με διάφορες συγκεντρώσεις εποξιομίσινης

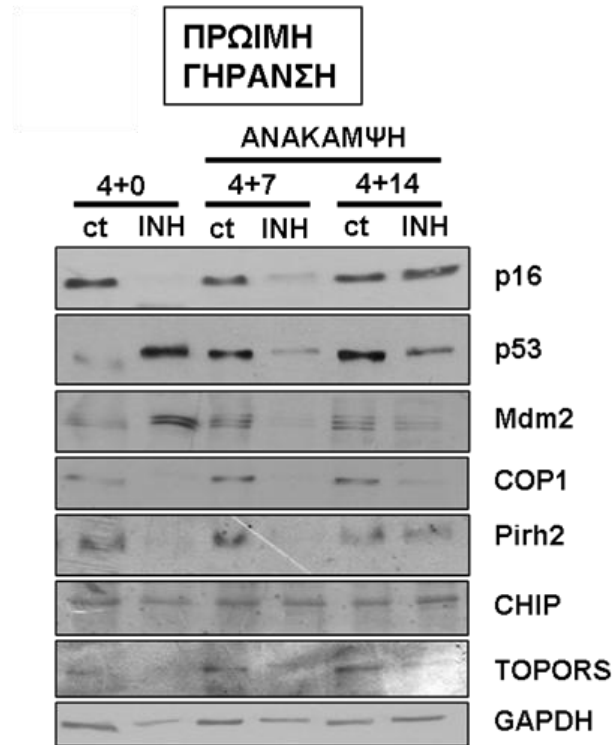
Οι ενεργότητες εκφράστηκαν ως εκατοστιαία ποσοστά, όπου σαν 100 % ορίστηκε ο μέσος όρος των τιμών ενεργότητας χυμοθρυψίνης που ανιχνεύτηκε στα κύτταρα μάρτυρες (DMSO). Χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις εποξιομίσινης (10, 20 και 100 nM) για 2 ώρες και απομονώθηκαν πρωτεΐνες. Σε 10  $\mu$ g πρωτεϊνικού εκχυλίσματος έγινε μέτρηση της ενεργότητας. Η κλίμακα που χρησιμοποιείται στον κάθετο άξονα είναι λογαριθμική. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων μετρήσεων  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD).



**Εικόνα 28 Χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης HFL-1 που δέχτηκαν την επίδραση 20 nM εποξομισίνης**

Τα κύτταρα που δέχτηκαν επίδραση 20 nM εποξομισίνης (INH) παρουσίασαν θετική χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης (μπλε χρώμα) κατά αναλογία με τα φυσιολογικώς γηρασμένα κύτταρα και σε αντίθεση με τα κύτταρα μάρτυρες (Ct) που ήταν αρνητικά στη χρώση SA-β-γαλακτοσιδάσης. Η χρώση πραγματοποιήθηκε δύο εβδομάδες (4+14 ημέρες) μετά από την τελευταία προσθήκη του αναστολέα στις καλλιέργειες.

Σε αυτές τις συνθήκες, λοιπόν, μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση των λιγασών της p53 πρωτεΐνης, προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι αρχικές παρατηρήσεις κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση των ινοβλαστών (Εικ. 23). Έτσι, όπως φαίνεται στην εικόνα 29, βρέθηκε ότι τα επίπεδα p53 αυξάνονται αμέσως μετά τη χορήγηση (4+0 μέρες) του αναστολέα, εξαιτίας του ακαριαίου στρες, ενώ τα επίπεδά της μειώνονται καθώς τα κύτταρα εισέρχονται σε φάση πρώιμης γήρανσης. Η λιγάση Mdm2, επίσης αυξήθηκε αμέσως μετά τη χορήγηση (4+0 μέρες) του αναστολέα, για να ακολουθήσει μία μείωση στα πρωτεϊνικά της επίπεδα δύο εβδομάδες μετά την απομάκρυνσή του (4+14 μέρες), όταν τα κύτταρα αποκτούν το γηρασμένο φαινότυπο. Οι λιγάσες COP1, Pirh2 και Topors ουσιαστικά δεν παρουσιάζουν αλλαγές στο προφίλ της πρωτεϊνικής τους έκφρασης κατά τη διάρκεια του πειράματος σε αντιστοιχία με το πρότυπο έκφρασης κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση. Είναι αξιοσημείωτη, όμως, η αυξημένη έκφραση της CHIP λιγάσης ως αποτέλεσμα της επαγωγής της πρώιμης γήρανσης (Εικ. 29), όπως άλλωστε αναμενόταν με βάση τα ευρήματα από την αναδιπλασιαστική γήρανση (Εικ. 23).

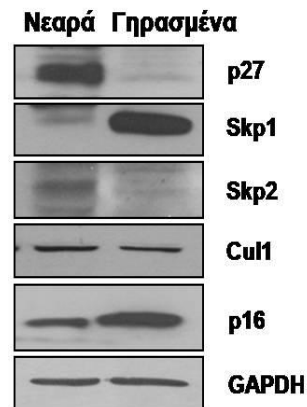


**Εικόνα 29** Ανάλυση κατά Western της p53 και των λιγασών της κατά την πρόιμη γήρανση που επάγεται από μερική αναστολή του πρωτεοσώματος

Τα κύτταρα δέχτηκαν την επίδραση 20 nM εποξομισίνης (INH) ή την επίδραση του διαλύτη DMSO (control, ct) για 4 συνεχόμενες ημέρες και απομονώθηκαν πρωτεΐνες αμέσως μετά την αγωγή (4+0 μέρες) του αναστολέα, μία εβδομάδα (4+7 μέρες) και δύο εβδομάδες (4+14 μέρες) μετά την απομάκρυνσή του (περίοδος ανάκαμψης). Ηλεκτροφορήθηκαν 40 μg ολικής πρωτεΐνης. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο γηρασμένος φαινότυπος των κυττάρων, στη μεμβράνη έγινε και ανίχνευση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης p16. Για τον έλεγχο του ισόποσου φορτώματος μεταξύ των διάφορων δειγμάτων, ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα έκφρασης της GAPDH. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

### 3.2.2 Βιοχημική μελέτη του συμπλόκου SCF κατά την εξέλιξη του φαινομένου της αναδιπλασιαστικής γήρανσης

Παράλληλα με τη μελέτη της p53 και των λιγασών της, ελέγχθηκαν και τα επίπεδα των υπομονάδων του SCF συμπλόκου, το οποίο είναι γνωστό ότι διαθέτει ενεργότητα λιγάσης και ευθύνεται για την ουμπικιτυλίωση και περαιτέρω αποδόμηση μεγάλου αριθμού μορίων (βλ. Εισαγωγή §1.4.1). Στόχος αυτής της μελέτης ήταν να εξακριβωθεί η έκφραση των υπομονάδων του συμπλόκου SCF, Skp1, Skp2 και Cul1, καθώς επίσης και των διάφορων υποστρωμάτων του (βλ. Εικ. 10), ανάμεσα σε νεαρούς και γηρασμένους ινοβλάστες. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη Skp2 βρέθηκε μειωμένη, ενώ η Skp1 αυξημένη στα γηρασμένα κύτταρα. Αντίθετα, η Cul1 δεν εμφάνισε σημαντική διαφορά καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ενδεικτικά, ένα από τα υποστρώματά του, ο αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p27, βρέθηκε μειωμένος κατά τη γήρανση των κυττάρων.



### Εικόνα 30 Ανάλυση κατά Western των υπομονάδων του SCF συμπλόκου κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση

Απομονώθηκαν πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από νεαρά και γηρασμένα κύτταρα και αναλύθηκαν με ανοσοστύπωμα 20 μg ολικής πρωτεΐνης. Για να επιβεβαιωθεί ο γηρασμένος φαινότυπος των κυττάρων έγινε ανίχνευση της p16 και για τον έλεγχο του ισόποσου φορτώματος μεταξύ των διάφορων δειγμάτων ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα της GAPDH. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

Κατά τον έλεγχο, όμως, των πρωτεϊνικών επιπέδων των υπομονάδων του συμπλόκου, προέκυψαν κάποια αποτελέσματα, τα οποία παρά την επαναληψιμότητα που παρουσίαζαν, ήταν διαφορετικά από προηγούμενες παρατηρήσεις. Λόγω των αμφιβολιών που προέκυψαν, δεν ήταν δυνατό να συνεχιστεί ο έλεγχος και των υπόλοιπων υποστρωμάτων αυτού του συμπλόκου.

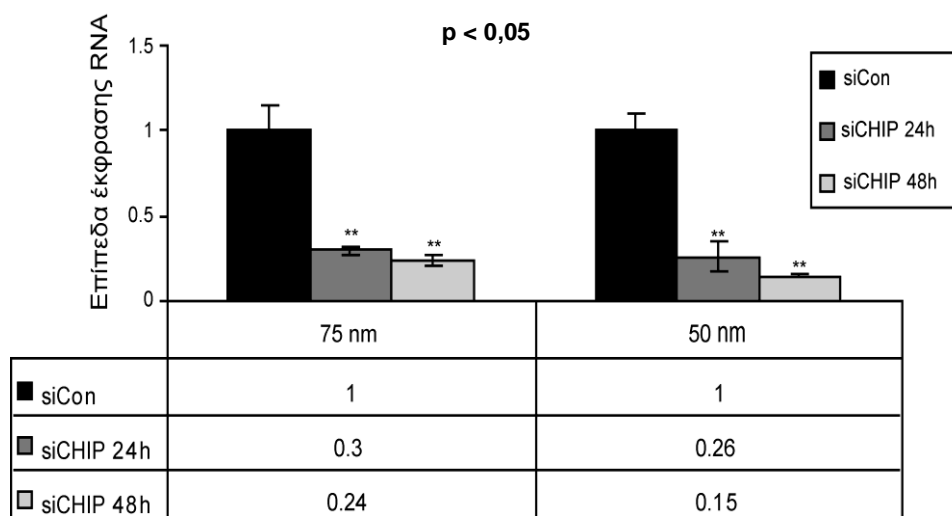
### **Συμπέρασμα 2:**

Συνολικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι προκειμένου να εισέλθουν τα ανθρώπινα κύτταρα σε φάση γήρανσης είναι αναγκαία μία αρχική αύξηση στα επίπεδα της πρωτεΐνης p53 στο μέσο της ηλικίας των κυττάρων, η οποία εξασθενεί στη συνέχεια, μέχρι που σχεδόν εξαφανίζεται όταν τα κύτταρα έχουν τελικά γεράσει. Δεδομένης της διαφορετικής ενζυμικής κινητικότητας των λιγασών της p53, όπως προκύπτει από τη μελέτη τόσο του φαινομένου της αναδιπλασιαστικής γήρανσης όσο και της πρώιμα επαγόμενης γήρανσης λόγω μερικής πρωτεοσωμικής αναστολής, η ρύθμιση της p53 στα κύτταρα φαίνεται να συμβαίνει σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο και συγκεκριμένα στο επίπεδο της ουμπικιτυλίωσης και της περαιτέρω αποδόμησης της p53. Ιδιαίτερο ρόλο από το σύνολο των μορίων που ρυθμίζουν την ουμπικιτυλίωση της p53 πιθανότατα κατέχει η CHIP λιγάση, η οποία επάγεται σημαντικά καθώς τα κύτταρα γερνάνε.

### 3.3 Μελέτη της CHIP λιγάσης στην αναδιπλασιαστική γήρανση

#### 3.3.1 Αποσιώπηση της έκφρασης της CHIP λιγάσης οδηγεί σε πρόωρη γήρανση *in vitro*

Δεδομένου ότι από τα E3 ένζυμα της p53 πρωτεΐνης, μόνο η CHIP λιγάση αυξάνει καθώς τα κύτταρα εισέρχονται σε φάση γήρανσης και γνωρίζοντας ότι ποντίκια στα οποία έχει αφαιρεθεί το γονίδιο της CHIP γερνάνε πρόωρα [395], ελέγχθηκε η καταστολή της έκφρασης της CHIP *in vitro* σε ανθρώπινους ινοβλάστες. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αποσιώπησης της έκφρασης γονιδίων (small interfering RNA, siRNA) σε νεαρούς ανθρώπινους ινοβλάστες HFL-1, με σκοπό να μειωθεί στο ελάχιστο η έκφραση της CHIP. Αρχικά, βρέθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για τη βέλτιστη μείωση της έκφρασης του γονιδίου CHIP στην κυτταρική σειρά HFL-1. Συγκεκριμένα, HFL-1 ινοβλάστες επιμολύνθηκαν με τα κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια (siCHIP) ή ολιγονουκλεοτίδια μάρτυρες (siCon) στις συγκεντρώσεις 50 και 75 nM για 24 και 48 ώρες και μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της CHIP με τη μέθοδο της Real-Time PCR (Εικ. 31). Η μέγιστη μείωση στην έκφραση της CHIP παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση 50 nM για 48 ώρες και συγκεκριμένα κατά 85%.



**Εικόνα 31** Επίπεδα έκφρασης RNA της CHIP λιγάσης σε νεαρά κύτταρα έπειτα από αποσιώπηση της έκφρασής της

Ανιχνεύθηκαν τα επίπεδα RNA της CHIP λιγάσης σε νεαρά HFL-1 κύτταρα με τη μέθοδο της Real-Time PCR, έπειτα από επιμόλυνση με τα ειδικά ολιγονουκλεοτίδια για την CHIP (siCHIP) ή τα ολιγονουκλεοτίδια μάρτυρες (siCon) στις συγκεντρώσεις 50 και 75 nM για 24 και 48 ώρες. Ο μέσος όρος των τιμών RNA στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με τα ολιγονουκλεοτίδια μάρτυρες ορίστηκε αυθαίρετα ως 1. Η κλίμακα που χρησιμοποιείται στον

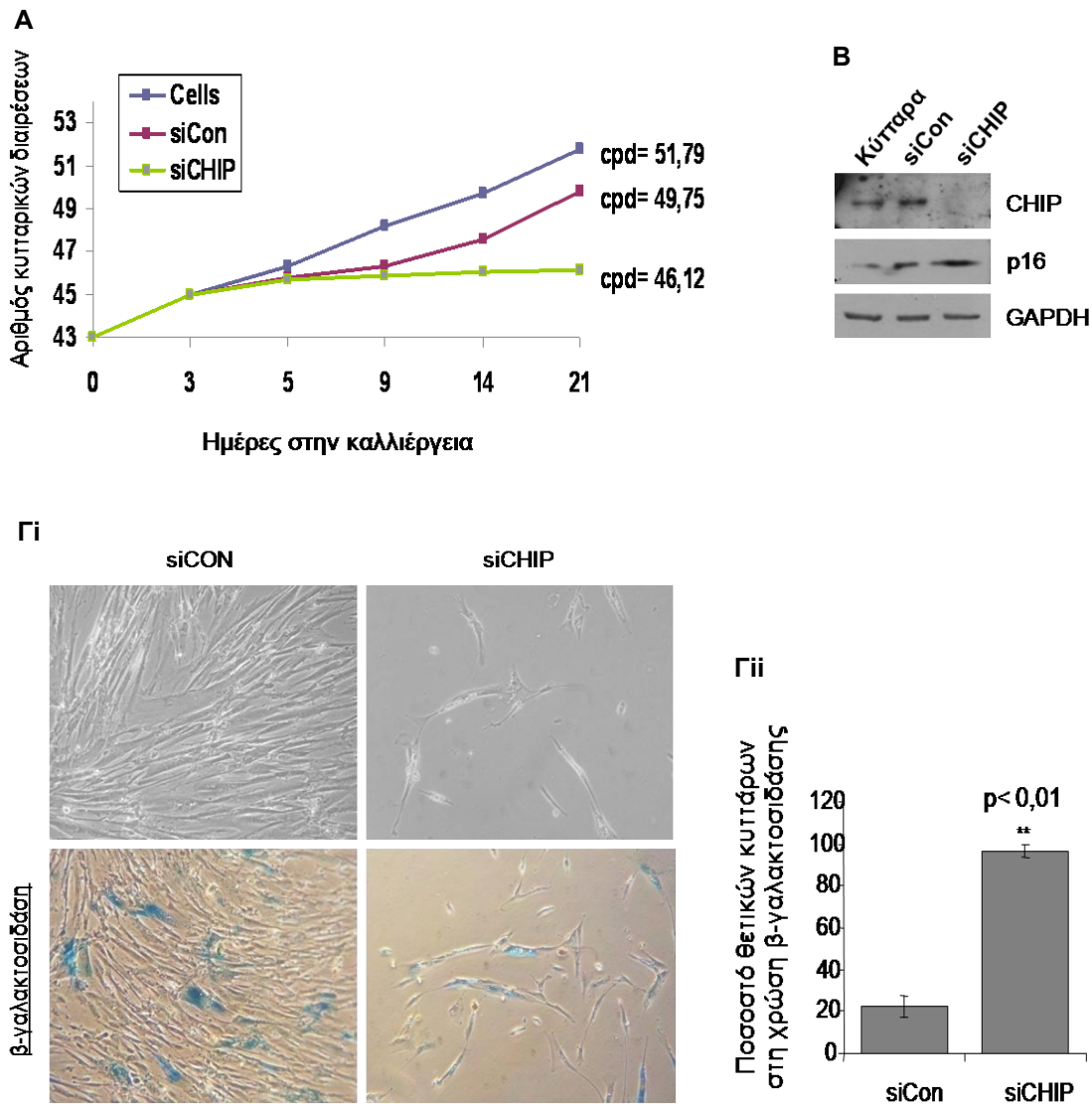


κάθετο άξονα είναι λογαριθμική. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων μετρήσεων  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD). Η τιμή p (p-value) προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια ελέγχου διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA Single Factor Test). Τιμή  $p < 0,05$  σημαίνει ότι η πιθανότητα οι παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα στα νεαρά και γηρασμένα κύτταρα, να οφείλονται σε τυχαιότητα και να μην είναι αληθείς, είναι μικρότερη του 0,05 %.

Από τη στιγμή που βρέθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες για τη βέλτιστη αποσιώπηση της λιγάνης CHIP, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τη διαρκή αποσιώπηση της έκφρασής της κατά την κυτταροκαλλιέργεια νεαρών ινοβλαστών έτσι, ώστε να εξεταστεί ο ρόλος της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη γήρανση. Για τη συνεχόμενη αποσιώπηση της CHIP, τα κύτταρα μάρτυρες και τα υπό εξέταση κύτταρα επιμολύνονταν κάθε 48 ώρες με 50 nM siCon και siCHIP, αντίστοιχα. Παράλληλα, γινόταν καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων, προκειμένου να υπολογιστεί ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων. Συνολικά, η διαδικασία διήρκεσε 21 ημέρες, ώσπου τα κύτταρα έχασαν την ικανότητα του πολλαπλασιασμού τους. Οι ινοβλάστες που δεν εξέφραζαν το γονίδιο της CHIP παρουσίασαν μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες από την 5<sup>η</sup> κιάλας ημέρα της καλλιέργειας, γεγονός που τελικά οδήγησε σε πρόωρη εμφάνιση γηρασμένου φαινότυπου. Αντίθετα, τα κύτταρα μάρτυρες συνέχισαν να πολλαπλασιάζονται (Εικ. 32Α). Την 21<sup>η</sup> ημέρα, που ολοκληρώθηκε η διαδικασία, τα κύτταρα μάρτυρες προηγούνταν κατά μέσο όρο 3,6 κυτταρικούς διπλασιασμούς από τα κύτταρα στα οποία είχε κατασταλεί η έκφραση της CHIP. Στο τελικό στάδιο του πειράματος ανιχνεύτηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της CHIP, τα οποία πράγματι ήταν ανύπαρκτα στα siCHIP κύτταρα, ενώ τα επίπεδα της p16 πρωτεΐνης βρέθηκαν αυξημένα δεικνύοντας το γηρασμένο φαινότυπο (Εικ. 32Β).

Η εμφάνιση της πρόωρης γήρανσης εξετάστηκε με επιπλέον μεθόδους. Εκτός από την παύση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, οι ινοβλάστες απέκτησαν τον τυπικό φαινότυπο των γηρασμένων ινοβλαστών. Έτσι, κατά τη διάρκεια του πειράματος άρχισε να μεταβάλλεται σταδιακά η μορφολογία τους, καθώς από μακρόστενα, με οξύληκτα άκρα που αυξάνονται σε παράλληλους στοίχους μετατράπηκαν σε πεπλατυσμένα, που αυξάνονται χωρίς κάποια δομή στο χώρο, ενώ οι πυρήνες τους διογκώθηκαν (Εικ. 32Γi). Ο γηρασμένος φαινότυπος επιβεβαιώθηκε επίσης με τη χρώση της β-γαλακτοσιδάσης. Συγκεκριμένα, οι ινοβλάστες που δεν εξέφραζαν την CHIP είχαν αυξημένο ποσοστό κυττάρων θετικών στη χρώση της β-γαλακτοσιδάσης, κατά 80% περίπου, σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (Εικ. 32Γii). Επομένως, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, μπορεί να προταθεί ότι η σταθερά

μειωμένη έκφραση της CHIP οδηγεί *in vitro* τους ανθρώπινους ινοβλάστες σε πρόωρη γήρανση.



### Εικόνα 32 Η αποσιώπηση της έκφρασης της CHIP οδηγεί σε πρόωρη γήρανση

(A) Γράφημα το οποίο παρουσιάζει τον αριθμό των κυτταρικών διαιρέσεων HFL-1 κυττάρων, τα οποία επιμολύνονταν κάθε 48 ώρες με 50 nM από τα ειδικά ολιγονουκλεοτίδια έναντι του γονιδίου CHIP (siCHIP) ή των αντίστοιχων μη ειδικών (siCon) για 21 ημέρες. (B) Ανάλυση κατά western των πρωτεϊνών CHIP, p16 και GAPDH. Ηλεκτροφορήθηκαν 20 μg ολικής πρωτεΐνης. (Γi) Αντιπροσωπευτικές φωτογραφίες των κυττάρων πριν (άνω) και μετά (κάτω) τη χρώση της β-γαλακτοσιδάσης. (Γii) Γράφημα στο οποίο φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που είναι θετικά στη χρώση της β-γαλακτοσιδάσης τόσο στα κύτταρα μάρτυρες siCon (πρώτη στήλη), όσο και στα siCHIP κύτταρα (δεύτερη στήλη). Τιμή  $p < 0,05$  σημαίνει ότι η πιθανότητα οι παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα στα νεαρά και γηρασμένα κύτταρα, να οφείλονται σε τυχαιότητα και να μην είναι αληθείς, είναι μικρότερη του 0,05 %.

**Συμπέρασμα 3:**

Επομένως, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, μπορεί να προταθεί ότι η σταθερή καταστολή της έκφρασης της CHIP οδηγεί *in vitro* τους ανθρώπινους ινοβλάστες HFL-1 σε πρόωρη γήρανση. Τα κύτταρα μειώνουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού τους αμέσως μετά την αποσιώπηση του γονιδίου και μέσα σε λίγες ημέρες χάνουν αυτήν την ικανότητα. Τα κύτταρα διατηρούνται σε μία διαδικασία μη αναστρέψιμη και εμφανίζουν όλα τα χαρακτηριστικά του γηρασμένου φαινοτύπου.

### 3.4 Συσχέτιση της λειτουργίας των p53-ειδικών λιγασών με το πρωτεόσωμα και την p53

Ελέγχθηκε προηγουμένα η έκφραση των ειδικών E3 ενζύμων της πρωτεΐνης p53 κατά τη φυσιολογική αναδιπλασιαστική γήρανση ανθρώπινων ινοβλαστών, αλλά και σε συνθήκες πρόωρης γήρανσης που επάγεται από μερική αναστολή του πρωτεοσώματος. Το ερώτημα που προέκυψε στη συνέχεια, αφορούσε τις επιπτώσεις είτε α) της ενεργοποίησης του πρωτεοσώματος (βλ. §3.4.1) είτε β) της ελεγχόμενης έκφρασης της p53 στην πρωτεϊνική έκφραση των λιγασών της p53 (βλ. §3.4.2). Κάθε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις μελετήθηκε ξεχωριστά σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα.

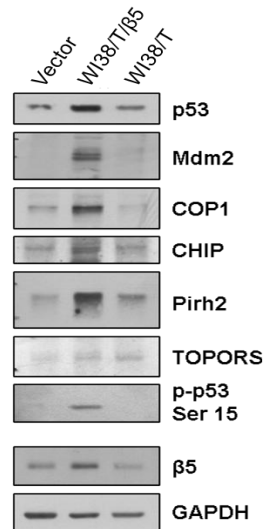
#### 3.4.1 Αυξημένη έκφραση των λιγασών σε κλώνους WI38/T που σταθερά υπερεκφράζουν τη β5 υπομονάδα του πρωτεοσώματος

Οι λιγάσες ως E3 ένζυμα αποτελούν βασικά μέρη του κυτταρικού μηχανισμού πρωτεόλυσης από το 26S πρωτεόσωμα. Δεν υπάρχει, όμως, κάποια αναφορά για τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζεται το σύστημα των λιγασών από το πρωτεόσωμα. Εάν, δηλαδή, η ενεργοποίηση του πρωτεοσώματος είναι ικανή να πυροδοτήσει τη δραστηριότητα των λιγασών για την ουμπικιτυλίωση και περαιτέρω αποδόμηση των υποστρωμάτων τους από το πρωτεόσωμα.

Μέχρι σήμερα, δεν έχει βρεθεί κάποιος μοριακός ή χημικός ενεργοποιητής του πρωτεοσώματος, με εξαίρεση την πρωτεΐνη PARP που βρέθηκε ότι προσδένεται στο πρωτεόσωμα και αυξάνει τις ενεργότητες του κατά το οξειδωτικό στρες [186]. Γενικά, για τη μελέτη του ρόλου μίας πρωτεΐνης πραγματοποιείται μοριακή κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για αυτήν την πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε κάποιο κυτταρικό σύστημα. Προκειμένου να επιτευχθεί ενεργοποίηση του πρωτεοσώματος σε ανθρώπινους ινοβλάστες, έγινε σταθερή επιμόλυνση της β<sub>5</sub> υπομονάδας σε αθανατοποιημένους ινοβλάστες WI38/T. Η επιλογή αυτής της αθανατοποιημένης κυτταρικής σειράς εξασφάλισε τον απεριόριστο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, δεδομένου ότι δεν υφίσταται κυτταρική γήρανση, προϋπόθεση που απαιτείται για τη δημιουργία αμιγών κλώνων σε μακρό χρονικό διάστημα. Οι κλώνοι αυτοί υπερεκφράζουν σταθερά την υπομονάδα με την οποία επιμολύνθηκαν και επιπλέον παρουσιάζουν αυξημένη ποσότητα δομημένου και λειτουργικού πρωτεοσώματος [328].

Μετά την απόκτηση των κλώνων WI38/T που σταθερά υπερεκφράζουν τη β<sub>5</sub> υπομονάδα (WI38/T/β<sub>5</sub>), απομονώθηκαν πρωτεΐνες από WI38/T κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί με τον άδειο φορέα έκφρασης (vector) ή με την υπομονάδα (WI38/T/β<sub>5</sub>) και ανιχνεύτηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα της p53 και των λιγασών αυτής, τα οποία βρέθηκαν όλα αυξημένα (Εικ. 33). Εκτός από τις λιγάσες Mdm2 και COP1, οι οποίες αποτελούν μεταγραφικούς στόχους

της p53, η επαγωγή των άλλων λιγασών και κυρίως της CHIP και της Pirh2 μπορεί να εξηγηθεί ως αποτέλεσμα κυτταρικού στρες, όπως δείχνει και η αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης μορφής της p53 στη σερίνη 15 (p-p53 Ser 15) (Εικ. 33). Παρά τα αυξημένα επίπεδα των λιγασών, αυτά δεν ήταν ικανά να οδηγήσουν την p53 προς αποδόμηση, γεγονός που δείχνει ότι το σύστημα των λιγασών ελέγχεται και από άλλους παράγοντες άγνωστους, ανεξάρτητους από την ποσότητα και τη δραστικότητα του πρωτεοσώματος μες στο κύτταρο.



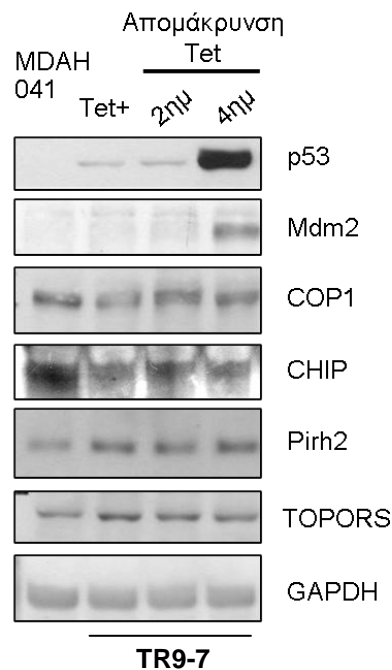
### Εικόνα 33 Έκφραση των λιγασών της p53 σε κλώνους WI38/T/β5

Απομονώθηκαν πρωτεΐνες από κύτταρα WI38/T που είχαν επιμολυνθεί με τον άδειο φορέα έκφρασης (vector) ή με την υπομονάδα β<sub>5</sub> (WI38/T/β<sub>5</sub>) και ηλεκτροφορήθηκαν 40 μg ολικής πρωτεΐνης. Αναλύθηκαν κατά Western η p53 και οι βασικές της λιγάσεις, η φωσφορυλιωμένη μορφή της p53 στη σερίνη 15 (p-p53 Ser 15) ως ένδειξη κάποιου στρες, η β<sub>5</sub> για τη διαπίστωση των κλώνων και η GAPDH για το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

#### 3.4.2 Αντίθετη έκφραση p53 και CHIP σε κύτταρα Li-Fraumeni

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση των E3 λιγασών υπό συνθήκες ελεγχόμενης έκφρασης της p53 πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκαν ινοβλάστες που έχουν απομονωθεί από ασθενείς με το σύνδρομο Li-Fraumeni. Οι ινοβλάστες αυτοί (MDAH041) φυσιολογικά δεν περιέχουν λειτουργική p53 πρωτεΐνη. Υπό συνθήκη, όμως, μέσω ενός συστήματος Tet<sup>off</sup>, μπορούν απουσία τετρακυκλίνης να εκφράζουν την p53 (βλ. §2.2.1). Έτσι, λοιπόν, απομονώθηκαν πρωτεΐνες από τα φυσιολογικά MDAH041 κύτταρα, όπως επίσης από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία τετρακυκλίνης, αλλά και από κύτταρα 2 και 4 ημέρες μετά την απομάκρυνση της τετρακυκλίνης από το μέσο καλλιέργειας. Όπως φαίνεται στην εικόνα 34,

τα κύτταρα MDAH041 δεν περιέχουν πρωτεΐνη p53. Παρουσία τετρακυκλίνης τα επίπεδα της p53 είναι πολύ χαμηλά και δεν είναι λειτουργικά, καθώς δεν υπάρχει πρωτεΐνη Mdm2, που αποτελεί μεταγραφικό στόχο της p53. Αντίθετα, 4 ημέρες μετά την απομάκρυνση της τετρακυκλίνης, η p53 επάγεται σε πολύ υψηλά επίπεδα και μάλιστα είναι λειτουργική, όπως φαίνεται από την επαγωγή της έκφρασης της Mdm2. Οι άλλες λιγάσες της p53, με εξαίρεση την CHIP, δεν παρουσιάζουν ουσιαστικές αλλαγές στην έκφρασή τους κατά τη μεταβολή των συνθηκών στις οποίες καλλιεργούνται τα κύτταρα. Είναι αξιοσημείωτο ότι η CHIP λιγάση παράγεται σε πολύ μεγάλες ποσότητες στα φυσιολογικά κύτταρα MDAH041, τα οποία δεν έχουν p53, ενώ τα επίπεδά της μειώνονται καθώς αρχίζει να εμφανίζεται η p53 στα κύτταρα. Επομένως, παρατηρείται μία αντίστροφη έκφραση μεταξύ των πρωτεϊνών p53 και CHIP, τη στιγμή που από τις άλλες λιγάσες, μόνο η Mdm2 ακολουθεί την έκφραση της p53 (Εικ. 34).



### Εικόνα 34 Έκφραση της p53 και των λιγασών της στα Li-Fraumeni κύτταρα

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία τετρακυκλίνης και απομονώθηκαν πρωτεΐνες από φυσιολογικά κύτταρα MDAH041 και από κλώνους TR9-7 που καλλιεργήθηκαν παρουσία τετρακυκλίνης, αλλά και από TR9-7 κλώνους 2 και 4 ημέρες έπειτα από την απομάκρυνση της τετρακυκλίνης. Ηλεκτροφορήθηκαν 40 μg ολικής πρωτεΐνης και αναλύθηκαν κατά Western. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

**Συμπέρασμα 4:**

Από τη μελέτη της έκφρασης της p53 πρωτεΐνης και των κύριων λιγασών της σε κύτταρα WI38/T που σταθερά υπερεκφράζουν τη β5 υπομονάδα του πρωτεοσώματος, προκύπτει ότι η αυξημένη ενεργότητα του πρωτεοσώματος μπορεί να επάγει τα επίπεδα των λιγασών, που όμως δεν είναι ικανά να οδηγήσουν την p53 προς αποδόμηση. Επιπλέον, η ελεγχόμενη έκφραση της p53 δείχνει ότι στα κύτταρα Li-Fraumeni υπάρχει μία αντίστροφη σχέση μόνο μεταξύ p53 και CHIP, τη στιγμή που η Mdm2 ακολουθεί την έκφραση της p53, ενώ οι υπόλοιπες λιγάσες δεν επηρεάζονται από την έκφραση ή μη της p53.

### 3.5 Μελέτη της ειδικής δράσης της CHIP λιγάσης στην κυτταρική γήρανση

Καθώς η CHIP λιγάση είναι η μόνη από τα ένζυμα που μελετήθηκαν, η οποία επάγεται τόσο σε μεταγραφικό όσο και πρωτεϊνικό επίπεδο, κατά την εμφάνιση της γήρανσης των ινοβλαστών, δημιουργείται το ερώτημα που αφορά το ρόλο της στην κυτταρική φυσιολογία. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η CHIP θεωρείται ως η πρωτεΐνη ελέγχου της ποιότητας του κυττάρου, «quality control protein», και ουμπικιτυλιώνει αρκετά υποστρώματα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, τα περισσότερα εκ των οποίων είναι μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις συνοδές πρωτεΐνες Hsp70 και/ή Hsp90 [299]. Οι περισσότερες μελέτες αφορούν καρκινικά κύτταρα και ουμπικιτυλίωση μεταλλαγμένων μορίων p53, ενώ ο ρόλος της μέχρι σήμερα περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα. Πολύ λίγα είναι γνωστά για το αν μπορεί να δράσει εντός του πυρήνα, πώς ρυθμίζει την αποδόμηση της φυσιολογικής p53 στο κύτταρο και με ποιο τρόπο συμμετέχει στον έλεγχο της κυτταρικής φυσιολογίας. Έτσι, στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η θέση της CHIP στο κύτταρο και η ενζυμική της ενεργότητα που εκφράζεται από τα επίπεδα της ουμπικιτυλίωσής της. Επιπλέον, υπερεκφράστηκε αλλά και αποσιωπήθηκε η έκφρασή της στα κύτταρα, ώστε να μελετηθεί το μονοπάτι που εξαρτάται από την CHIP σε αντιδιαστολή με το μονοπάτι της Mdm2 (η Mdm2, άλλωστε, στην πλειοψηφία των μελετών θεωρείται ως η κύρια λιγάση της p53) επάνω στη ρύθμιση της p53.

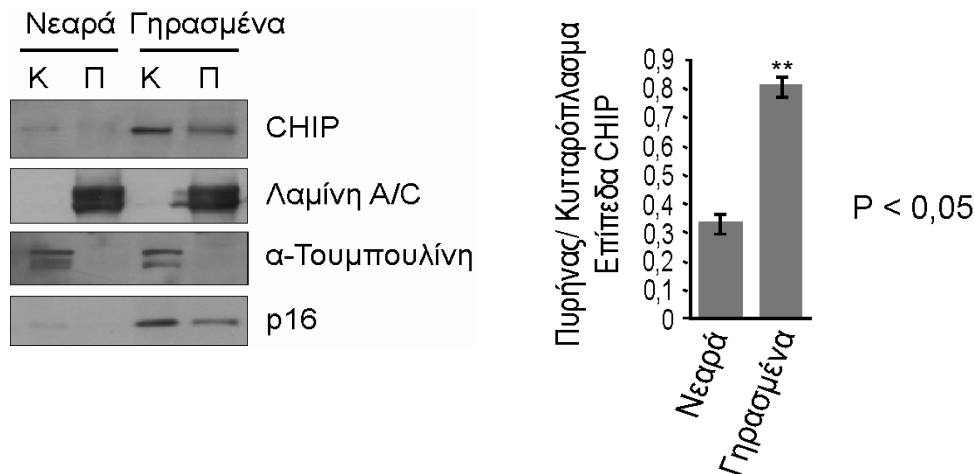
#### 3.5.1 Υποκυτταρικός εντοπισμός της CHIP στους ινοβλάστες HFL-1

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, είναι γνωστό ότι η CHIP εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων [288]. Από τη στιγμή, όμως, που η θέση της στα γηρασμένα κύτταρα δεν έχει μελετηθεί, ελέγχθηκαν οι ινοβλάστες HFL-1 για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της CHIP. Συγκεκριμένα, ανθρώπινοι εμβρυικοί ινοβλάστες πνεύμονα HFL-1 καλλιιεργήθηκαν έως τη φάση της μη αντιστρεπτής παύσης του κυτταρικού τους πολλαπλασιασμού και απομονώθηκαν κυτταροπλασματικά και πυρήνικά εκχυλίσματα από νεαρά και γηρασμένα κύτταρα για τον έλεγχο της έκφρασης της CHIP (Εικ. 35). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ανοσοεντοπισμός της CHIP με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος από την ανάλυση του ανοσοοστευπώματος (Εικ. 36).

Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι το πρότυπο εντοπισμού της CHIP αλλάζει ανάμεσα σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα και συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μία μερική μετατόπιση της CHIP στον πυρήνα των γηρασμένων κυττάρων. Ειδικότερα, στα νεαρά κύτταρα εμφανίζονται χαμηλά επίπεδα της CHIP μόνο στο κυτταρόπλασμα, ενώ στα γηρασμένα

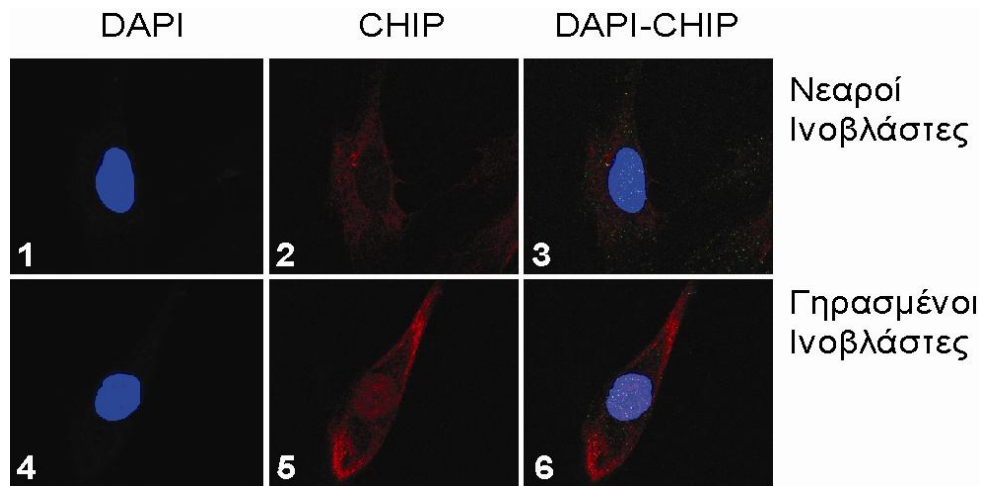


κύτταρα αυξημένα επίπεδα της CHIP κατανέμονται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα (Εικ. 35 και 36). Ο λόγος των επιπέδων της CHIP μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα περιγράφει αυτήν την πυρηνική μετατόπιση (Εικ. 35). Ο λόγος αυτός είναι 2,5 φορές μεγαλύτερος στα γηρασμένα κύτταρα σε σύγκριση με τα νεαρά. Αυτές οι αναλύσεις αποκαλύπτουν ότι η CHIP λιγιάση όχι μόνο αυξάνει σημαντικά κατά τη γήρανση, αλλά επιπλέον υφίσταται μετατόπιση στον πυρήνα, προτείνοντας κάποιο πιθανό ρόλο ως προς την ουμπικιτυλίωση και αποδόμηση των πυρηνικών πρωτεϊνών.



### Εικόνα 35 Ανάλυση κατά Western της CHIP σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά εκχυλίσματα

Απομονώθηκαν κυτταροπλασματικά (Κ) και πυρηνικά (Π) εκχυλίσματα από νεαρά και γηρασμένα κύτταρα και αναλύθηκαν με ανοσοστύπωμα 20  $\mu\text{g}$  ολικής πρωτεΐνης. Η καθαρότητα των κλασμάτων επιβεβαιώνεται με τη χρήση αντισώματος έναντι της λαμίνης A/C για τα πυρηνικά και έναντι της  $\alpha$ -τουμπουλίνης για τα κυτταροπλασματικά. Για να επιβεβαιωθεί ο γηρασμένος φαινότυπος των κυττάρων έγινε αντίχνευση της p16. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι. Στο δεξί μέρος της εικόνας απεικονίζεται ο λόγος της πρωτεϊνικής έκφρασης της CHIP λιγιάσης μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος στα νεαρά και στα γηρασμένα κύτταρα. Η κλίμακα που χρησιμοποιείται στον κάθετο άξονα είναι λογαριθμική. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων μετρήσεων  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD). Η τιμή p (p-value) προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια ελέγχου διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA Single Factor Test). Τιμή  $p < 0,05$  σημαίνει ότι η πιθανότητα οι παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα στα νεαρά και γηρασμένα κύτταρα, να οφείλονται σε τυχαιότητα και να μην είναι αληθείς, είναι μικρότερη του 0,05 %.



**Εικόνα 36** Ανοσοεντοπισμός της CHIP σε νεαρά και γηρασμένα HFL-1 κύτταρα

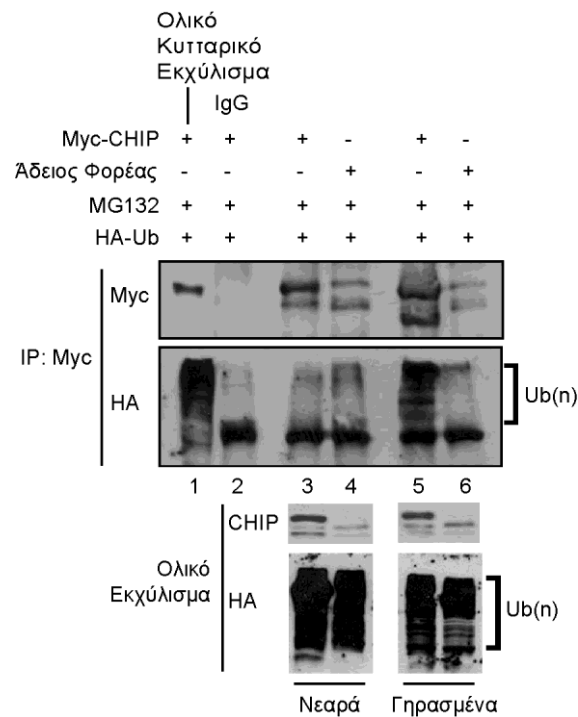
Ανοσοεντοπισμός της CHIP λιγάσης σε νεαρά (1-3) και γηρασμένα (4-6) κύτταρα με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης. Για τον έλεγχο της ποιότητας της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε η χρωστική DAPI, η οποία βάφει τους κυτταρικούς πυρήνες με χαρακτηριστικό μπλε χρώμα.

### 3.5.2 Μελέτη της ειδικής ενεργότητας της CHIP λιγάσης στους φυσιολογικούς ινοβλάστες

Όπως έχει προκύψει από τις προηγούμενες αναλύσεις, η CHIP λιγάση είναι η μόνη από τις λιγάσες της p53 που εξετάστηκαν, η οποία εμφανίζει αυξημένη έκφραση τόσο σε επίπεδο μεταγραφής όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο κατά την κυτταρική γήρανση των ανθρώπινων εμβρυικών ινοβλαστών HFL-1. Επιπλέον, η CHIP ως E3 ένζυμο διαθέτει ενζυμική ενεργότητα, η οποία εκφράζεται από την ικανότητά της να ουμπικιτυλιώνει και να στοχεύει διάφορα υποστρώματα προς αποδόμηση από το 26S πρωτεόσωμα, αλλά και τον εαυτό της, μία διαδικασία που χαρακτηρίζεται ως «αυτο-ουμπικιτυλίωση» [290]. Η «αυτο-ουμπικιτυλίωση» ενός ενζύμου είναι δυνατό να μελετηθεί με τη βοήθεια *in vitro* πειραμάτων. Στα κύτταρα, όμως, μπορούν να ελεγχθούν τα επίπεδα ουμπικιτυλίωσης του ενζύμου με τη χρήση ενός συνδυασμού τεχνικών που εφαρμόζονται απευθείας στα κύτταρα και θεωρείται ως ανάλυση της ουμπικιτυλίωσης *in vivo*.

Συγκεκριμένα, σε αυτήν τη διατριβή τα κύτταρα επιμολύνθηκαν προσωρινά (για 24 ώρες) με ένα πλασμίδιο που περιείχε το cDNA για την ανθρώπινη CHIP λιγάση σημασμένη με Myc (Myc-CHIP) και ένα πλασμίδιο το οποίο περιείχε 8 επαναλήψεις ουμπικιτίνης σημασμένης με αιμαγλουτινίνη (HA-Ub) (Εικ. 37). Δεδομένου ότι η CHIP φυσιολογικά στα κύτταρα βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, η ανίχνευσή της είναι δύσκολη, οπότε συνήθως

προτιμάται να εισάγεται εξωγενώς με τη βοήθεια πλασμιδίου, όπου είναι σημασμένη με κάποια «ετικέτα», εδώ το Myc. Παρόμοια, η ουμπικιτίνη είναι σημασμένη με αιμαγλουτινίνη, ώστε να διευκολύνεται η ανίχνευσή της. 20 ώρες μετά την επιμόλυνση, χορηγήθηκε στα κύτταρα ο πρωτεοσωμικός αναστολέας MG132, προκειμένου να ανασταλεί η πρωτεοσωμική αποδόμηση των ουμπικιτυλιωμένων μορίων και να είναι ανιχνεύσιμα. Ακολούθησε ανοσοκατακρήμιση (immunoprecipitation, IP) της Myc πρωτεΐνης, οπότε και της CHIP που είχε εισαχθεί εξωγενώς στα κύτταρα και με ανάλυση κατά Western (Western Blot, WB) εντοπίστηκαν τα ουμπικιτυλιωμένα μόρια CHIP. Η ανοσοκατακρήμιση πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή ακραίων αποδιατακτικών συνθηκών (strict denaturing conditions) που σπάνε όλες τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της CHIP και των διάφορων υποστρωμάτων της έτσι, ώστε να εξασφαλιστεί η αποκλειστική ουμπικιτυλίωση της CHIP και όχι των αλληλεπιδρώντων μορίων (Εικ. 37).



### Εικόνα 37 Επίπεδα ουμπικιτυλίωσης της CHIP σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα

Νεαρά (γραμμές 3 και 4) και γηρασμένα (γραμμές 5 και 6) κύτταρα επιμολύνθηκαν προσωρινά με 4 μg Myc-CHIP ή τον άδειο φορέα έκφρασης, μαζί με το φορέα έκφρασης HA-Ub. 20 ώρες μετά, χορηγήθηκαν στα κύτταρα 20 μM MG132 για 6 ώρες για την αναστολή της πρωτεοσωμικής αποδόμησης. Τα κύτταρα λύθηκαν, ανοσοκατακρημίστηκαν ως προς Myc με ισχυρές αποδιατακτικές συνθήκες και αναλύθηκαν με ανοσοστύπωμα. Κατά την ανοσοκατακρήμιση χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, ολικό κυτταρικό εκχύλισμα ως θετικός μάρτυρας και φυσιολογικός ορός ως αρνητικός μάρτυρας και ηλεκτροφορήθηκαν 300 μg

πρωτεϊνών. Για την ηλεκτροφόρηση των αρχικών ολικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν 30 μg πρωτεΐνης. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

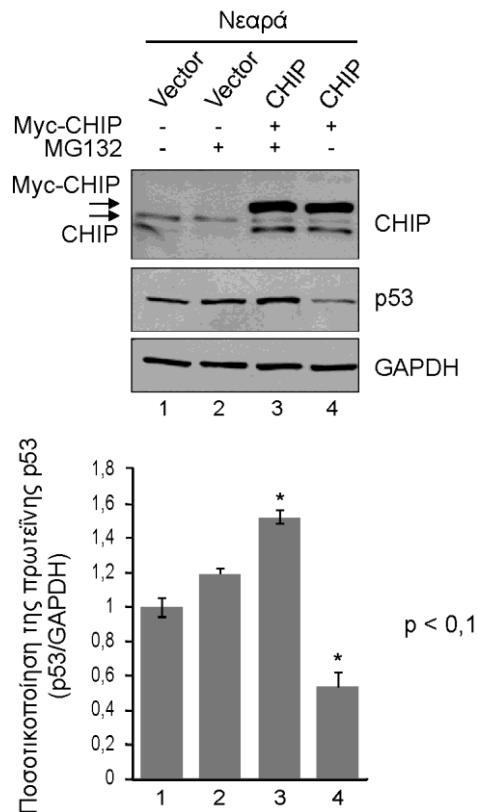
Όπως φαίνεται στην εικόνα 37, τα επίπεδα ουμπικιτυλίωσης της CHIP συσσωρεύονται στα γηρασμένα κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί με το πλασμίδιο Myc-CHIP (γραμμή 5), σε αντιπαραβολή με τα νεαρά κύτταρα όπου δεν υπάρχει κάποια συσσώρευση (γραμμή 3). Συγκρίνοντας με τις εικόνες από τα ολικά εκχυλίσματα, οι οποίες δείχνουν υψηλές συγκεντρώσεις ουμπικιτυλιωμένων μορίων είτε στα νεαρά (γραμμές 3 και 4) είτε στα γηρασμένα (γραμμές 5 και 6) κύτταρα, είναι εμφανές ότι η ουμπικιτυλίωση στα γηρασμένα κύτταρα κατά την ανοσοκατακρήμιση αφορά την CHIP λιγότερο. Επομένως, αυτά τα αυξημένα επίπεδα ουμπικιτυλίωσης της CHIP σε συνδυασμό με τα αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα και τη μετατόπιση στον πυρήνα κατά τη γήρανση είναι ενδεικτικά για αυξημένη ενζυμική ενεργότητα της CHIP όσον αφορά στην ουμπικιτυλίωση και περαιτέρω αποδόμηση των υποστρωμάτων της στους γηρασμένους ινοβλάστες.

### 3.5.3 Μελέτη της p53 έπειτα από εξωγενή υπερέκφραση της CHIP

Μέχρι στιγμής, έχει προταθεί ότι τα αυξημένα επίπεδα της CHIP κατά τη γήρανση πιθανά ευθύνονται για την ουμπικιτυλίωση και επακόλουθη στόχευση της p53 προς πρωτεοσωμική αποδόμηση. Αντίθετα, στα νεαρά κύτταρα, τα χαμηλά επίπεδα της CHIP είναι λιγότερο σημαντικά ως προς το να επιδράσουν στη ρύθμιση της p53. Για να επαληθευτεί αυτή η άποψη, ελέγχθηκε εάν η επαγωγή των αρχικά χαμηλών επιπέδων της CHIP στα νεαρά κύτταρα, η οποία εισάγεται εξωγενώς με τη βοήθεια πλασμιδίου, μπορεί να επηρεάσει το προφίλ της σταθερότητας της p53 σε αυτά τα κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο, προσομοιώθηκε στους νεαρούς ινοβλάστες η πρωτεϊνική έκφραση της CHIP, που έχει προηγούμενα παρατηρηθεί στους αντίστοιχους γηρασμένους.

Αναλυτικότερα, νεαροί ινοβλάστες HFL-1 επιμολύνθηκαν προσωρινά με φορέα έκφρασης της CHIP σημασμένης με Myc (Myc-CHIP) για την επαγωγή των επιπέδων της στο εσωτερικό των κυττάρων και παράλληλα, τους χορηγήθηκε ο πρωτεοσωμικός αναστολέας MG132 για τη συσσώρευση των ουμπικιτυλιωμένων μορίων p53. Όπως δείχνει η εικόνα 38, η εξωγενής υπερέκφραση της CHIP αυξάνει τα επίπεδα των πρωτεϊνικών της μορίων εντός των κυττάρων, τα οποία είναι ικανά να οδηγήσουν σε αποδόμηση την p53 [μείωση των αρχικών επιπέδων (γραμμή 1) περίπου στο μισό (γραμμή 4), όπως φαίνεται στο διάγραμμα].

Σε αντίθεση, όταν στα κύτταρα έχει γίνει αγωγή με MG132, η p53 συσσωρεύεται και σταθεροποιείται (γραμμές 3 και 4).



### Εικόνα 38 Εξωγενής υπερέκφραση της CHIP στα νεαρά κύτταρα

Νεαρά κύτταρα επιμολύνθηκαν προσωρινά με 4 μg Myc-CHIP ή τον άδειο φορέα έκφρασης. 20 ώρες μετά, χορηγήθηκαν στα κύτταρα 20 μM MG132 για 6 ώρες για την αναστολή της πρωτεοσωμικής αποδόμησης. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αναλύθηκαν με ανοσοστύπωμα. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 20 μg ολικής πρωτεΐνης. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι. Στο κάτω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση της p53 από το ανοσοστύπωμα. Η κλίμακα που χρησιμοποιείται στον κάθετο άξονα είναι λογαριθμική. Οι τιμές έχουν εκφραστεί ως % ποσοστά, όπου ως 1 (100%) έχει οριστεί η τιμή στα νεαρά κύτταρα. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (SD). Η τιμή p (p-value) προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια ελέγχου διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA Single Factor Test). Τιμή p < 0,05 σημαίνει ότι η πιθανότητα οι παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα στα νεαρά και γηρασμένα κύτταρα, να οφείλονται σε τυχαιότητα και να μην είναι αληθείς, είναι μικρότερη του 0,05 %.

Επομένως, η υπερέκφραση της CHIP στα νεαρά κύτταρα μπορεί να στοχεύσει την p53 προς αποδόμηση από το πρωτεόσωμα, κατ' αναλογία με τις συνθήκες που επικρατούν στα γηρασμένα κύτταρα, τα οποία φυσιολογικά διαθέτουν υψηλότερα επίπεδα CHIP και μειωμένα επίπεδα p53. Αυτή η παρατήρηση υποστηρίζει ακόμα περισσότερο την άποψη ότι η CHIP κατέχει σπουδαίο ρόλο στη γήρανση.

### **3.5.4 Μελέτη της αποσιώπησης της έκφρασης της CHIP και της Mdm2 λιγάσης στη ρύθμιση της σταθερότητας της p53**

Παρά το γεγονός ότι η CHIP λιγάση ήταν η μόνη από το σύνολο των πέντε βασικών λιγασών της p53 που εξετάστηκαν, η οποία παρουσίασε αυξημένα επίπεδα τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, μετατόπιση στον πυρήνα και αυξημένη ενζυμική ενεργότητα κατά την κυτταρική γήρανση ανθρώπινων ινοβλαστών, θεωρήθηκε σκόπιμο να εξεταστεί η λειτουργικότητά της σε αντιδιαστολή με την Mdm2 λιγάση. Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος δημοσιεύσεων διαθέσιμο στη βιβλιογραφία που αναφέρει την Mdm2 λιγάση ως την κύρια λιγάση ουμπικιτίνης για τη ρύθμιση της σταθερότητας της p53 (βλ. εισαγωγή). Γενικότερα, είναι γνωστό ότι αρκετά γονίδια-στόχοι του μεταγραφικού παράγοντα p53 αναστέλλουν την ενεργότητα του p53 μέσω ενός αυτορυθμιζόμενου κύκλου αρνητικής ανάδρασης (negative feedback loop). Από την άλλη, ο p53 ενεργοποιεί μεταγραφικά τον κύριο αρνητικό ρυθμιστή του, το γονίδιο mdm2 (mouse double minute) [65, 66]. Η Mdm2 λιγάση με τη σειρά της απενεργοποιεί την πρωτεΐνη p53 κυρίως στοχεύοντάς την για πρωτεοσωμική αποδόμηση και προωθώντας την έξοδό της από τον πυρήνα [67]. Για τους παραπάνω λόγους, κρίθηκε αναγκαία η πρόσθετη μελέτη του ρόλου της Mdm2 λιγάσης και η περαιτέρω σύγκριση με τη δράση της CHIP στη ρύθμιση της p53, παρόλο που η Mdm2 βρέθηκε μειωμένη κατά τη γήρανση των ινοβλαστών (Εικ. 23).

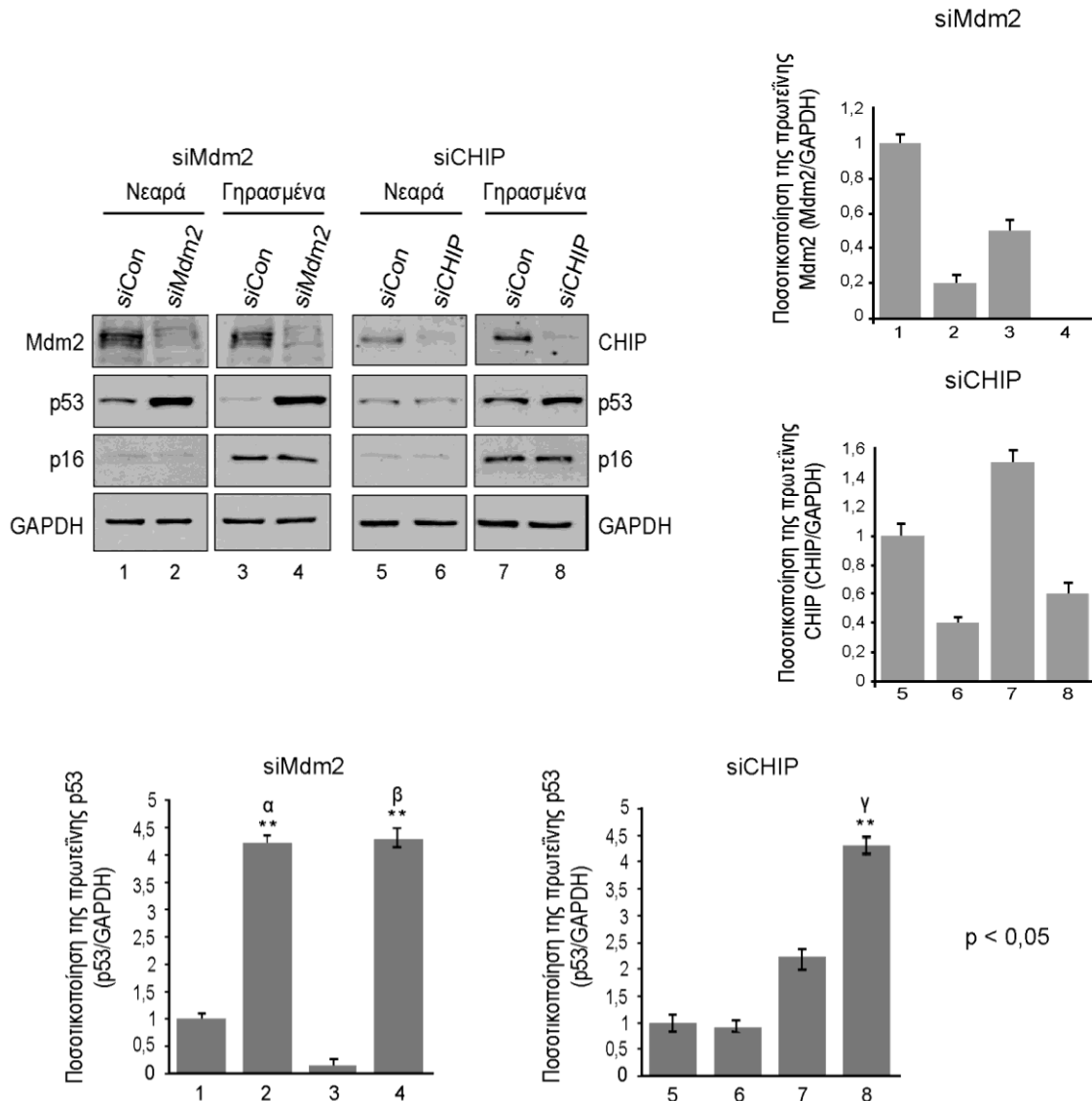
Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της μετα-μεταγραφικής αποσιώπησης γονιδίων, η οποία επιτυγχάνει την καταστολή της έκφρασης των γονιδίων στα κύτταρα. Πρόκειται για μία σύγχρονη τεχνική που επιτρέπει τη μελέτη διάφορων βιολογικών μηχανισμών [396, 397] και έγκειται στη χρήση δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων RNA με μήκος 20-25 νουκλεοτίδια. Αυτά τα μικρά RNA μόρια παρεμβαίνουν στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (small interfering RNA, siRNA, μερικές φορές γνωστά και ως short-interfering RNA ή silencing RNA) μέσω του μονοπατιού RNA-παρεμβολής (RNA-interfering pathway) [398].

Πράγματι, νεαρά και γηρασμένα κύτταρα μεταχειρίστηκαν με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 50 και 75 nM, των ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων siCHIP και siMdm2 (Πίνακας 4) για διάφορα χρονικά διαστήματα (1 έως 4 ημέρες) και βρέθηκαν οι ιδανικές συνθήκες για την αποσιώπηση των δύο γονιδίων, χωρίς να προκαλούν την απόπτωση των κυττάρων. Στην περίπτωση της αποσιώπησης του γονιδίου Mdm2, τα κύτταρα επιμολύνθηκαν προσωρινά δύο φορές με τα siRNA ολιγονουκλεοτίδια αφήνοντας διάστημα 24 ωρών να μεσολαβήσει μεταξύ των επιμολύνσεων και αναλύθηκαν με Western 48 ώρες αργότερα. Όμως, για την αποσιώπηση του γονιδίου CHIP, τα κύτταρα επιμολύνθηκαν προσωρινά δύο φορές αφήνοντας διάστημα 48 ωρών να μεσολαβήσει μεταξύ των επιμολύνσεων και αναλύθηκαν με Western 48 ώρες αργότερα. Σαν κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που επιμολύνθηκαν με ολιγονουκλεοτίδια siRNA που δεν περιείχαν κανένα στόχο (siCON).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 39, η επιμόλυνση των κυττάρων με τα ειδικά ολιγονουκλεοτίδια siMdm2 επέτυχε καταστολή της έκφρασης του γονιδίου mdm2 κατά 80% στα νεαρά κύτταρα (γραμμές 2 έναντι 1) και κατά 50% στα γηρασμένα (γραμμή 4 έναντι 3) (πάνω δεξί γράφημα). Αντίστοιχα, επιμόλυνση των κυττάρων με τα ειδικά ολιγονουκλεοτίδια siCHIP οδήγησε σε καταστολή της έκφρασης του γονιδίου Chip κατά 60% περίπου τόσο στα νεαρά (γραμμή 6 έναντι 5) όσο και στα γηρασμένα κύτταρα (γραμμή 8 έναντι 7) (κάτω δεξί γράφημα). Είναι χαρακτηριστικό ότι στα κύτταρα μάρτυρες (siCon) η Mdm2 μειώθηκε κατά 50% περίπου από τα νεαρά στα γηρασμένα κύτταρα (γραμμές 1 και 3), ενώ η CHIP αυξήθηκε κατά 50% περίπου από τα νεαρά στα γηρασμένα κύτταρα (γραμμές 5 και 7).

Το αξιοσημείωτο ήταν ότι η αποσιώπηση του Mdm2 οδήγησε σε παρόμοια συσσώρευση της p53 πρωτεΐνης τόσο στα νεαρά όσο και στα γηρασμένα κύτταρα (γραμμές 2 και 4). Αυτή η επαγωγή ήταν περίπου 4 φορές σε σύγκριση με τα κύτταρα που είχαν δεχτεί τα ολιγονουκλεοτίδια μάρτυρες (siCon) (κάτω αριστερό γράφημα, γραμμή 2 έναντι 1 και γραμμή 4 έναντι 3). Αντίθετα, η καταστολή των ενδογενών επιπέδων της CHIP με τη χρήση του ειδικού siRNA επήγαγε μία σημαντικά μεγαλύτερη συσσώρευση της p53 στα γηρασμένα σε σχέση με τα νεαρά κύτταρα. Ειδικότερα, η πρωτεϊνική έκφραση της p53 αυξήθηκε κατά 2,5 φορές στα γηρασμένα κύτταρα που είχαν δεχτεί το siCHIP σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες siCon (γραμμή 8 έναντι 7).

Συνεπώς, αυτά τα αποτελέσματα δεικνύουν ότι παρόλο που η ρύθμιση της p53 που εξαρτάται από την Mdm2 συμβαίνει και στα νεαρά και στα γηρασμένα κύτταρα, η CHIP λιγότερο συμμετέχει στη ρύθμιση των επιπέδων της p53 κυρίως κατά τη γήρανση.



**Εικόνα 39** Αποσιώπιση της έκφρασης της Mdm2 και της CHIP σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα

Νεαρά και γηρασμένα κύτταρα επιμολύνθηκαν προσωρινά δύο φορές με τα άδεια χωρίς ειδικό στόχο ή με τα ειδικά ολιγονουκλεοτίδια siMdm2 και siCHIP και αναλύθηκαν με ανοσοστύπωμα 20 µg ολικής πρωτεΐνης. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι. Στο δεξί μέρος της εικόνας απεικονίζονται οι ποσοτικοποιήσεις της Mdm2 και της CHIP λιγάσης αντίστοιχα, ενώ στο κάτω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση της p53. Η κλίμακα που χρησιμοποιείται στον κάθετο άξονα είναι λογαριθμική. Οι τιμές έχουν εκφραστεί ως % ποσοστά, όπου ως 1 (100%) έχει οριστεί η τιμή στα νεαρά κύτταρα μάρτυρες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (SD). Η τιμή p (p-value) προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια ελέγχου διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA Single Factor Test). Τιμή  $p < 0,05$  σημαίνει ότι η πιθανότητα οι



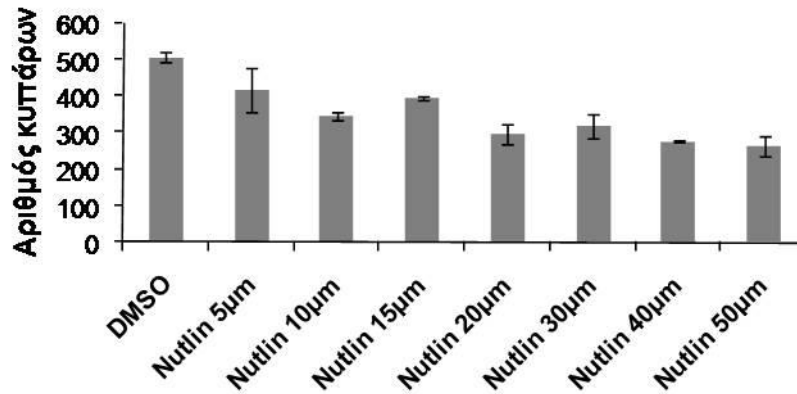
παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα στα νεαρά και γηρασμένα κύτταρα, να οφείλονται σε τυχαιότητα και να μην είναι αληθείς, είναι μικρότερη του 0,05 %.  $^{\alpha}p < 0.05$  και  $^{\beta}p < 0.05$  για τα siMdm2-κύτταρα σε σύγκριση με τα νεαρά και τα γηρασμένα siCon κύτταρα, αντίστοιχα.  $^{\gamma}p < 0.05$  για τα siCHIP-κύτταρα σε σύγκριση με τα γηρασμένα siCon κύτταρα.

### 3.5.5 Μελέτη της επίδρασης του αναστολέα Nutlin-3 σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την CHIP λιγάση

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η εξειδίκευση του ρόλου της CHIP λιγάσης σε κύτταρα που υφίστανται αναδιπλασιαστική γήρανση, ελέγχθηκε η επίδραση της CHIP στη ρύθμιση της p53 υπό συνθήκες όπου είχε ανασταλεί η αλληλεπίδραση μεταξύ p53 και Mdm2. Στόχος αυτού του πειράματος ήταν να δοκιμαστεί η ικανότητα της CHIP λιγάσης να στείλει την p53, η οποία συσσωρεύεται λόγω αναστολής της δράσης της Mdm2, προς αποδόμηση από το πρωτεόσωμα. Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, η CHIP θα έπρεπε να έχει μία ιδιαίτερη λειτουργία στα γηρασμένα παρά στα νεαρά κύτταρα.

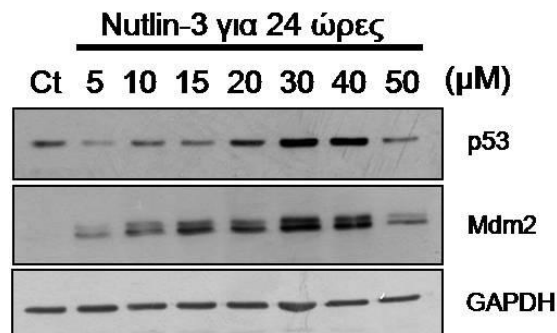
Γενικά, υπάρχουν διάφοροι ανταγωνιστές της αλληλεπίδρασης μεταξύ της p53 και της Mdm2 (βλ. §1.4.3.3), αλλά ο πρώτος κατάλληλος και επιλεκτικός αναστολέας αυτής της αλληλεπίδρασης, αποτελεσματικός σε *in vitro* και *in vivo* συστήματα, αναφέρθηκε το 2004 από τους επιστήμονες της Roche [228] και ανήκε στην οικογένεια των Nutlins. Το πιο δραστικό μόριο της οικογένειας είναι το ενεργό εναντιομερές (α) του Nutlin-3. Τα μόρια Nutlins είναι αποτελεσματικά μόνο σε κύτταρα που εκφράζουν την άγριου-τύπου πρωτεΐνη p53 και όχι σε κύτταρα με απενεργοποιημένη μεταγραφικά ή μεταλλαγμένη p53. Συγκεκριμένα, ενεργοποιούν την p53 μέσω μετα-μεταφραστικών μηχανισμών αναστέλλοντας την αποδόμησή της, χωρίς να επηρεάζουν την ίδια τη μεταγραφή της p53. Η πρωτεΐνη p53 σταθεροποιείται και συσσωρεύεται, με αποτέλεσμα την επαγωγή του p53 μονοπατιού και τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων, p21 και Mdm2 [228].

Επομένως, εξετάστηκε αρχικά ένα εύρος διαφορετικών συγκεντρώσεων (5 έως 50  $\mu\text{M}$ ) του αναστολέα για διάφορα χρονικά διαστήματα (2 έως 72 ώρες), ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες στις οποίες αφενός σταθεροποιείται η έκφραση της p53 και αφετέρου τα κύτταρα διατηρούν τη βιωσιμότητά τους. Έτσι, βρέθηκε ότι 10  $\mu\text{M}$  Nutlin-3 για 24 ώρες οδηγούν στο επιθυμητό αποτέλεσμα χωρίς να επηρεάζουν τη φυσιολογία των κυττάρων (Εικ. 40 και 41).



**Εικόνα 40** Αριθμός HFL-1 κυττάρων μετά από επίδραση με διάφορες συγκεντρώσεις Nutlin-3

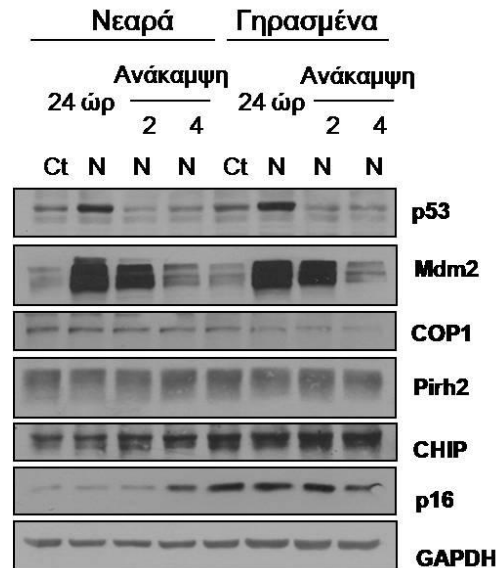
Νεαρά κύτταρα δέχτηκαν την επίδραση του διαλύτη DMSO (κύτταρα μάρτυρες) ή διάφορες συγκεντρώσεις (5 έως 50  $\mu\text{M}$ ) του αναστολέα Nutlin-3 για 24 ώρες και καταμετρήθηκαν αμέσως μετά την αγωγή του αναστολέα. Παρατηρείται μικρή μείωση στον αριθμό των κυττάρων μετά τη χορήγηση του αναστολέα σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες, που όμως δε θεωρείται στατιστικά σημαντική. Η κλίμακα που χρησιμοποιείται στον κάθετο άξονα είναι λογαριθμική. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων μετρήσεων  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD).



**Εικόνα 41** Ανάλυση κατά Western των p53 και Mdm2 σε κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση διάφορων συγκεντρώσεων Nutlin-3 για 24 ώρες

Απομονώθηκαν πρωτεΐνες από κύτταρα μάρτυρες (που δέχτηκαν την επίδραση του διαλύτη DMSO, control) και από κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση διάφορων συγκεντρώσεων (5 έως 50  $\mu\text{M}$ ) του αναστολέα Nutlin-3 για 24 ώρες και ηλεκτροφορήθηκαν 40  $\mu\text{g}$  ολικής πρωτεΐνης. Τα αυξημένα επίπεδα p53 στα κύτταρα μάρτυρες οφείλονται στην επίδραση του DMSO, γι' αυτό θεωρείται ότι η συσσώρευση p53 ξεκινά στα 10  $\mu\text{M}$  Nutlin-3, όπως φαίνεται και από την επαγωγή της Mdm2. Για να επιβεβαιωθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων, ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα έκφρασης της GAPDH. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

Στη συνέχεια, για να ελεγχθεί η δράση του αναστολέα Nutlin-3 και στα γηρασμένα κύτταρα και να συγκριθεί το αποτέλεσμά του με τα νεαρά κύτταρα, εφαρμόστηκε στους ινοβλάστες για 24 ώρες και διατηρήθηκε για 2 και 4 ώρες επιπλέον σε φρέσκο μέσο καλλιέργειας. Όπως φαίνεται στην εικόνα 42, η χορήγηση του αναστολέα σταθεροποίησε την p53, η οποία επήγαγε την έκφραση των μεταγραφικών της στόχων, όπως είναι η λιγάση Mdm2.



**Εικόνα 42 Ανάλυση κατά Western της p53 και των λιγασών της μετά από επίδραση με τον αναστολέα Nutlin-3 σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα**

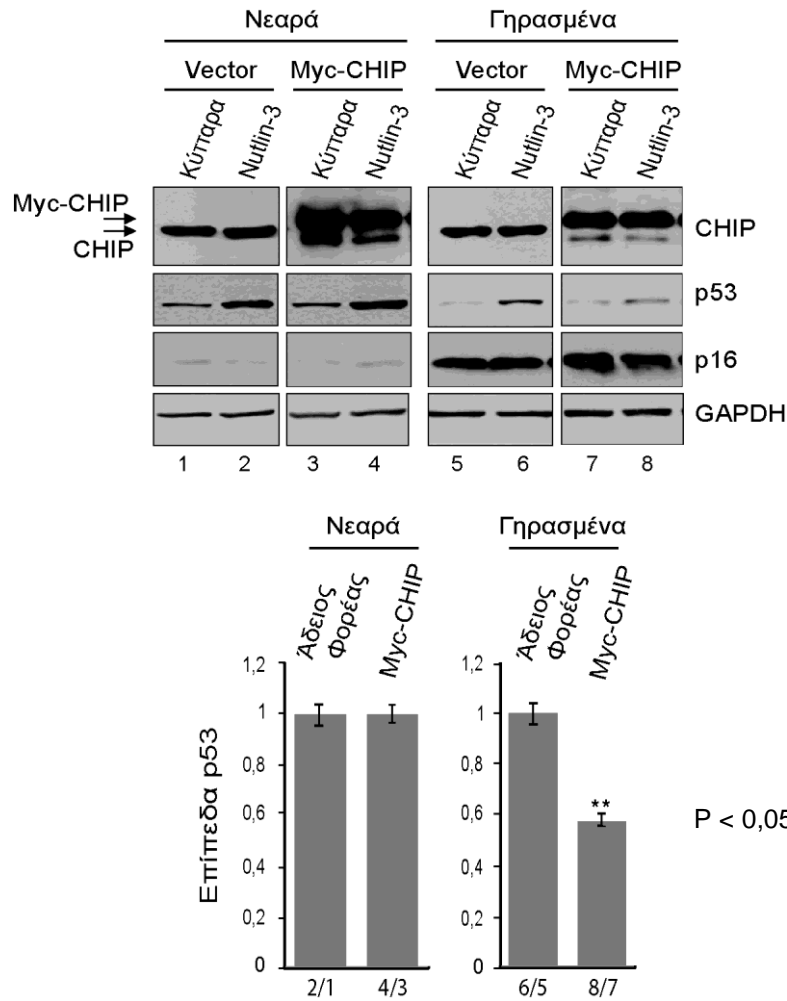
Απομονώθηκαν πρωτεΐνες από κύτταρα μάρτυρες (που δέχτηκαν την επίδραση του διαλύτη DMSO, control), από κύτταρα που δέχτηκαν την επίδραση 10  $\mu$ M Nutlin-3 (N) για 24 ώρες και από κύτταρα που διατηρήθηκαν σε φρέσκο μέσο καλλιέργειας για 2 και 4 ώρες μετά την απομάκρυνση του αναστολέα (Ανάκαμψη). Ηλεκτροφορήθηκαν 40  $\mu$ g ολικής πρωτεΐνης. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο γηρασμένος φαινότυπος των κυττάρων, στη μεμβράνη έγινε και ανίχνευση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης p16. Για να επιβεβαιωθεί το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων, ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα έκφρασης της GAPDH. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

Καθώς απομακρύνθηκε ο αναστολέας από τα κύτταρα, ενώ παράλληλα είχε συσσωρευτεί η λιγάση Mdm2 λόγω μεταγραφικής ρύθμισης από την p53, άρχισε η ραγδαία πρωτεόλυση της p53 μέσω της δράσης της Mdm2. Σύντομα, η διαθέσιμη ποσότητα των μορίων Mdm2 εξαντλήθηκε, ώσπου επήλθε εκ νέου ισορροπία μεταξύ p53 και Mdm2 στο εσωτερικό των κυττάρων. Αντίθετα, τα επίπεδα της Pirh2 και της CHIP δεν επηρεάστηκαν μεταξύ των νεαρών και των γηρασμένων κυττάρων, ούτε κατά τη διάρκεια της δράσης του αναστολέα

ούτε μετά την απομάκρυνσή του. Εντούτοις, είναι φανερό ότι η CHIP αυξήθηκε αξιοσημείωτα στα γηρασμένα κύτταρα.

Ακολούθως, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η CHIP λιγότερο διατηρεί την ιδιαίτερη δράση της κατά τη γήρανση ερήμην της δραστηρικής Mdm2, τα κύτταρα επιμολύνθηκαν εξωγενώς με CHIP σημασμένη με Myc και έπειτα μεταχειρίστηκαν με Nutlin-3. Όπως φαίνεται στην εικόνα 43, στα νεαρά κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί είτε με τον άδειο φορέα είτε με το πλασμίδιο Myc-CHIP, η χορήγηση του Nutlin-3 προκάλεσε παρόμοια επαγωγή στα επίπεδα της p53 (γραμμές 2 και 4, αντίστοιχα). Ομοίως, στα γηρασμένα κύτταρα που είχαν επιμολυνθεί με τον άδειο φορέα, ο αναστολέας Nutlin-3 οδήγησε σε σημαντική συσσώρευση της p53 (γραμμή 6). Αντιθέτως, η εξωγενής υπερέκφραση της CHIP στα γηρασμένα κύτταρα επέτρεψε μία στοιχειώδη μόνο αύξηση της p53 έπειτα από τη χορήγηση του Nutlin-3 (γραμμή 8). Αυτές οι παρατηρήσεις γίνονται πιο ξεκάθαρες από τη σύγκριση της αναλογίας των επιπέδων της p53 που συσσωρεύονται λόγω Nutlin-3 προς τα βασικά επίπεδα της p53, σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα που επιμολύνθηκαν με Myc-CHIP ή τον άδειο φορέα (Εικ. 43, γράφημα).

Κατά συνέπεια, προκύπτει αφενός ότι η ανασταλτική δράση του Nutlin-3 στην εξαρτώμενη από την Mdm2 αποδόμηση της p53 είναι εξίσου ισχυρή τόσο στα νεαρά όσο και στα γηρασμένα κύτταρα, αφετέρου η εξωγενής υπερέκφραση της CHIP είναι ικανή να εξουδετερώσει εν μέρει αυτό το αποτέλεσμα αλλά μόνο στους γηρασμένους ινοβλάστες. Αυτό το συμπέρασμα υποστηρίζει ακόμα περισσότερο την αρχική υπόθεση ότι η CHIP κατέχει έναν εξέχοντα ρόλο στη σταθεροποίηση της p53 κατά την είσοδο στην κυτταρική γήρανση.



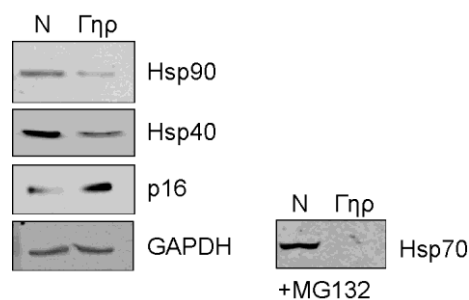
**Εικόνα 43** Χορήγηση του αναστολέα Nutlin-3 σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα που υπερεκφράζουν την CHIP λιγάση

Νεαρά και γηρασμένα κύτταρα επιμολύνθηκαν προσωρινά με 4 μg Myc-CHIP ή τον άδειο φορέα (vector) και τους χορηγήθηκαν 10 μM Nutlin-3 για 24 ώρες ώστε να ανασταλεί η αλληλεπίδραση μεταξύ p53 και Mdm2. 20 μg ολικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν με ανοσοστύπωμα. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι. Στο κάτω μέρος της εικόνας απεικονίζεται ο λόγος των επιπέδων της p53 μεταξύ επιμολυσμένων ή μη, με τη σημασμένη με Myc CHIP λιγάση, κυττάρων που χειρίστηκαν με Nutlin-3 και αυτών που δε δέχτηκαν αναστολέα. Ως 1 στο γράφημα, ορίστηκε η τιμή του λόγου των p53 επιπέδων των μη επιμολυσμένων κυττάρων. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων μετρήσεων ± τυπική απόκλιση (SD). Η τιμή p (p-value) προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια ελέγχου διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA Single Factor Test). Τιμή  $p < 0,05$  σημαίνει ότι η πιθανότητα οι παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα στα νεαρά και γηρασμένα κύτταρα, να οφείλονται σε τυχαιότητα και να μην είναι αληθείς, είναι μικρότερη του 0,05 %.

### 3.5.6 Μελέτη του CHIP-εξαρτώμενου μονοπατιού κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση

#### 3.5.6.1 Μελέτη της έκφρασης των μοριακών συνοδών πρωτεϊνών κατά τη γήρανση

Είναι καθιερωμένο ότι η CHIP λιγάση αλληλεπιδρά με τις κύριες σαπερόνες ή συνοδές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος, γνωστές και ως πρωτεΐνες θερμικού σοκ Hsp70, Hsp90 και Hsp40 [288]. Το σύστημα των συνοδών πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την CHIP λιγάση αποτελούν το μηχανισμό που ελέγχει τη σωστή δίπλωση-αναδίπλωση ή την πρωτεοσωμική αποδόμηση των κυτταρικών μορίων. Μεταξύ άλλων υποστρωμάτων, Η CHIP ουμπικιτυλιώνει και αποδομεί την p53 που είναι προσδεμένη από τις συνοδές πρωτεΐνες Hsp70 και Hsp90 [260, 267]. Δεδομένου του εναλλακτικού τρόπου έκφρασης της CHIP λιγάσης στα κύτταρα που υφίστανται γήρανση, μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα αυτών των συνοδών πρωτεϊνών, ώστε να ελεγχθεί εάν οι αλλαγές στην έκφραση της CHIP σημαίνουν και αλλαγές όλου του μονοπατιού αποδόμησης στο οποίο αυτή συμμετέχει.



**Εικόνα 44** Ανάλυση κατά Western των μοριακών συνοδών πρωτεϊνών σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα

Απομονώθηκαν πρωτεΐνες από νεαρά (N) και γηρασμένα (Γηρ) HFL-1 κύτταρα και ηλεκτροφορήθηκαν 20 μg ολικής πρωτεΐνης. Η Hsp70 πρωτεΐνη, λόγω της ταχείας ανακύκλωσής της, ανιχνεύεται μόνο έπειτα από χορήγηση του πρωτεοσωμικού αναστολέα MG132 στα κύτταρα. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

Στην εικόνα 44 φαίνεται ότι τα επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα στους γηρασμένους ινοβλάστες σε σχέση με τα φυσιολογικά νεαρά κύτταρα. Αυτή η παρατήρηση είναι πιθανή ένδειξη για ελάττωση της λειτουργικότητας του μηχανισμού που ελέγχει τη φυσιολογική δίπλωση-αναδίπλωση των κυτταρικών πρωτεϊνών κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση. Κατ' επέκταση, η ισορροπία του μηχανισμού αυτού είναι δυνατό να τείνει προς το μονοπάτι της αποδόμησης, με την CHIP λιγάση να διαδραματίζει

τον κύριο ρόλο στη στόχευση των μη φυσιολογικά διπλωμένων υποστρωμάτων προς το πρωτεόσωμα.

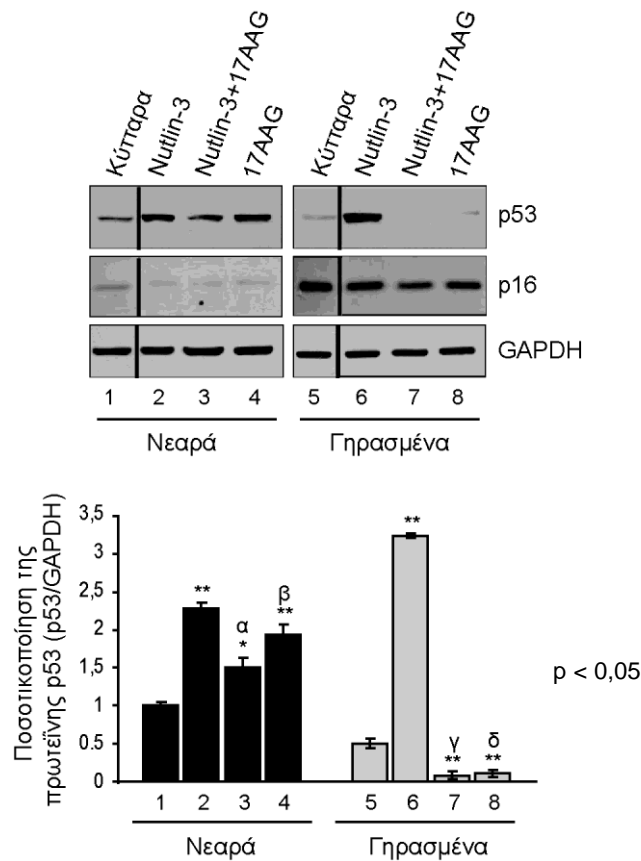
### 3.5.6.2 Μελέτη της αποδόμησης της p53 έπειτα από αναστολή της Hsp90 ενεργότητας

Σε φυσιολογικές συνθήκες στο κύτταρο, τα επίπεδα της p53 πρωτεΐνης βρίσκονται σε μία ισορροπία μεταξύ της διαδικασίας του διπλώματος και της πρωτεολυτικής αποδόμησης. Η νεοσυντιθέμενη ή μη διπλωμένη πρωτεΐνη p53 προσδένεται από την Hsp70 και σε συνεργασία με τις άλλες σαπερόνες, Hsp40 και Hop, η p53 μεταβαίνει στην επόμενη διαδικασία. Συγκεκριμένα, η Hop διευκολύνει τη σύνδεση του υποστρώματος της Hsp70 με την Hsp90 [302, 303]. Εκ φύσεως μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες σχηματίζουν σταθερό σύμπλοκο με τις σαπερόνες και η ενεργότητα της Hsp90 συμβάλλει ώστε να αποτραπεί η αποδόμησή τους. Εάν η ενεργότητα της Hsp90 είναι χαμηλή, τότε οι μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες, μεταξύ των οποίων και μόρια p53, συνδέονται στο σύμπλοκο Hsp70/CHIP. Η TPR περιοχή της CHIP λιγάσης συνδέεται στην COOH-τελική περιοχή της Hsp70 και η U-box περιοχή είναι υπεύθυνη για την ουμπικιτυλίωση των μη σωστά διπλωμένων p53 πρωτεϊνών. Η ουμπικιτυλιωμένη p53 πρωτεΐνη αποδομείται από το πρωτεόσωμα (βλ. §1.4.5.3).

Καθώς τα επίπεδα της Hsp90 βρέθηκαν μειωμένα κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση (Εικ. 44) και προκειμένου να εκτιμηθεί η προηγούμενη υπόθεση σχετικά με την υπερίσχυση του μονοπατιού αποδόμησης με τη συμμετοχή της CHIP λιγάση κατά τη γήρανση, μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής της ενεργότητας της Hsp90 στο προφίλ έκφρασης της p53 τόσο στα νεαρά όσο και στα γηρασμένα κύτταρα. Πειραματικά, χρησιμοποιείται συχνά ένα ανάλογο της γελδαναμυκίνης, ο αναστολέας 17AAG, που μπλοκάρει τη δράση της Hsp90 και συνακόλουθα, το σωστό δίπλωμα των υποστρωμάτων της, μεταξύ των οποίων και την πρωτεΐνη p53. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων (1 έως 10  $\mu\text{M}$ ) του αναστολέα για διάφορα χρονικά διαστήματα (1 έως 24 ώρες) και βρέθηκε ότι 4  $\mu\text{M}$  17AAG για 24 ώρες έχουν μία ιδιαίτερη επίδραση στην έκφραση της p53 πρωτεΐνης διαφορετική στα νεαρά από τα γηρασμένα κύτταρα.

Πράγματι, η χορήγηση 17AAG στους ινοβλάστες αποκάλυψε σημαντικές διαφοροποιήσεις στο προφίλ σταθερότητας της p53 (Εικ. 45), προτείνοντας διαφορές στο μηχανισμό αποδόμησης της p53 που εξαρτάται από τις σαπερόνες, μεταξύ νεαρών και γηρασμένων κυττάρων. Επιπλέον, ο αναστολέας 17AAG συνδυάστηκε και με τη χορήγηση του Nutlin-3, που έχει δείχτει ότι συσσωρεύει την πρωτεΐνη p53 και στα νεαρά και στα γηρασμένα κύτταρα (Εικ. 42). Όπως φαίνεται στην εικόνα 45, στα νεαρά κύτταρα η αγωγή με Nutlin-3

οδήγησε στην αναμενόμενη συσσώρευση της p53 (γραμμή 2), αλλά η ακόλουθη προσθήκη 17AAG δε μετέβαλε ουσιαστικά τα επίπεδα της p53 (γραμμή 3). Ομοίως, όταν ο αναστολέας προστέθηκε μόνος του στα κύτταρα δεν προκάλεσε καμία αποδόμηση στην p53 (γραμμή 4). Αντιθέτως, στα γηρασμένα κύτταρα, η χορήγηση του 17AAG επέγαγε την πλήρη αποδόμηση τόσο των φυσιολογικών επιπέδων της πρωτεΐνης p53 (γραμμή 8 έναντι 5), όσο και των συσσωρευμένων επιπέδων της έπειτα από την αγωγή με Nutlin-3 (γραμμή 7 έναντι 6). Αυτά τα δεδομένα δεικνύουν ότι η αναστολή της Hsp90 ενεργότητας οδηγεί σε ραγδαία αποδόμηση της p53 μόνο στα γηρασμένα κύτταρα (γραμμή 8 έναντι 4), πιθανά λόγω των αυξημένων επιπέδων και ενεργότητας της CHIP λιγάσης, η οποία εξαρτάται από τις σαπερόνες για τη δράση της.



**Εικόνα 45** Ανάλυση κατά Western της p53 έπειτα από αναστολή της ενεργότητας της Hsp90 σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα

Τα κύτταρα δέχτηκαν την επίδραση 10 μM Nutlin-3 για 24 ώρες, για να συσσωρευτεί η p53 και συνακόλουθα, την επίδραση 4 μM 17AAG για 24 ώρες, ώστε να μπλοκάρει η ενεργότητα της Hsp90. Επίσης, 17AAG χορηγήθηκε μόνος του στα κύτταρα για 24 ώρες, ώστε να ελεγχθεί η επίδρασή του στα φυσιολογικά επίπεδα της p53. Απομονώθηκαν πρωτεΐνες και ηλεκτροφορήθηκαν 20 μg ολικής πρωτεΐνης. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται



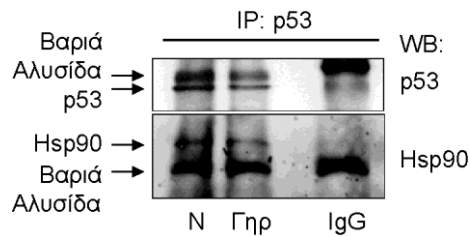
στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι. Στο κάτω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η ποσοτικοποίηση της p53 πρωτεΐνης. Η κλίμακα που χρησιμοποιείται στον κάθετο άξονα είναι λογαριθμική. Οι τιμές έχουν εκφραστεί ως % ποσοστά, όπου ως 1 (100%) έχει οριστεί η τιμή στα νεαρά κύτταρα. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο 3 ανεξάρτητων μετρήσεων  $\pm$  τυπική απόκλιση (SD). Η τιμή p (p-value) προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια ελέγχου διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (ANOVA Single Factor Test). Τιμή  $p < 0,05$  σημαίνει ότι η πιθανότητα οι παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα στα νεαρά και γηρασμένα κύτταρα, να οφείλονται σε τυχαιότητα και να μην είναι αληθείς, είναι μικρότερη του 0,05 %. <sup>a</sup> $p < 0.1$  ως σύγκριση με τα νεαρά κύτταρα που δέχτηκαν Nutlin-3 (γραμμή 2), <sup>b</sup> $p < 0.05$  ως σύγκριση με τα φυσιολογικά νεαρά κύτταρα (γραμμή 1), <sup>γ</sup> $p < 0.05$  ως σύγκριση με τα γηρασμένα κύτταρα που δέχτηκαν Nutlin-3 (γραμμή 6) και <sup>δ</sup> $p < 0.05$  ως σύγκριση με τα φυσιολογικά γηρασμένα κύτταρα (γραμμή 5).

### 3.5.6.3 Μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ p53 και Hsp90

Από τα προηγούμενα αποτελέσματα προέκυψαν αλλαγές στο πρότυπο αποδόμησης της p53 πρωτεΐνης, μεταξύ νεαρών και γηρασμένων κυττάρων λόγω της δράσης του 17AAG αναστολέα. Προκειμένου να εξαλειφθεί η πιθανότητα οι παρατηρούμενες αλλαγές να οφείλονται σε διαφορές στη σχέση ανάμεσα στην p53 και την Hsp90 μεταξύ νεαρών και γηρασμένων κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, ώστε να εκτιμηθεί αυτή η συσχέτιση. Στην εικόνα 46 φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση ανάμεσα στην p53 πρωτεΐνη και τη σαπερόνη Hsp90 διατηρείται στα γηρασμένα όπως και στα νεαρά κύτταρα. Επομένως, δεν υπάρχει μειωμένη αλληλεπίδραση μεταξύ p53 και Hsp90 κατά τη γήρανση, που να δικαιολογεί την αποδόμηση της p53. Για το λόγο αυτό μπορεί να προταθεί ότι η χορήγηση του αναστολέα 17AAG οδήγησε σε πρωτεολυτική αποδόμηση την p53 μόνο στα γηρασμένα κύτταρα εξαιτίας της αυξημένης δράσης της CHIP λιγάσης, μίας λιγάσης ιδιαίτερα εξαρτώμενης από το γηρασμένο φαινότυπο.

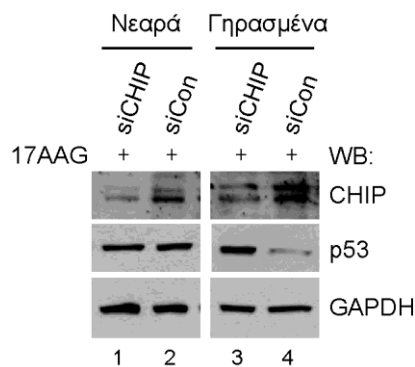
Το ενδεχόμενο η CHIP λιγάση να ευθύνεται για την πρωτεολυτική αποδόμηση της p53 έπειτα από την αναστολή της Hsp90 ενεργότητας λόγω της χρήσης του αναστολέα 17AAG, υποστηρίζεται επιπλέον από το παρακάτω αποτέλεσμα. Δοκιμάστηκε η δράση του αναστολέα 17AAG μετά από καταστολή της έκφρασης των ενδογενών επιπέδων της CHIP λιγάσης, με τη χρήση ειδικών siRNA ολιγονουκλεοτιδίων, σε νεαρά και γηρασμένα κύτταρα (Εικ. 47). Συγκεκριμένα, στα νεαρά κύτταρα, τα επίπεδα της p53 παρέμειναν σταθερά έπειτα από την αγωγή με 17AAG, ανεξαρτήτως της επιμόλυνσης με siCHIP (γραμμές 1 και 2). Αντίθετα, όμως, στα γηρασμένα κύτταρα η επιμόλυνση με τα ειδικά siCHIP

ολιγονουκλεοτίδια δεν επέτρεψε την αποδόμηση της p53 μετά από την προσθήκη του 17AAG (γραμμή 3), όπως είχε συμβεί σε κύτταρα που δεν είχαν επιμολυνθεί με siCHIP (Εικ. 45). Σε συνθήκες, λοιπόν, που η CHIP δεν εκφράζεται, η αναστολή της Hsp90 ενεργότητας δεν είναι ικανή να επάγει την αποδόμηση της p53. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει ότι η αποδόμηση της p53 κατά τη γήρανση εξαρτάται κατεξοχήν από την CHIP λιγάση και το σύστημα των σαπερονών.



**Εικόνα 46 Ανάλυση κατά Western της αλληλεπίδρασης μεταξύ της p53 και της Hsp90**

Απομονώθηκαν πρωτεΐνες από νεαρά και γηρασμένα κύτταρα με τη χρήση άλατος του μολύβδου προκειμένου να σταθεροποιηθεί το σύμπλοκο p53-Hsp90, πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμνιση (immunoprecipitation, IP) ως προς p53 και ηλεκτροφορήθηκαν 250 μg πρωτεΐνης για ανάλυση με ανοσοστύπωμα. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικός ορός IgG. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

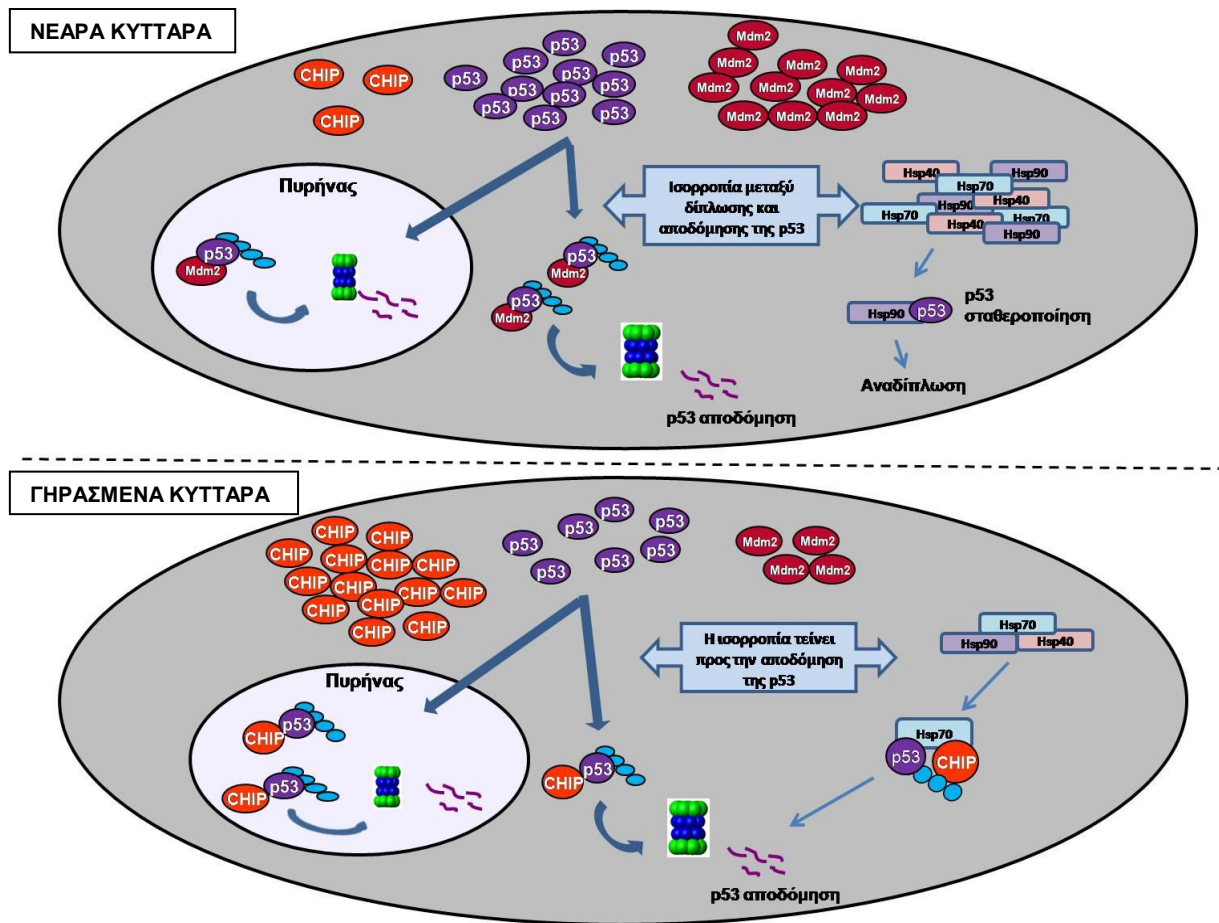


**Εικόνα 47 Ανάλυση κατά Western της p53 πρωτεΐνης έπειτα από τη δράση του αναστολέα 17AAG σε κύτταρα στα οποία έχει αποσιωπηθεί η έκφραση της CHIP**

Νεαρά και γηρασμένα κύτταρα επιμολύνθηκαν προσωρινά δύο φορές με το άδειο χωρίς ειδικό στόχο (siCon) ή με το ειδικό ολιγονουκλεοτίδιο siCHIP και τους χορηγήθηκαν 4 μM 17AAG για 24 ώρες. Απομονώθηκαν πρωτεΐνες και ηλεκτροφορήθηκαν 20 μg για ανάλυση με ανοσοστύπωμα. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

**Συμπέρασμα 5:**

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η CHIP λιγάση εκτός από τα αυξημένα επίπεδα που παρουσιάζει στα γηρασμένα κύτταρα, επιπλέον εμφανίζει αυξημένα επίπεδα ουμπικιτυλίωσης που είναι ενδεικτικά για την αυξημένη ενζυμική της ενεργότητα. Ακόμα, μετατοπίζεται εν μέρει στον πυρήνα των κυττάρων κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση, όπου είναι δυνατό να συμμετέχει στην αποδόμηση των πυρηνικών πρωτεϊνών, όπως η p53. Άλλωστε η εξωγενής υπερέκφραση της CHIP στα νεαρά κύτταρα, προσομοιάζοντας τις συνθήκες στα γηρασμένα κύτταρα, απέδειξε ότι όταν η CHIP επάγεται, στοχεύει την p53 προς πρωτεολυτική αποδόμηση. Επιπρόσθετα, όλες οι αναλύσεις είτε της υπερέκφρασης είτε της αποσιώπησης της CHIP, αλλά και της βασικής λιγάσης της p53, της Mdm2, σε συνδυασμό με την αναστολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ p53-Mdm2, απέδειξαν ότι η CHIP κατέχει έναν εξέχοντα ρόλο στη ρύθμιση της σταθερότητας της p53 κατά την κυτταρική γήρανση. Τέλος, από τη μελέτη του συστήματος των μοριακών σαπερονών κατά τη γήρανση, οι οποίες βρέθηκαν υποεκφρασμένες, προέκυψε ότι παρόλο που η p53 διατηρεί την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με την Hsp90 και να είναι λειτουργική, η δράση της CHIP υπερισχύει στοχεύοντας την p53 προς πρωτεολυτική αποδόμηση. Άρα, η ισορροπία αυτού του συστήματος κλίνει προς το μονοπάτι της αποδόμησης, με την CHIP λιγάση να διαδραματίζει τον κυρίαρχο ρόλο στη στόχευση των μορίων p53 προς το πρωτεόσωμα (Εικ. 48).



Εικόνα 48 Απεικόνιση του συστήματος αναδίπλωσης/αποδόμησης της p53 με τη συμβολή των βασικών λιγασών της, Mdm2 και CHIP, στα νεαρά και στα γηρασμένα κύτταρα

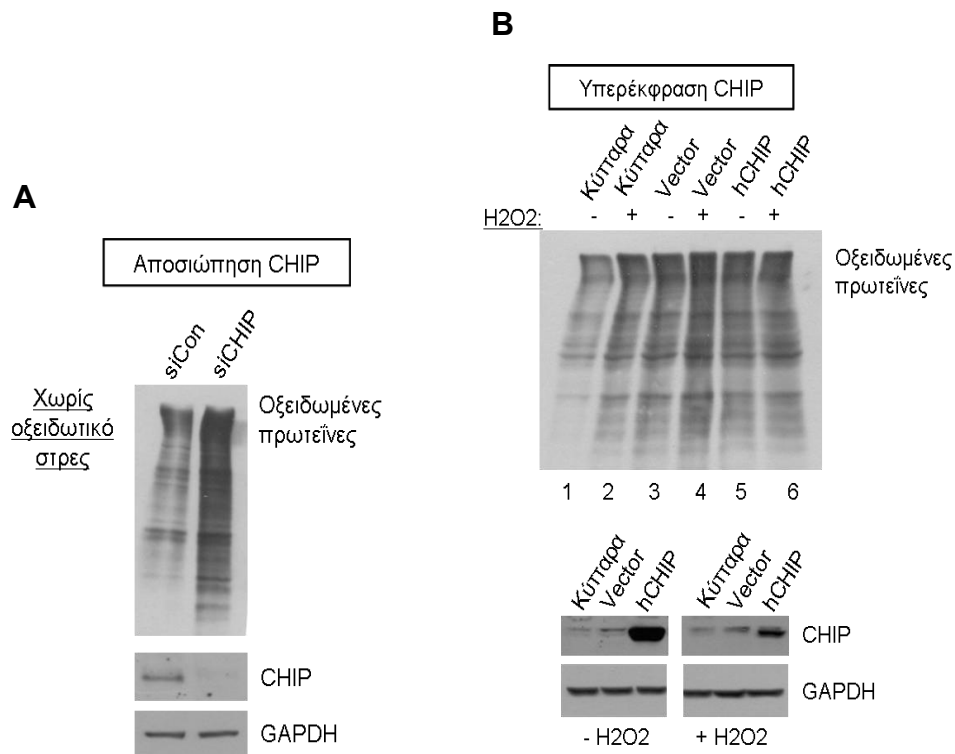
### 3.6 Κυτταροπροστατευτική δράση της CHIP λιγάσης

Η CHIP λιγάση είναι γνωστή ως πρωτεΐνη ελέγχου της ποιότητας των πρωτεϊνών του κυττάρου. Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της CHIP λιγάσης στο οξειδωτικό φορτίο των κυττάρων, μετρήθηκαν τα επίπεδα των οξειδωμένων πρωτεϊνών σε συνθήκες οξειδωτικού στρες ή μη, κατά την αποσιώπηση της έκφρασης ή την προσωρινή υπερέκφραση της CHIP. Μελετήθηκαν τόσο φυσιολογικοί ανθρώπινοι ινοβλάστες HFL-1 (βλ. §3.6.1), όσο και αθανатоποιημένοι ινοβλάστες ποντικού (βλ. §3.6.2).

#### 3.6.1 Η CHIP λιγάση προστατεύει τα HFL-1 έναντι των οξειδωμένων πρωτεϊνών

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της CHIP λιγάσης στα επίπεδα οξειδωτικού φορτίου των φυσιολογικών ανθρώπινων ινοβλαστών HFL-1, πραγματοποιήθηκε τόσο αποσιώπηση της έκφρασης της CHIP (Εικ. 49Α), όσο και προσωρινή υπερέκφρασή της (Εικ. 49Β) και στη συνέχεια, ελέγχθηκαν τα επίπεδα των οξειδωμένων πρωτεϊνών. Στην περίπτωση της αποσιώπησης της έκφρασης της CHIP λιγάσης με τα κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια (siCHIP), παρατηρήθηκαν πολύ υψηλά επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες siCon (Εικ. 49Α). Επομένως, φαίνεται πως όταν δεν εκφράζεται η CHIP λιγάση στα κύτταρα, οι οξειδωμένες πρωτεΐνες δεν μπορούν να αποδομηθούν και συσσωρεύονται.

Στη συνέχεια, η υπερέκφραση της CHIP συνδυάστηκε με την επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα  $H_2O_2$ . Όπως φαίνεται στην εικόνα 49Β, η παρουσία του  $H_2O_2$  στα φυσιολογικά κύτταρα που δεν έχουν επιμολυνθεί με κάποιο φορέα έκφρασης οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών (γραμμή 2 έναντι 1). Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει όταν τα κύτταρα έχουν επιμολυνθεί με τον άδειο φορέα (vector) (γραμμή 4 έναντι 3). Όταν, όμως, τα κύτταρα έχουν προηγουμένως επιμολυνθεί με το φορέα έκφρασης του ανθρώπινου γονιδίου CHIP και συνακόλουθα χειριστεί με το  $H_2O_2$ , τα επίπεδα των οξειδωμένων πρωτεϊνών είναι μειωμένα σε σύγκριση τόσο με τα κύτταρα που δε δέχτηκαν  $H_2O_2$  όσο και με τα κύτταρα που δέχτηκαν τον άδειο φορέα και χειρίστηκαν με το  $H_2O_2$  (γραμμή 6 έναντι 5 και 4, αντίστοιχα). Συνεπώς, η επαγωγή της έκφρασης της CHIP λιγάσης στους ανθρώπινους ινοβλάστες προστατεύει τα κύτταρα από τις οξειδωμένες πρωτεΐνες, οι οποίες φαίνεται να οδηγούνται στο πρωτεόσωμα για αποδόμηση.

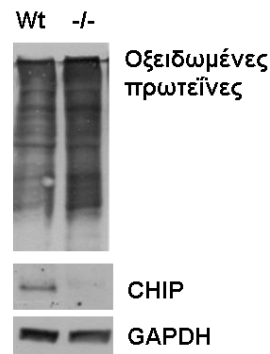


#### Εικόνα 49 Μέτρηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών στα HFL-1 κύτταρα

Απομονώθηκαν πρωτεΐνες από (A) φυσιολογικά νεαρά κύτταρα, τα οποία επιμολύνθηκαν προσωρινά δύο φορές με το άδειο, χωρίς ειδικό στόχο (siCon), ή με το ειδικό ολιγονουκλεοτίδιο siCHIP. (B) Επίσης, απομονώθηκαν πρωτεΐνες από κύτταρα τα οποία προσωρινά επιμολύνθηκαν με 4  $\mu$ g από τον άδειο φορέα έκφρασης (vector) ή από αυτόν που φέρει το ανθρώπινο γονίδιο CHIP και στη συνέχεια, δέχτηκαν ή όχι την επίδραση 300  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 20 ώρες. Η ανίχνευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών έγινε με τη βοήθεια του «OxyBlot oxidised protein detection kit» και την ακόλουθη ανάλυσή τους κατά Western. Σε ξεχωριστή μεμβράνη ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα της CHIP, ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχία των επιμολύνσεων, αλλά και η GAPDH για να επιβεβαιωθεί το ισοφόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

### 3.6.2 Η CHIP λιγάση προστατεύει τα MEFs έναντι των οξειδωμένων πρωτεϊνών

Όπως βρέθηκε προηγούμενα (βλ. §3.6.1), η CHIP λιγάση επηρεάζει το οξειδωτικό φορτίο σε ανθρώπινους ινοβλάστες HFL-1. Προέκυψε, λοιπόν, το ερώτημα εάν η CHIP λιγάση μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα των οξειδωμένων πρωτεϊνών και σε ινοβλάστες ποντικού (mouse embryonic fibroblasts, MEFs). Για το λόγο αυτό, παρόμοια πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε αθανατοποιημένους ινοβλάστες άγριου τύπου (Wild-type, Wt), αλλά και ινοβλάστες στους οποίους έχει αφαιρεθεί το γονίδιο της CHIP λιγάσης (CHIP<sup>-/-</sup>) [395]. Αρχικά, ελέγχθηκε το οξειδωτικό φορτίο που υφίσταται φυσιολογικά στους ινοβλάστες αγρίου τύπου σε σύγκριση με τους CHIP<sup>-/-</sup> ινοβλάστες και βρέθηκε ότι οι ινοβλάστες που δεν εκφράζουν την CHIP λιγάση έχουν ενδογενώς αυξημένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών (Εικ. 50).

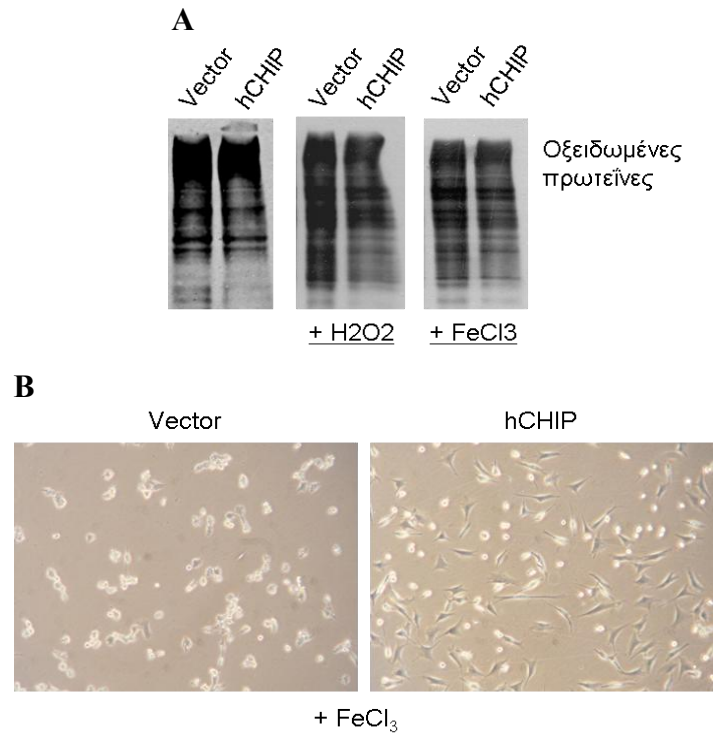


#### Εικόνα 50 Επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών σε ινοβλάστες ποντικού που εκφράζουν ή όχι την CHIP λιγάση

Απομονώθηκαν πρωτεΐνες από ινοβλάστες ποντικού, τόσο άγριου τύπου (Wt) όσο και κυττάρων από τα οποία έχει αφαιρεθεί το γονίδιο της CHIP (CHIP<sup>-/-</sup>) και ανιχνεύτηκαν οι οξειδωμένες πρωτεΐνες με τη βοήθεια του «OxyBlot oxidised protein detection kit» και την ακόλουθη ανάλυσή τους κατά Western. Σε ξεχωριστή μεμβράνη ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα των CHIP και GAPDH. Τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών αναφέρονται στον πίνακα 3 στα Υλικά και Μέθοδοι.

Στη συνέχεια, προκειμένου να επιβεβαιωθεί περαιτέρω το παραπάνω αποτέλεσμα, ινοβλάστες άγριου τύπου επιμολύνθηκαν προσωρινά με τον άδειο φορέα ή το φορέα έκφρασης του γονιδίου της CHIP και δέχτηκαν ή όχι την επίδραση οξειδωτικών παραγόντων, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ή FeCl<sub>3</sub>. Έτσι, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα οξειδωμένων πρωτεϊνών στα κύτταρα που υπερέκφραζαν την CHIP λιγάση, τόσο ενδογενώς όσο και έπειτα από την επίδραση των οξειδωτικών παραγόντων (Εικ. 51Α). Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι

παρουσία του  $\text{FeCl}_3$ , τα κύτταρα που υπερέκφραζαν την CHIP λιγάση παρουσίασαν καλύτερη μορφολογία (Εικ. 51B, δεξιά εικόνα έναντι της αριστερής).



**Εικόνα 51 Μειωμένες οξειδωμένες πρωτεΐνες και καλύτερη μορφολογία των κυττάρων ποντικού που υπερέκφράζουν την CHIP λιγάση**

(A) Μέτρηση των επιπέδων των οξειδωμένων πρωτεϊνών με τη βοήθεια του «OxyBlot oxidised protein detection kit» σε ινοβλάστες ποντικού, που επιμολύνθηκαν με το φορέα έκφρασης του γονιδίου της CHIP ή με τον άδειο φορέα, πριν και μετά την επίδραση με οξειδωτικούς παράγοντες και συγκεκριμένα με  $300 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  για 20 ώρες ή με  $0,1 \text{ mM FeCl}_3$  για 2,5 ώρες. (B) Μορφολογία των κυττάρων που επιμολύνθηκαν προσωρινά με  $4 \mu\text{g}$  του φορέα έκφρασης της CHIP λιγάσης ή του άδειου φορέα vector, έπειτα από επίδραση με  $0,1 \text{ mM FeCl}_3$  για 2,5 ώρες.

**Συμπέρασμα 6:**

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η CHIP λιγάση φαίνεται ότι δρα κυτταροπροστατευτικά έναντι του οξειδωτικού φορτίου τόσο σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες HLF-1, όσο και σε αθανατοποιημένους ινοβλάστες ποντικού. Συγκεκριμένα, η παρουσία και ακόμα περισσότερο, η επαγωγή της έκφρασης της CHIP στα κύτταρα οδηγεί σε μείωση των επιπέδων των οξειδωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες πιθανά οδηγούνται στο πρωτεόσωμα για αποδόμηση. Αντίθετα, η αποσιώπηση της έκφρασης της CHIP λιγάσης ενισχύει τη συσσώρευση του οξειδωτικού φορτίου στα κύτταρα.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έχει προηγουμένα δειχθεί ότι η CHIP λιγάση μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της p53 μέσω ουμπικιτυλίωσης και περαιτέρω αποδόμησης από το 26S πρωτεόσωμα [260]. Σε αυτή τη διδακτορική διατριβή δείχτηκε ότι η CHIP είναι η μόνη λιγάση της p53 πρωτεΐνης, η οποία αυξάνει κατά την αναδιπλασιαστική γήρανση και ταυτόχρονα, μετατοπίζεται μερικώς στον πυρήνα των κυττάρων. Επιπλέον, δείχτηκε ότι η ίδια η ουμπικιτυλίωση της CHIP επάγεται κατά τη γήρανση των ινοβλαστών, γεγονός που αποτελεί πιθανή ένδειξη για αυξημένη ενζυμική ενεργότητα λιγάσης ουμπικιτίνης, η οποία διευκολύνει τη στόχευση των υποστρωμάτων της CHIP προς το πρωτεόσωμα. Είναι αξιοσημείωτο ότι για πρώτη φορά σε αυτή τη μελέτη καθιερώνεται η άποψη ότι η πρωτεολυτική αποδόμηση της p53 που εξαρτάται από το σύστημα των μοριακών συνοδών πρωτεϊνών λαμβάνει χώρα ειδικά κατά την κυτταρική γήρανση. Επομένως, προτείνεται ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ της p53 πρωτεΐνης και της CHIP λιγάσης συμβαίνει κυρίως κατά τη διάρκεια της αναδιπλασιαστικής γήρανσης.

Επιπρόσθετα, σε αυτήν τη διατριβή δείχθηκε για πρώτη φορά ότι η σταθερά μειωμένη έκφραση της CHIP οδηγεί *in vitro* τους ανθρώπινους εμβρυικούς ινοβλάστες σε μειωμένο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τελικά σε πρόωρη γήρανση. Ακόμα, η CHIP λιγάση φαίνεται ότι δρα κυτταροπροστατευτικά έναντι του οξειδωτικού φορτίου τόσο στους φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες HLF-1, όσο και σε αθανατοποιημένους ινοβλάστες ποντικού. Συγκεκριμένα, η παρουσία και ακόμα περισσότερο η επαγωγή της έκφρασης της CHIP στα κύτταρα οδηγεί σε μείωση των επιπέδων των οξειδωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες πιθανά οδηγούνται στο πρωτεόσωμα για αποδόμηση. Αντίθετα, η αποσιώπηση της έκφρασης της CHIP λιγάσης ενισχύει την αύξηση του οξειδωτικού φορτίου.

Ο βασικός ρόλος των μοριακών σαπερονών είναι η σωστή δίπλωση/αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδίων, με σκοπό τη δημιουργία ενεργών πρωτεϊνών και την αποφυγή της αποδιάταξής τους, που οδηγεί στο σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, τα αγγρεσώματα [399, 400]. Η σημασία της δράσης των μοριακών σαπερονών διαπιστώνεται ιδιαίτερα κατά τη βιολογική γήρανση, ή σε συνθήκες στρες, αλλά και σε διάφορες ανωμαλίες οι οποίες είναι γνωστό ότι προκαλούν το ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών και το σχηματισμό αγγρεσωμάτων. Όσον αφορά τη διαδικασία της βιολογικής γήρανσης, μελέτες στο νηματώδη σκώληκα *C. elegans* και τη φρουτόμυγα *D. melanogaster* προτείνουν ότι αυτές οι σαπερόνες ελέγχουν άμεσα τη διάρκεια ζωής των οργανισμών. Για παράδειγμα, η καταστολή της

έκφρασης του γονιδίου Hsf1 στο *C. elegans* μειώνει το χρόνο ζωής του σκόληκα και η καταστολή του mtHsp70 οδηγεί στην εμφάνιση φαινοτύπου που μοιάζει με προγηρία [401, 402]. Κατ' αναλογία, σε μοντέλα θηλαστικών, οι σαπερόνες προσπαθούν να διατηρήσουν την πρωτεϊνική ομοιοστασία όταν ο οργανισμός ασθενεί ή ως απόκριση σε κάποιο στρες. Παρά τις προαναφερθείσες μελέτες, δεν υπάρχει άμεση ένδειξη για συσχέτιση μεταξύ των μοριακών σαπερονών και της διάρκειας ζωής των θηλαστικών *in vivo*.

Σε μία πρόσφατη μελέτη, προτάθηκε ότι η CHIP λιγάση αποτελεί έναν ουσιώδη ρυθμιστή του χρόνου ζωής των θηλαστικών. Συγκεκριμένα, ποντίκια στα οποία είχε εξαλειφθεί το γονίδιο της CHIP λιγάσης εμφάνισαν πρόωρα γηρασμένο φαινότυπο και μειωμένη διάρκεια ζωής. Το φαινόμενο της πρόωρης γήρανσης αποδείχτηκε σε αυτά τα ποντίκια και σε κυτταρικό επίπεδο. Τα πειράματα, επίσης, έδειξαν ότι η απαλοιφή του γονιδίου της CHIP οδηγεί σε υπερβολική συσσώρευση κατεστραμμένων πρωτεϊνών, καθώς και σε μειωμένη ενεργότητα του πρωτεοσώματος. Η απουσία της CHIP δημιούργησε γενικότερα προβλήματα στο μηχανισμό ελέγχου της ποιότητας των κυτταρικών πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό πιθανά ευθύνεται για την εμφάνιση της πρόωρης γήρανσης που παρατηρήθηκε σε αυτά τα ποντίκια. Αυτή η αναφορά αποτέλεσε την πρώτη σαφή ένδειξη της σχέσης μεταξύ των μοριακών σαπερονών και της διάρκειας ζωής των θηλαστικών *in vivo*, παρόλο που η μηχανιστική βάση της επιταχυνόμενης γήρανσης στα CHIP<sup>-/-</sup> ποντίκια δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή [395]. Στην παρούσα διατριβή δείχτηκε για πρώτη φορά ότι η σταθερά μειωμένη έκφραση της CHIP οδηγεί *in vitro* τους ανθρώπινους εμβρυικούς ινοβλάστες σε μειωμένο ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τελικά σε πρόωρη γήρανση, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης στα CHIP<sup>-/-</sup> ποντίκια.

Είναι γνωστό ότι ο έλεγχος της πρωτεϊνικής ποιότητας του κυττάρου εξασφαλίζει την κυτταρική ομοιοστασία τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες στρες. Εκτός από τη διατήρηση της κατάλληλης πρωτεϊνικής διαμόρφωσης/αναδίπλωσης μέσω του μηχανισμού των σαπερονών, το σύστημα πρωτεϊνικής αποδόμησης και ιδιαίτερα η αποδόμηση από το 26S πρωτεόσωμα μέσω ουμπικιτυλίωσης (UPS) συμβάλλει στην απομάκρυνση των κατεστραμμένων, μη σωστά διπλωμένων και δυνητικά τοξικών πρωτεϊνών. Όπως έχουν δείξει μελέτες σε τρωκτικά αλλά και σε ανθρώπους, η λειτουργία του UPS μειώνεται με τη γήρανση [322, 403]. Η λειτουργική αναποτελεσματικότητα του UPS αυξάνει τον αριθμό των βλαβερών και μη σωστά διπλωμένων πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη συνολική φθορά του συστήματος ελέγχου της πρωτεϊνικής ποιότητας του κυττάρου τόσο κατά τη γήρανση όσο και σε διάφορες ασθένειες [404]. Όμως, ακόμα και η μειωμένη έκφραση των μορίων που συμμετέχουν στην ομαλή λειτουργία του UPS επηρεάζει

τη φυσιολογική δράση του συστήματος ελέγχου της πρωτεϊνικής ποιότητας. Για παράδειγμα, η απαλοιφή του γονιδίου CHIP από τα ποντίκια επάγει τη συσσώρευση τοξικών ολιγομερών των πρωτεϊνών και οδηγεί σε μειωμένες πρωτεοσωμικές ενεργότητες [395].

Από την άλλη πλευρά, μία ποικιλία *in vivo* μοντέλων με διαφοροποιημένη p53 λειτουργία χαρακτηρίζουν την p53 ως ρυθμιστή της γήρανσης σε αυτά τα συστήματα [348, 349, 405-407]. Σε αυτές τις μελέτες, η p53 θεωρείται ότι έχει ενεργότητα είτε προ-γηρίας είτε αντι-γήρανσης. Προκειμένου να εξηγήσουν αυτό το φαινόμενο, ο Serrano και οι συνεργάτες του πρότειναν το εξής: μία στοιχειώδης, φυσιολογικά ρυθμιζόμενη αύξηση της δόσης του γονιδίου p53 μπορεί πιθανά να προστατεύσει από βλάβες καθυστερώντας την εμφάνιση της γήρανσης. Αντίθετα, η μόνιμη ενεργοποίηση του γονιδίου p53 εξαντλεί την αναγεννητική ικανότητα των ιστών, επάγοντας απόπτωση και/ή γήρανση, που τελικά οδηγεί σε πρόωρη γήρανση [393]. Πάντως, ο ακριβής φυσιολογικός ρόλος της p53 πρωτεΐνης στη γήρανση παραμένει απροσδιόριστος, με αποτέλεσμα να θεωρείται ότι κάποιος πρόσθετος μηχανισμός(-οί) μπορεί να έχει αποφασιστικό ρόλο επάνω στην προ-γηραντική ή αντι-γηραντική ενεργότητα της p53.

Το επίπεδο της ποικιλομορφίας των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της p53 που επηρεάζει τη σταθερότητα και δραστηριότητά της, προκάλεσε το ενδιαφέρον για τη μελέτη του ρυθμιστικού μηχανισμού σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της p53 και των μορίων που ελέγχουν τη σταθεροποίησή της. Έτσι, σε αυτήν τη διατριβή αναλύθηκε επιτυχώς ο τρόπος με τον οποίο τα μόρια που είναι υπεύθυνα για την συμπικτυλίωση και την περαιτέρω πρωτεοσωμική αποδόμηση της p53 αλλάζουν κατά τη διάρκεια της αναδιπλασιαστικής γήρανσης, καθώς και εάν αυτές οι αλλαγές συμβαδίζουν με το πρότυπο της σταθερότητας της p53 κατά τη διάρκεια της αναδιπλασιαστικής γήρανσης των ανθρώπινων ινοβλαστών. Δείχτηκε, λοιπόν, ότι τα επίπεδα της p53 μειώνονται σημαντικά στους γηρασμένους ινοβλάστες και ταυτόχρονα, η CHIP λιγάζει επάγεται από πολύ χαμηλά επίπεδα στα νεαρά κύτταρα σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα κατά την είσοδο των κυττάρων σε φάση γήρανσης. Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί ότι η ρύθμιση των επιπέδων της p53 δεν έδειξε κάποια διαφορά στα γηρασμένα σε σύγκριση με τα νεαρά κύτταρα. Αντίθετα, η CHIP λιγάζει βρέθηκε ότι δρα εξειδικευμένα στα γηρασμένα κύτταρα. Για το λόγο αυτό, διατυπώνεται η υπόθεση ότι η αποδόμηση της p53 που εξαρτάται από την CHIP θα μπορούσε να εμπλέκεται στη ρύθμιση της χρονικής μετάβασης του κυττάρου προς τη φάση γήρανσης. Άλλωστε, αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται επιπλέον από τον επιταχυνόμενο γηρασμένο φαινότυπο των CHIP<sup>-/-</sup> ποντικών [395], όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αλλά και άλλων ζωικών μοντέλων με μόνιμα ενεργοποιημένη πρωτεΐνη p53 [348, 349]. Συνεπώς, προτείνεται ότι η ρύθμιση της p53

πρωτεΐνης εξαρτάται από ξεχωριστές αλληλεπιδράσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά στάδια της ανάπτυξης των κυττάρων ή των οργανισμών, γεγονός σημαντικό για τη φυσιολογική γήρανση.

Είναι πλέον γνωστό ότι η πιθανότητα εμφάνισης όγκων αυξάνει σημαντικά με τη γήρανση [408]. Το p53 είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο στους ανθρώπινους καρκίνους [409]. Έχει αναφερθεί, ακόμα, ότι οι p53 μεταλλάξεις που ευθύνονται για τους μετασχηματισμούς, εμφανίζουν δομικές ανωμαλίες και σχετίζονται με τις μοριακές σαπερόνες Hsc70 και Hsp90 [410]. Οι περισσότερες από αυτές τις μεταλλαγές υιοθετούν μη σωστά διπλωμένες διαμορφώσεις, οι οποίες οδηγούνται προς συμπικτυλίωση και περαιτέρω πρωτεοσωμική αποδόμηση με τη μεσολάβηση της CHIP λιγάσης [300]. Αυτό είχε προηγουμένα προβλεφθεί από τη θεωρητική υπόθεση ότι η αποδόμηση των μεταλλαγμένων μορίων p53 δεν έχει καμία σχέση με τον αυτορυθμιζόμενο κύκλο αρνητικής ανάδρασης της Mdm2 λιγάσης [411]. Πράγματι, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτήν τη διατριβή συμφωνούν με αυτές τις αναφορές. Ειδικότερα, δείχτηκε ότι καθώς τα κύτταρα γερνάνε, επάγεται η ρύθμιση των επιπέδων της p53 που εξαρτάται από την CHIP, γεγονός που πιθανά οφείλεται στην παρουσία μεταλλαγμένων μορφών p53.

Έχει, επίσης, βρεθεί ότι η δραστηριότητα της Hsp90 είναι υπεύθυνη για την κατάλληλη και σωστή αναδίπλωση αυτών των μεταλλαγών. Συγκεκριμένα, όταν η ενεργότητα της Hsp90 είναι χαμηλή, τα μη σωστά διπλωμένα μεταλλαγμένα μόρια συνοδεύονται από την CHIP προς το πρωτεόσωμα για αποδόμηση [300]. Τα δεδομένα της παρούσας διατριβής, ενώ αποκαλύπτουν ότι η πρωτεϊνική έκφραση της Hsp90 και των άλλων συν-συνοδών μορίων μειώνεται, δε δείχνουν διαφορές στο πρότυπο της αλληλεπίδρασης μεταξύ της p53 και της Hsp90 καθώς τα κύτταρα γερνάνε. Αυτό το αποτέλεσμα σε συνδυασμό με τα ενισχυμένα επίπεδα και την αυξημένη ενεργότητα της CHIP λιγάσης, όπως βρέθηκαν εδώ, προτείνει μία κλίση της ισορροπίας προς την πρωτεοσωμική αποδόμηση παρά στη σταθεροποίηση των διάφορων μορφών της p53 πρωτεΐνης.

Για να διευκρινιστεί η επίδραση της p53 στη γήρανση των κυττάρων και των οργανισμών, έχουν διεξαχθεί πολυάριθμα *in vivo* πειράματα. Δυστυχώς, όμως, τα ποντίκια που δεν έχουν το p53 γονίδιο (p53 knock-out mice) εκδηλώνουν γενωμική αστάθεια, υποκύπτουν νωρίς σε νεοπλασίες και εμφανίζουν καρκίνο [347]. Αντίθετα, γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που υπερεκφράζουν την p53 πρωτεΐνη πεθαίνουν νωρίς κατά την εμβρυική ανάπτυξη, εξαιτίας της υπερβολικής απόπτωσης που παρατηρείται σε συγκεκριμένους ιστούς. Μία άλλη μελέτη αναφέρεται σε μία μεταλλαγμένη κυτταρική σειρά ποντικού που εκφράζει μία παραλλαγή της p53 πρωτεΐνης, συγκεκριμένα μία υποκατάσταση από αλανίνη σε βαλίνη στη θέση 135,

ευαίσθητη στη θερμοκρασία (temperature sensitive, ts). [348]. Αυτή η υποκατάσταση διευκολύνει τη μετατροπή της πρωτεΐνης από τη φυσικού τύπου διαμόρφωση (wt) (32°C) στη μεταλλαγμένη διαμόρφωση (37°C) και αντίστροφα, ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Έτσι, τα ποντίκια εμφάνισαν πρόωρη γήρανση στους ιστούς του ζώου που εκτίθονταν σε χαμηλή θερμοκρασία περιβάλλοντος (π.χ. δέρμα). Αυτό το απροσδόκητο αποτέλεσμα εξηγείται από το γεγονός ότι η p53 αποκτά τη μη φυσιολογική μεταλλαγμένη διαμόρφωση σε κεντρικές περιοχές του ζώου, ενώ υιοθετεί τη wt μορφή σε πιο κρύα μέρη, κοντά στην επιφάνεια του ζώου [348].

Πολλές άλλες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση μεταλλαγμένων αλληλομόρφων p53, προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος της p53 στο φαινόμενο της γήρανσης [349, 412]. Το γονίδιο p53 παρέχει προστασία έναντι του καρκίνου (και του θανάτου), διακόπτοντας το μη φυσιολογικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Όμως, αυτή η ικανότητα διακοπής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μπορεί να είναι καταστροφική όταν παρεμβαίνει στον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών κυττάρων, όπως είναι τα στελεχιαία κύτταρα, τα οποία απαιτούνται για την ανανέωση των ιστών καθώς ο οργανισμός γερνά. Το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν αυτές οι καταστροφικές συνέπειες του p53, που συμβαίνουν αργά στη ζωή ενός ατόμου, αποτελούν τα άτυχα παραπροϊόντα των εξελικτικών μηχανισμών καταστολής των όγκων, προκειμένου να διασφαλιστεί η επιβίωση των ειδών.

Υπάρχουν, πλέον, αρκετά δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι υψηλά επίπεδα της αγρίου-τύπου πρωτεΐνης p53 μπορούν, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, να προστατεύσουν τα ποντίκια έναντι του καρκίνου και της γήρανσης. Το γεγονός αυτό ενθαρρύνει το μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο αυξημένα επίπεδα p53 προστατεύουν τους οργανισμούς από νεοπλασίες και μετασχηματισμούς, χωρίς την ανεπιθύμητη εμφάνιση της πρόωμης γήρανσης [363]. Πρόσφατα, μία ομάδα Ισπανών επιστημόνων δημιούργησε ένα νέο διαγονιδιακό ποντίκι, το οποίο ονόμασαν «super p53» [363]. Το ποντίκι αυτό παράγει αγρίου-τύπου p53 από τα δύο φυσιολογικά αλληλόμορφα που υπάρχουν στο γονιδίωμα, παρόμοια με το κανονικό ποντίκι. Επιπλέον, όμως, περιέχει ένα ή δύο αντίγραφα ενός πρόσθετου γονιδίου p53, αγρίου-τύπου, που εισήχθη ως διαγονίδιο. Τα πρόσθετα αντίγραφα εκφράζονται από το φυσιολογικό υποκινητή έτσι, ώστε τόσο το διαγονίδιο όσο και το ενδογενές γονίδιο να ρυθμίζονται κατά τον ίδιο τρόπο. Τα «super p53» ποντίκια είναι πιο ευαίσθητα σε βλάβη του DNA, καθώς τα υψηλά επίπεδα p53 οδηγούν σε αυξημένο ρυθμό απόπτωσης. Αντίθετα, προστατεύονται πιο αποτελεσματικά από χημικά επαγόμενους καρκίνους. Το αξιοσημείωτο είναι ότι τα «super p53» ποντίκια δε φέρουν κανένα σημάδι επιταχυνόμενης γήρανσης, πιθανά διότι το διαγονιδιακό εκφραζόμενο p53 ρυθμίζεται από το φυσιολογικό υποκινητή και επομένως, η

ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 εκφράζεται όπως ακριβώς απαιτείται στο φυσιολογικό κυτταρικό περιβάλλον. Αυτή η πληροφορία ίσως αποτελεί την πρώτη ένδειξη για την ισχύ της ιδέας ότι η προστασία των κυττάρων έναντι των νεοπλασιών μπορεί να επιτευχθεί με την εισαγωγή των σωστών ογκοκατασταλτικών γονιδίων σε προγονικά ή στελεχειαία κύτταρα.

Το ερώτημα που προκύπτει είναι γιατί η αυξημένη ενεργότητα της p53 οδηγεί σε πρόωρη γήρανση και σε μειωμένη διάρκεια ζωής των θηλαστικών. Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι η ενισχυμένη ενεργότητα της p53 πρωτεΐνης επάγει απόπτωση και παύση του κυτταρικού κύκλου, διαδικασίες που εξαντλούν τις δυνάμεις των οργανισμών να αναγεννήσουν συγκεκριμένους ιστούς και όργανα.

Η μικρού μήκους ισομορφή της p53 (p44/ΔNp53) φαίνεται ότι επηρεάζει σημαντικά την εμφάνιση της γήρανσης και το μέγεθος του σώματος των θηλαστικών, καθώς αλλάζει την ικανότητα της κανονικού μεγέθους πρωτεΐνης p53 να λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας. Αυτό έχει αντίκτυπο στη σηματοδότηση από το μονοπάτι IGF (insulin-like growth factor), το οποίο διαφοροποιείται και προκαλεί την εμφάνιση πρώιμα γηρασμένου φαινοτύπου [349]. Διάφορες μελέτες εμπλέκουν το μονοπάτι insulin/IGF1 στη ρύθμιση της γήρανσης [364, 365]. Ποια είναι, όμως, η σχέση μεταξύ p53, p44/ΔNp53, insulin/IGF1 και γήρανσης; Πριν από δύο δεκαετίες, η μικρή ισομορφή p53 παρουσιαζόταν ως καταστολέας της αύξησης παρουσία της πλήρους μεγέθους ισομορφής [357, 366], ενώ απουσία του μακρύτερου ομόλογού της ως ογκογενετική [367]. Όταν η ισορροπία των δύο ισομορφών p53 διαταράσσεται από την υπερέκφραση της p44/ΔNp53, η καταστολή της αύξησης που μεσολαβείται από την κομμένη πρωτεΐνη οδηγεί σε μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού, μικρό μέγεθος σώματος, κυτταρική γήρανση, μη φυσιολογική σηματοδότηση IGF και τελικά, σε πρώιμη γήρανση του οργανισμού [349].

Επομένως, διαγονιδιακά ποντίκια που σταθερά υπερεκφράζουν την p44 εμφανίζουν μειωμένο προσδόκιμο ζωής, πρώιμη στειρότητα (ειδικά τα αρσενικά ποντίκια) και σημάδια πρώιμης γήρανσης, όπως λорδοκύφωση από τον πέμπτο κιόλας μήνα και αισθητά μειωμένη οστική πυκνότητα. Απουσία της p53, η υπερέκφραση της p44 δεν έχει καμία επίδραση στο μέγεθος των ζώων, δεικνύοντας ότι η πλήρους μεγέθους p53 απαιτείται για την καταστολή της αύξησης σε επίπεδο κυττάρου και οργανισμού [349]. Αξίζει ακόμα να αναφερθεί ότι το μονοπάτι της ινσουλίνης (insulin/IGF1) επηρεάζεται από την αύξηση της p44. Τα κύτταρα που προέρχονται από τα p44 διαγονιδιακά ποντίκια εκφράζουν υψηλά επίπεδα ορισμένων πρωτεϊνών, όπως ο υποδοχέας IGF1, η ενεργοποιημένη Akt, η φωσφορυλιωμένη p53 στη σερίνη 15, αλλά και οι δύο κύριοι μεταγραφικοί στόχοι της p53, Mdm2 και p21. Για όλα αυτά τα αποτελέσματα, απαιτείται η παρουσία της πλήρους μεγέθους πρωτεΐνης p53 [349].

Έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες στην προσπάθεια να εξηγηθεί γιατί όλα τα ζώα και τα φυτά γερνάνε με το χρόνο. Η γενετική θεωρία προτείνει ότι η διάρκεια ζωής ενός οργανισμού προγραμματίζεται μέσω ενός συνδυασμού διαφορετικών τύπων αλληλομόρφων πολλών γονιδίων [413]. Είναι πιθανόν ορισμένα ζώα, όπως τα σκουλήκια, οι μύγες και τα ποντίκια, να αυξάνουν το μέσο όρο της ζωής τους μέσω μεταλλάξεων που μειώνουν την ενεργότητα του μονοπατιού IGF [414]. Αυτές οι παρατηρήσεις συνδέουν τον καλά χαρακτηρισμένο ρόλο αυτού του δικτύου των γονιδίων (IGF-1, AKT και mTOR) με διαδικασίες, όπως η ενέργεια του μεταβολισμού και ο θερμοϊδικός περιορισμός, οι οποίες επίσης παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των ζώων [414, 415]. Παρόμοια, αυξημένα επίπεδα των ορθολόγων του γονιδίου sir-2 παρατείνουν τη μακροζωία και συνδέουν τις μεταβολικές διαδικασίες με το γενετικό έλεγχο του προτύπου έκφρασης των γονιδίων [415]. Εάν τα στελέχη αγρίου τύπου της *Drosophila* γεννιούνται αργότερα κατά τη διάρκεια ζωής, τότε αυτός ο πληθυσμός θα έχει αυξημένη διάρκεια ζωής [416]. Επομένως, η ηλικία της παραγωγής απογόνων μπορεί να ανατροφοδοτήσει και να επιλέξει πληθυσμούς με αλληλόμορφα που προσδίδουν αυξημένη διάρκεια ζωής.

Αντίστοιχα, ασθένειες, όπως οι όγκοι, ανακύπτουν στο τελευταίο τέταρτο της ζωής των περισσότερων οργανισμών, από τα ποντίκια μέχρι τον άνθρωπο [408]. Δεν είναι ξεκάθαρο εάν αυτές οι παρατηρήσεις είναι αποτέλεσμα διαφορετικού μεταβολικού ρυθμού σε αυτά τα ζώα ή συσσώρευσης μεταλλάξεων που εμφανίζονται σε ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια και οδηγούν τελικά στους καρκίνους. Μάλλον, οι διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA που έχουν αντίκτυπο στο ρυθμό των μεταλλάξεων, οι διαδικασίες απόπτωσης που εξαλείφουν τα κύτταρα με τις μεταλλάξεις και το ανοσοποιητικό σύστημα που πιθανά μειώνει ή εμποδίζει κάποιους όγκους, όλα περιορίζονται με τη γήρανση των οργανισμών [372, 417].

Μία από τις σημαντικότερες διαμάχες ενάντια στο γενετικό καθορισμό της διάρκειας ζωής ενός οργανισμού είναι το γεγονός ότι η εξελικτική επιλογή παύει να δρα μετά την παραγωγή απογόνων. Αυτό καθιστά τον οργανισμό πιο ευάλωτο και περισσότερο ευαίσθητο σε ασθένειες. Έτσι, σε αυτήν τη θεωρία, οι στοχαστικές διαδικασίες καθορίζουν τη διάρκεια ζωής. Κάθε είδος έχει μία παρόμοια λειτουργία που εκφράζεται ως μία καμπύλη για τη διάρκεια ζωής του πληθυσμού, με μόνη διαφορά το μέσο όρο της ηλικίας του θανάτου που εξαρτάται από το κάθε είδος. Σε αυτήν την περίπτωση, η στρατηγική που χρησιμοποιείται από τα σπονδυλωτά για να ζήσουν περισσότερο είναι ότι τα ενήλικα άτομα διατηρούν την ικανότητα να αναγεννούν τους διάφορους ιστούς μέσω ενός συνόλου στελεχιαίων κυττάρων. Μόνο όταν ο πληθυσμός αυτών των κυττάρων μειωθεί, αρχίζει ο οργανισμός να γερνά.

Ποντίκια που εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα από την αγρίου τύπου p53 πρωτεΐνη είναι πιο ανθεκτικά στους καρκίνους, αλλά πεθαίνουν σε νεαρή ηλικία, εξαιτίας του υψηλού βαθμού απόπτωσης σε αυτά τα κύτταρα [348, 405]. Ποντίκια με πολύ χαμηλή έκφραση της p53 πρωτεΐνης πεθαίνουν από καρκίνους σε νεαρή ηλικία, λόγω αποτυχίας να εξαλείψουν τα στελεχιαία κύτταρα που περιέχουν μεταλλάξεις [49].

Ο καρκίνος θεωρείται ως μία ασθένεια των ηλικιωμένων καθώς απαιτείται χρόνος για να συσσωρευτεί μία σειρά από μεταλλάξεις σε ένα μόνο κύτταρο του σώματος, που μπορεί έπειτα να αναπτύξει έναν όγκο. Η αποτελεσματικότητα του p53 μονοπατιού μειώνεται με την ηλικία. Αυτό το μονοπάτι διασφαλίζει την πιστότητα των συμβάντων κατά την κυτταρική διαίρεση και τις αποκρίσεις σε διάφορα είδη στρες, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις και βλάβες στην κυτταρική διαίρεση [409]. Έχει βρεθεί ότι έπειτα από βλάβη στο DNA από υπεριώδη ακτινοβολία (IR), η ATM κινάση ανιχνεύει τα σπασίματα στο DNA μέσω φωσφορυλίωσης στην p53 και την Mdm2, προκαλώντας χαμηλή δραστηριότητα Mdm2 και αυξημένα επίπεδα και ενεργότητα p53. Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη p53 μεταγράφει μία σειρά γονιδίων που οδηγούν σε παύση του κυτταρικού κύκλου, σε γήρανση ή απόπτωση [418, 419]. Κάποιοι τύποι βλάβης του DNA δεν ανιχνεύονται αποτελεσματικά στα γηρασμένα ποντίκια, εξαιτίας χαμηλής ενεργότητας της ATM κινάσης που δίνει λιγότερη φωσφορυλίωση p53 Ser-15 [420]. Έτσι προκύπτει ένας μηχανισμός για τη μειωμένη απόπτωση στα κύτταρα των γηρασμένων ατόμων [421], ένα γενικό φαινόμενο που παρατηρείται σε μία ποικιλία ιστών από διάφορα στελέχη ποντικών και έπειτα από διάφορα σήματα στρες που αποτυγχάνουν να ενεργοποιήσουν την p53 ισχυρά.

Γενικά, παρατηρείται ένας φυλετικός διμορφισμός αναφορικά με τη λειτουργία της p53 πρωτεΐνης, η οποία μειώνεται καθώς τα άτομα γερνάνε. Αυτός ο φυλετικός διμορφισμός πιθανά οφείλεται σε ορμονική ρύθμιση. Στα ποντίκια, τα αρσενικά άτομα ζουν περισσότερο από τα θηλυκά και η μείωση στη λειτουργία της p53 συμβαίνει αργότερα στα αρσενικά παρά στα θηλυκά. Στους ανθρώπους, οι γυναίκες ζουν περισσότερο και αναπτύσσουν καρκίνους σε μεγαλύτερη ηλικία από τους άντρες, δείχνοντας ότι υπάρχει μία αναλογία ως προς το χρόνο εμφάνισης του καρκίνου και της γήρανσης. Συνεπώς, η μειωμένη λειτουργία της p53 κατά τη γήρανση, σε συνδυασμό με τη συσσώρευση μεταλλάξεων σε μεγάλη ηλικία, θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί τα ηλικιωμένα άτομα έχουν χαμηλότερο βαθμό αξιοπιστίας της κυτταρικής διαίρεσης, υψηλότερο ρυθμό λαθών και βλαβών και υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων και όγκων.



Επομένως, είναι γενικά αποδεκτό ότι η p53 ευθύνεται για την επαγωγή και τη διατήρηση του γηρασμένου φαινοτύπου [368], αλλά σε περίπτωση απώλειας της p53 μόνο τα υψηλά επίπεδα του αναστολέα p16<sup>Ink4a</sup> είναι ικανά να κάνουν τη διαδικασία μη αντιστρεπτή. Εάν τα επίπεδα της p16 δεν είναι ικανοποιητικά υψηλά, ο γηρασμένος φαινότυπος πιθανά μπορεί να αντιστραφεί [369]. Επιπρόσθετα, η αυξημένη έκφραση της p16 έχει περιγραφεί ως δείκτης γήρανσης σε συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές ποντικών [370]. Σε μία σειρά πρόσφατων μελετών έχει δειχθεί το αντίκτυπο της p16 στα αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα [371], στα παγκρεατικά κύτταρα [372] και στα εγκεφαλικά κύτταρα [373]. Είναι προφανές ότι οι ογκοκατασταλτικές ιδιότητες της p53 εν μέρει εκτελούνται μέσω της επαγωγής της κυτταρικής γήρανσης και κατ' επέκταση της γήρανσης των οργανισμών [374, 375]. Παρόλ' αυτά, ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου η p53 και τα άλλα μέλη της οικογένειας επηρεάζουν τη γήρανση και τη μακροβιότητα βρίσκεται υπό συνεχή συζήτηση [376-379].

Η γήρανση, παρά το γεγονός ότι θεωρείται ως η έσχατη έκβαση της ελάττωσης του μήκους των τελομερών, είναι πλέον φανερό ότι πρόκειται για ένα πολύπλοκο πρόγραμμα με πολλαπλές καταλήξεις. Σε αυτές συμπεριλαμβάνεται, εκτός από την παύση του κυτταρικού κύκλου, η μεγέθυνση των κυττάρων, ο εκτεταμένος σχηματισμός χυμοτοπίων, η καταστολή και η ενεργοποίηση συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων, η έκκριση διάφορων μορίων σηματοδότησης, η αναστολή της απόκρισης των πρωτεϊνών θερμικού σοκ και άλλες τροποποιήσεις. Το σύνολο των παρατηρήσεων σε αυτήν τη διατριβή καταδεικνύει τη συσχέτιση ανάμεσα στο σύστημα πρωτεϊνικής αποδόμησης και στο σύστημα ελέγχου της ποιότητας των κυτταρικών πρωτεϊνών, που περιλαμβάνει κυρίως τις αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεϊνικές σαπερόνες. Συνεπώς, το πολυδιάστατο δίκτυο των αντιδράσεων που εξαρτάται από την p53 πρωτεΐνη φαίνεται πως διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στην καθιέρωση της κυτταρικής γήρανσης.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Holliday, R. (1995) *Understanding ageing*, Cambridge University Press. Cambridge.
- [2] Troen, B.R. (2003). The biology of aging. *Mt Sinai J Med* 70, 3-22.
- [3] Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37, 614-36.
- [4] Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- [5] Jazwinski, S.M. (2001). New clues to old yeast. *Mech Ageing Dev* 122, 865-82.
- [6] Martin, G.M., Austad, S.N. and Johnson, T.E. (1996). Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nat Genet* 13, 25-34.
- [7] Gonos, E.S. (2000). Genetics of aging: lessons from centenarians. *Exp Gerontol* 35, 15-21.
- [8] Martin, G.M. and Oshima, J. (2000). Lessons from human progeroid syndromes. *Nature* 408, 263-6.
- [9] Gray, M.D., Shen, J.C., Kamath-Loeb, A.S., Blank, A., Sopher, B.L., Martin, G.M., Oshima, J. and Loeb, L.A. (1997). The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat Genet* 17, 100-3.
- [10] Schriener, S.E. et al. (2000). Levels of DNA damage are unaltered in mice overexpressing human catalase in nuclei. *Free Radic Biol Med* 29, 664-73.
- [11] Salk, D., Bryant, E., Au, K., Hoehn, H. and Martin, G.M. (1981). Systematic growth studies, cocultivation, and cell hybridization studies of Werner syndrome cultured skin fibroblasts. *Hum Genet* 58, 310-6.
- [12] Eriksson, M. et al. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293-8.
- [13] Campisi, J. (2001). From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp Gerontol* 36, 607-18.
- [14] Kipling, D. (2001). Telomeres, replicative senescence and human ageing. *Maturitas* 38, 25-37; discussion 37-8.
- [15] Smith, J.R. and Pereira-Smith, O.M. (1996). Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science* 273, 63-7.
- [16] Cristofalo, V.J. and Pignolo, R.J. (1993). Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol Rev* 73, 617-38.

- [17] Cristofalo, V.J., Volker, C., Francis, M.K. and Tresini, M. (1998). Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8, 43-80.
- [18] Dimri, G.P. et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9363-7.
- [19] Campisi, J. (1996). Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell* 84, 497-500.
- [20] Donato, H., Jr., Hoselton, M.A. and Sohal, R.S. (1979). Lipofuscin accumulation: effects of individual variation and selective mortality on population averages. *Exp Gerontol* 14, 141-7.
- [21] Brunk, U.T. and Terman, A. (2002). Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med* 33, 611-9.
- [22] Matsumura, T., Pfendt, E.A. and Hayflick, L. (1979). DNA synthesis in the human diploid cell strain WI-38 during in vitro aging: an autoradiography study. *J Gerontol* 34, 323-7.
- [23] Fargnoli, J., Kunisada, T., Fornace, A.J., Jr., Schneider, E.L. and Holbrook, N.J. (1990). Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and protein after heat treatment in cells of aged rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 846-50.
- [24] Bonelli, M.A., Alfieri, R.R., Petronini, P.G., Brigotti, M., Campanini, C. and Borghetti, A.F. (1999). Attenuated expression of 70-kDa heat shock protein in WI-38 human fibroblasts during aging in vitro. *Exp Cell Res* 252, 20-32.
- [25] Liu, V.W., Zhang, C. and Nagley, P. (1998). Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucleic Acids Res* 26, 1268-75.
- [26] Matsumura, T. (1980). Multinucleation and polyploidization of aging human cells in culture. *Adv Exp Med Biol* 129, 31-8.
- [27] Chen, Q.M., Prowse, K.R., Tu, V.C., Purdom, S. and Linskens, M.H. (2001). Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res* 265, 294-303.
- [28] Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- [29] Tresini, M., Mawal-Dewan, M., Cristofalo, V.J. and Sell, C. (1998). A phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor induces a senescent-like growth arrest in human diploid fibroblasts. *Cancer Res* 58, 1-4.

- [30] Chondrogianni, N. and Gonos, E.S. (2004). Proteasome inhibition induces a senescence-like phenotype in primary human fibroblasts cultures. *Biogerontology* 5, 55-61.
- [31] Serrano, M. and Blasco, M.A. (2001). Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 13, 748-53.
- [32] Sherr, C.J. and DePinho, R.A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102, 407-10.
- [33] Dumont, P. et al. (2000). Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med* 28, 361-73.
- [34] Lane, D.P. and Crawford, L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-3.
- [35] Linzer, D.I. and Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.
- [36] Oren, M. and Levine, A.J. (1983). Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 56-9.
- [37] Zakut-Houri, R., Oren, M., Bienz, B., Lavie, V., Hazum, S. and Givol, D. (1983). A single gene and a pseudogene for the cellular tumour antigen p53. *Nature* 306, 594-7.
- [38] Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D. and Oren, M. (1984). Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312, 646-9.
- [39] Parada, L.F., Land, H., Weinberg, R.A., Wolf, D. and Rotter, V. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312, 649-51.
- [40] Jenkins, J.R., Rudge, K. and Currie, G.A. (1984). Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 312, 651-4.
- [41] Eliyahu, D., Michalovitz, D. and Oren, M. (1985). Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature* 316, 158-60.
- [42] Wolf, D., Harris, N. and Rotter, V. (1984). Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* 38, 119-26.
- [43] Malkin, D. et al. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250, 1233-8.

- [44] Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O. and Oren, M. (1989). Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8763-7.
- [45] Finlay, C.A., Hinds, P.W., Tan, T.H., Eliyahu, D., Oren, M. and Levine, A.J. (1988). Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 8, 531-9.
- [46] Hinds, P., Finlay, C. and Levine, A.J. (1989). Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* 63, 739-46.
- [47] Finlay, C.A., Hinds, P.W. and Levine, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083-93.
- [48] Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-10.
- [49] Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S. and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-21.
- [50] Jacks, T., Remington, L., Williams, B.O., Schmitt, E.M., Halachmi, S., Bronson, R.T. and Weinberg, R.A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4, 1-7.
- [51] Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
- [52] Vousden, K.H. and Lane, D.P. (2007). p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 275-83.
- [53] Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E. and Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126, 107-20.
- [54] Bensaad, K. and Vousden, K.H. (2007). p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol* 17, 286-91.
- [55] Crighton, D. et al. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126, 121-34.
- [56] Murray-Zmijewski, F., Slee, E.A. and Lu, X. (2008). A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 702-12.
- [57] Gu, W., Shi, X.L. and Roeder, R.G. (1997). Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* 387, 819-23.

- [58] Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R. and Tjian, R. (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 267, 100-4.
- [59] Farmer, G., Colgan, J., Nakatani, Y., Manley, J.L. and Prives, C. (1996). Functional interaction between p53, the TATA-binding protein (TBP), and TBP-associated factors in vivo. *Mol Cell Biol* 16, 4295-304.
- [60] Gu, W. and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.
- [61] el-Deiry, W.S. et al. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54, 1169-74.
- [62] Moll, U.M., Wolff, S., Speidel, D. and Deppert, W. (2005). Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 17, 631-6.
- [63] Chang, T.C. et al. (2007). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 26, 745-52.
- [64] He, L. et al. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-4.
- [65] Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. and Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *Embo J* 12, 461-8.
- [66] Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. and Levine, A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7, 1126-32.
- [67] Brooks, C.L. and Gu, W. (2006). p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* 21, 307-15.
- [68] Ceribelli, M., Alcalay, M., Vigano, M.A. and Mantovani, R. (2006). Repression of new p53 targets revealed by ChIP on chip experiments. *Cell Cycle* 5, 1102-10.
- [69] Budhram-Mahadeo, V., Morris, P.J., Smith, M.D., Midgley, C.A., Boxer, L.M. and Latchman, D.S. (1999). p53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor. *J Biol Chem* 274, 15237-44.
- [70] Innocente, S.A. and Lee, J.M. (2005). p53 is a NF-Y- and p21-independent, Sp1-dependent repressor of cyclin B1 transcription. *FEBS Lett* 579, 1001-7.
- [71] Kanaya, T., Kyo, S., Hamada, K., Takakura, M., Kitagawa, Y., Harada, H. and Inoue, M. (2000). Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res* 6, 1239-47.

- [72] Murphy, M., Ahn, J., Walker, K.K., Hoffman, W.H., Evans, R.M., Levine, A.J. and George, D.L. (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* 13, 2490-501.
- [73] Godar, S. et al. (2008). Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell* 134, 62-73.
- [74] D'Orazi, G. et al. (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 4, 11-9.
- [75] Hofmann, T.G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H. and Schmitz, M.L. (2002). Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol* 4, 1-10.
- [76] Taira, N., Nihira, K., Yamaguchi, T., Miki, Y. and Yoshida, K. (2007). DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell* 25, 725-38.
- [77] Sykes, S.M., Mellert, H.S., Holbert, M.A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W.S. and McMahon, S.B. (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* 24, 841-51.
- [78] Tang, Y., Luo, J., Zhang, W. and Gu, W. (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* 24, 827-39.
- [79] Le Cam, L. et al. (2006). E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation. *Cell* 127, 775-88.
- [80] Flores, E.R., Tsai, K.Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F. and Jacks, T. (2002). p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 416, 560-4.
- [81] Horn, H.F. and Vousden, K.H. (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* 26, 1306-16.
- [82] Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M. and Halazonetis, T.D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev* 14, 278-88.
- [83] Hirao, A. et al. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287, 1824-7.
- [84] Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 14, 289-300.

- [85] Palmero, I., Pantoja, C. and Serrano, M. (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 395, 125-6.
- [86] de Stanchina, E. et al. (1998). E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 12, 2434-42.
- [87] Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J. and Roussel, M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12, 2424-33.
- [88] Honda, R. and Yasuda, H. (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo J* 18, 22-7.
- [89] Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F. and Sherr, C.J. (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8292-7.
- [90] Lohrum, M.A., Ashcroft, M., Kubbutat, M.H. and Vousden, K.H. (2000). Contribution of two independent MDM2-binding domains in p14(ARF) to p53 stabilization. *Curr Biol* 10, 539-42.
- [91] Pomerantz, J. et al. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713-23.
- [92] Kamijo, T., Bodner, S., van de Kamp, E., Randle, D.H. and Sherr, C.J. (1999). Tumor spectrum in ARF-deficient mice. *Cancer Res* 59, 2217-22.
- [93] Kamijo, T., van de Kamp, E., Chong, M.J., Zindy, F., Diehl, J.A., Sherr, C.J. and McKinnon, P.J. (1999). Loss of the ARF tumor suppressor reverses premature replicative arrest but not radiation hypersensitivity arising from disabled atm function. *Cancer Res* 59, 2464-9.
- [94] Bartkova, J. et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434, 864-70.
- [95] Gorgoulis, V.G. et al. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434, 907-13.
- [96] Christophorou, M.A., Ringshausen, I., Finch, A.J., Swigart, L.B. and Evan, G.I. (2006). The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature* 443, 214-7.
- [97] Efeyan, A., Garcia-Cao, I., Herranz, D., Velasco-Miguel, S. and Serrano, M. (2006). Tumour biology: Policing of oncogene activity by p53. *Nature* 443, 159.



- [98] Lohrum, M.A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M. and Vousden, K.H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 3, 577-87.
- [99] Zhang, Y., Wolf, G.W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhart, W.A. and Xiong, Y. (2003). Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* 23, 8902-12.
- [100] Dai, M.S., Zeng, S.X., Jin, Y., Sun, X.X., David, L. and Lu, H. (2004). Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* 24, 7654-68.
- [101] Horn, H.F. and Vousden, K.H. (2008). Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene* 27, 5774-84.
- [102] Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J. and Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 18, 283-93.
- [103] Hammond, E.M. and Giaccia, A.J. (2005). The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 718-25.
- [104] Reisman, D., Greenberg, M. and Rotter, V. (1988). Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5146-50.
- [105] Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265, 346-55.
- [106] Jeffrey, P.D., Gorina, S. and Pavletich, N.P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267, 1498-502.
- [107] Bourdon, J.C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K. and Lane, D.P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 19, 2122-37.
- [108] Nikoshkov, A. and Hurd, Y.L. (2006). p53 splice variants generated by atypical mRNA processing confer complexity of p53 transcripts in the human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 383-6.
- [109] Santibanez-Koref, M.F. et al. (1991). p53 germline mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Lancet* 338, 1490-1.

- [110] Olivier, M., Goldgar, D.E., Sodha, N., Ohgaki, H., Kleihues, P., Hainaut, P. and Eeles, R.A. (2003). Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 63, 6643-50.
- [111] Lee, S.B. et al. (2001). Destabilization of CHK2 by a missense mutation associated with Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer Res* 61, 8062-7.
- [112] Vahteristo, P. et al. (2001). p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. *Cancer Res* 61, 5718-22.
- [113] Varley, J.M. (2003). Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 21, 313-20.
- [114] Hochstrasser, M. (2006). Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly. *Cell* 124, 27-34.
- [115] Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A. and Ciechanover, A. (1998). A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *Embo J* 17, 5964-73.
- [116] Ciechanover, A. (2005). N-terminal ubiquitination. *Methods Mol Biol* 301, 255-70.
- [117] Handley-Gearhart, P.M., Stephen, A.G., Trausch-Azar, J.S., Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. (1994). Human ubiquitin-activating enzyme, E1. Indication of potential nuclear and cytoplasmic subpopulations using epitope-tagged cDNA constructs. *J Biol Chem* 269, 33171-8.
- [118] Sommer, T. and Jentsch, S. (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* 365, 176-9.
- [119] Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (2000). Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* 102, 533-9.
- [120] Huang, L., Kinnucan, E., Wang, G., Beaudenon, S., Howley, P.M., Huibregtse, J.M. and Pavletich, N.P. (1999). Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science* 286, 1321-6.
- [121] Nuber, U. and Scheffner, M. (1999). Identification of determinants in E2 ubiquitin-conjugating enzymes required for hect E3 ubiquitin-protein ligase interaction. *J Biol Chem* 274, 7576-82.
- [122] Saville, M.K., Sparks, A., Xirodimas, D.P., Wardrop, J., Stevenson, L.F., Bourdon, J.C., Woods, Y.L. and Lane, D.P. (2004). Regulation of p53 by the ubiquitin-conjugating enzymes UbcH5B/C in vivo. *J Biol Chem* 279, 42169-81.

- [123] Rajendra, R. et al. (2004). Topors functions as an E3 ubiquitin ligase with specific E2 enzymes and ubiquitinates p53. *J Biol Chem* 279, 36440-4.
- [124] Laine, A., Topisirovic, I., Zhai, D., Reed, J.C., Borden, K.L. and Ronai, Z. (2006). Regulation of p53 localization and activity by Ubc13. *Mol Cell Biol* 26, 8901-13.
- [125] Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. and Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
- [126] Joazeiro, C.A. and Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-52.
- [127] Petroski, M.D. and Deshaies, R.J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 9-20.
- [128] Coscoy, L. and Ganem, D. (2003). PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruses make the connection. *Trends Cell Biol* 13, 7-12.
- [129] Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U. and Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, 635-44.
- [130] Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* 3, 93-6.
- [131] Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M. and Cyr, D.M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* 3, 100-5.
- [132] Cyr, D.M., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2002). Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci* 27, 368-75.
- [133] Imai, Y., Soda, M., Hatakeyama, S., Akagi, T., Hashikawa, T., Nakayama, K.I. and Takahashi, R. (2002). CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 10, 55-67.
- [134] Shih, S.C., Sloper-Mould, K.E. and Hicke, L. (2000). Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *Embo J* 19, 187-98.
- [135] Hoeller, D. et al. (2006). Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nat Cell Biol* 8, 163-9.
- [136] Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.

- [137] Kim, H.T., Kim, K.P., Lledias, F., Kisselev, A.F., Scaglione, K.M., Skowyra, D., Gygi, S.P. and Goldberg, A.L. (2007). Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem* 282, 17375-86.
- [138] Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* 19, 94-102.
- [139] Deng, L. et al. (2000). Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103, 351-61.
- [140] Morris, J.R. and Solomon, E. (2004). BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet* 13, 807-17.
- [141] Wilkinson, K.D. (2000). Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 11, 141-8.
- [142] Yao, T. et al. (2006). Proteasome recruitment and activation of the Uch37 deubiquitinating enzyme by Adrm1. *Nat Cell Biol* 8, 994-1002.
- [143] Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V. and Deshaies, R.J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611-5.
- [144] Cummins, J.M. and Vogelstein, B. (2004). HAUSP is required for p53 destabilization. *Cell Cycle* 3, 689-92.
- [145] Kovalenko, A., Chable-Bessia, C., Cantarella, G., Israel, A., Wallach, D. and Courtois, G. (2003). The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 424, 801-5.
- [146] Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tschirzitis, T., Farmer, H., Ashworth, A. and Mosialos, G. (2003). CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* 424, 793-6.
- [147] Kerscher, O., Felberbaum, R. and Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 159-80.
- [148] Hoeller, D., Hecker, C.M. and Dikic, I. (2006). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 6, 776-88.
- [149] Xirodimas, D.P., Saville, M.K., Bourdon, J.C., Hay, R.T. and Lane, D.P. (2004). Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* 118, 83-97.

- [150] Kawakami, T. et al. (2001). NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase. *Embo J* 20, 4003-12.
- [151] Osaka, F., Kawasaki, H., Aida, N., Saeki, M., Chiba, T., Kawashima, S., Tanaka, K. and Kato, S. (1998). A new NEDD8-ligating system for cullin-4A. *Genes Dev* 12, 2263-8.
- [152] Ritchie, K.J. and Zhang, D.E. (2004). ISG15: the immunological kin of ubiquitin. *Semin Cell Dev Biol* 15, 237-46.
- [153] Glickman, M.H. and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.
- [154] Hanna, J. and Finley, D. (2007). A proteasome for all occasions. *FEBS Lett* 581, 2854-61.
- [155] Puhler, G., Weinkauff, S., Bachmann, L., Muller, S., Engel, A., Hegerl, R. and Baumeister, W. (1992). Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *Embo J* 11, 1607-16.
- [156] Dahlmann, B., Kopp, F., Kuehn, L., Niedel, B., Pfeifer, G., Hegerl, R. and Baumeister, W. (1989). The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from eukaryotes to archaeobacteria. *FEBS Lett* 251, 125-31.
- [157] Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C. and Wolf, D.H. (1991). Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *Embo J* 10, 555-62.
- [158] Jager, S., Groll, M., Huber, R., Wolf, D.H. and Heinemeyer, W. (1999). Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol* 291, 997-1013.
- [159] Kruger, E., Kloetzel, P.M. and Enenkel, C. (2001). 20S proteasome biogenesis. *Biochimie* 83, 289-93.
- [160] Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A. and Kloetzel, P.M. (1994). 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes. *J Mol Biol* 236, 975-81.
- [161] Baumeister, W., Dahlmann, B., Hegerl, R., Kopp, F., Kuehn, L. and Pfeifer, G. (1988). Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett* 241, 239-45.

- [162] Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D.B. and Monaco, J.J. (1997). Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor beta subunits. *Embo J* 16, 5363-75.
- [163] Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. and Wolf, D.H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* 272, 25200-9.
- [164] Schmidtke, G., Schmidt, M. and Kloetzel, P.M. (1997). Maturation of mammalian 20 S proteasome: purification and characterization of 13 S and 16 S proteasome precursor complexes. *J Mol Biol* 268, 95-106.
- [165] Ramos, P.C., Hockendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A. and Dohmen, R.J. (1998). Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell* 92, 489-99.
- [166] Witt, E., Zantopf, D., Schmidt, M., Kraft, R., Kloetzel, P.M. and Kruger, E. (2000). Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J Mol Biol* 301, 1-9.
- [167] Rivett, A.J. and Hearn, A.R. (2004). Proteasome function in antigen presentation: immunoproteasome complexes, Peptide production, and interactions with viral proteins. *Curr Protein Pept Sci* 5, 153-61.
- [168] Hisamatsu, H. et al. (1996). Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *J Exp Med* 183, 1807-16.
- [169] Aki, M. et al. (1994). Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem* 115, 257-69.
- [170] Gaczynska, M., Rock, K.L. and Goldberg, A.L. (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 365, 264-7.
- [171] Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-79.
- [172] Ferrell, K., Wilkinson, C.R., Dubiel, W. and Gordon, C. (2000). Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci* 25, 83-8.
- [173] Elsasser, S. et al. (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* 4, 725-30.
- [174] Raasi, S., Orlov, I., Fleming, K.G. and Pickart, C.M. (2004). Binding of polyubiquitin chains to ubiquitin-associated (UBA) domains of HHR23A. *J Mol Biol* 341, 1367-79.

- [175] Chen, X., Chi, Y., Bloecher, A., Aebersold, R., Clurman, B.E. and Roberts, J.M. (2004). N-acetylation and ubiquitin-independent proteasomal degradation of p21(Cip1). *Mol Cell* 16, 839-47.
- [176] Asher, G., Lotem, J., Sachs, L., Kahana, C. and Shaul, Y. (2002). Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13125-30.
- [177] Sdek, P., Ying, H., Chang, D.L., Qiu, W., Zheng, H., Touitou, R., Allday, M.J. and Xiao, Z.X. (2005). MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein. *Mol Cell* 20, 699-708.
- [178] Rechsteiner, M., Realini, C. and Ustrell, V. (2000). The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* 345 Pt 1, 1-15.
- [179] Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K.B. and Tanaka, K. (2000). Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 275, 14336-45.
- [180] Orłowski, M. (1993). The multicatalytic proteinase complex (proteasome) and intracellular protein degradation: diverse functions of an intracellular particle. *J Lab Clin Med* 121, 187-9.
- [181] Akopian, T.N., Kisselev, A.F. and Goldberg, A.L. (1997). Processive degradation of proteins and other catalytic properties of the proteasome from *Thermoplasma acidophilum*. *J Biol Chem* 272, 1791-8.
- [182] Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R. and Baumeister, W. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* 268, 579-82.
- [183] Zwickl, P., Klein, J. and Baumeister, W. (1994). Critical elements in proteasome assembly. *Nat Struct Biol* 1, 765-70.
- [184] Chu-Ping, M., Vu, J.H., Proske, R.J., Slaughter, C.A. and DeMartino, G.N. (1994). Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. *J Biol Chem* 269, 3539-47.
- [185] Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K. and Rechsteiner, M. (1992). Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 267, 22369-77.
- [186] Ullrich, O., Reinheckel, T., Sitte, N., Hass, R., Grune, T. and Davies, K.J. (1999). Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6223-8.

- [187] Gaczynska, M., Goldberg, A.L., Tanaka, K., Hendil, K.B. and Rock, K.L. (1996). Proteasome subunits X and Y alter peptidase activities in opposite ways to the interferon-gamma-induced subunits LMP2 and LMP7. *J Biol Chem* 271, 17275-80.
- [188] Gaczynska, M., Rock, K.L., Spies, T. and Goldberg, A.L. (1994). Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9213-7.
- [189] Tsubuki, S., Saito, Y. and Kawashima, S. (1994). Purification and characterization of an endogenous inhibitor specific to the Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading activity in proteasome and its identification as heat-shock protein 90. *FEBS Lett* 344, 229-33.
- [190] Szweda, P.A., Camouse, M., Lundberg, K.C., Oberley, T.D. and Szweda, L.I. (2003). Aging, lipofuscin formation, and free radical-mediated inhibition of cellular proteolytic systems. *Ageing Res Rev* 2, 383-405.
- [191] Okada, K., Wangpoengtrakul, C., Osawa, T., Toyokuni, S., Tanaka, K. and Uchida, K. (1999). 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. Identification of proteasomes as target molecules. *J Biol Chem* 274, 23787-93.
- [192] Tsubuki, S., Saito, Y., Tomioka, M., Ito, H. and Kawashima, S. (1996). Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem* 119, 572-6.
- [193] Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. and Levine, A.J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-45.
- [194] Kubbutat, M.H., Jones, S.N. and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
- [195] Cahilly-Snyder, L., Yang-Feng, T., Francke, U. and George, D.L. (1987). Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet* 13, 235-44.
- [196] Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S. and Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378, 203-6.
- [197] Itahana, K. et al. (2007). Targeted inactivation of Mdm2 RING finger E3 ubiquitin ligase activity in the mouse reveals mechanistic insights into p53 regulation. *Cancer Cell* 12, 355-66.
- [198] Freedman, D.A., Wu, L. and Levine, A.J. (1999). Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* 55, 96-107.



- [199] Michael, D. and Oren, M. (2003). The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* 13, 49-58.
- [200] Honda, R., Tanaka, H. and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420, 25-7.
- [201] Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-9.
- [202] Momand, J., Wu, H.H. and Dasgupta, G. (2000). MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242, 15-29.
- [203] Oliner, J.D., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* 362, 857-60.
- [204] Iwakuma, T. and Lozano, G. (2003). MDM2, an introduction. *Mol Cancer Res* 1, 993-1000.
- [205] Chen, J., Marechal, V. and Levine, A.J. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* 13, 4107-14.
- [206] Olson, D.C., Marechal, V., Momand, J., Chen, J., Romocki, C. and Levine, A.J. (1993). Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes. *Oncogene* 8, 2353-60.
- [207] Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J. and Pavletich, N.P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 274, 948-53.
- [208] Kulikov, R., Winter, M. and Blattner, C. (2006). Binding of p53 to the central domain of Mdm2 is regulated by phosphorylation. *J Biol Chem* 281, 28575-83.
- [209] Lindstrom, M.S., Jin, A., Deisenroth, C., White Wolf, G. and Zhang, Y. (2007). Cancer-associated mutations in the MDM2 zinc finger domain disrupt ribosomal protein interaction and attenuate MDM2-induced p53 degradation. *Mol Cell Biol* 27, 1056-68.
- [210] Poyurovsky, M.V., Jacq, X., Ma, C., Karni-Schmidt, O., Parker, P.J., Chalfie, M., Manley, J.L. and Prives, C. (2003). Nucleotide binding by the Mdm2 RING domain facilitates Arf-independent Mdm2 nucleolar localization. *Mol Cell* 12, 875-87.
- [211] Freedman, D.A., Epstein, C.B., Roth, J.C. and Levine, A.J. (1997). A genetic approach to mapping the p53 binding site in the MDM2 protein. *Mol Med* 3, 248-59.
- [212] Bottger, A. et al. (1997). Molecular characterization of the hdm2-p53 interaction. *J Mol Biol* 269, 744-56.

- [213] Kubbutat, M.H., Ludwig, R.L., Ashcroft, M. and Vousden, K.H. (1998). Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. *Mol Cell Biol* 18, 5690-8.
- [214] Wallace, M., Worrall, E., Pettersson, S., Hupp, T.R. and Ball, K.L. (2006). Dual-site regulation of MDM2 E3-ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 23, 251-63.
- [215] Yu, G.W., Rudiger, S., Veprintsev, D., Freund, S., Fernandez-Fernandez, M.R. and Fersht, A.R. (2006). The central region of HDM2 provides a second binding site for p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1227-32.
- [216] Lane, D.P. (1999). Exploiting the p53 pathway for cancer diagnosis and therapy. *Br J Cancer* 80 Suppl 1, 1-5.
- [217] Chene, P. (2003). Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 102-9.
- [218] Bottger, A., Bottger, V., Sparks, A., Liu, W.L., Howard, S.F. and Lane, D.P. (1997). Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo. *Curr Biol* 7, 860-9.
- [219] Garcia-Echeverria, C., Chene, P., Blommers, M.J. and Furet, P. (2000). Discovery of potent antagonists of the interaction between human double minute 2 and tumor suppressor p53. *J Med Chem* 43, 3205-8.
- [220] Stoll, R. et al. (2001). Chalcone derivatives antagonize interactions between the human oncoprotein MDM2 and p53. *Biochemistry* 40, 336-44.
- [221] Kumar, S.K., Hager, E., Pettit, C., Gurulingappa, H., Davidson, N.E. and Khan, S.R. (2003). Design, synthesis, and evaluation of novel boronic-chalcone derivatives as antitumor agents. *J Med Chem* 46, 2813-5.
- [222] Duncan, S.J., Cooper, M.A. and Williams, D.H. (2003). Binding of an inhibitor of the p53/MDM2 interaction to MDM2. *Chem Commun (Camb)*, 316-7.
- [223] Tsukamoto, S., Yoshida, T., Hosono, H., Ohta, T. and Yokosawa, H. (2006). Hexylitaconic acid: a new inhibitor of p53-HDM2 interaction isolated from a marine-derived fungus, *Arthrinium* sp. *Bioorg Med Chem Lett* 16, 69-71.
- [224] Zhao, J., Wang, M., Chen, J., Luo, A., Wang, X., Wu, M., Yin, D. and Liu, Z. (2002). The initial evaluation of non-peptidic small-molecule HDM2 inhibitors based on p53-HDM2 complex structure. *Cancer Lett* 183, 69-77.
- [225] Pantoliano, M.W. et al. (2001). High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J Biomol Screen* 6, 429-40.
- [226] Ding, K. et al. (2005). Structure-based design of potent non-peptide MDM2 inhibitors. *J Am Chem Soc* 127, 10130-1.

- [227] Hardcastle, I.R. et al. (2006). Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction based on an isoindolinone scaffold. *J Med Chem* 49, 6209-21.
- [228] Vassilev, L.T. et al. (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-8.
- [229] Vassilev, L.T. (2004). Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle* 3, 419-21.
- [230] Bode, A.M. and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4, 793-805.
- [231] Maya, R. et al. (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* 15, 1067-77.
- [232] Goldberg, Z. et al. (2002). Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *Embo J* 21, 3715-27.
- [233] Ashcroft, M., Ludwig, R.L., Woods, D.B., Copeland, T.D., Weber, H.O., MacRae, E.J. and Vousden, K.H. (2002). Phosphorylation of HDM2 by Akt. *Oncogene* 21, 1955-62.
- [234] Canman, C.E. et al. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677-9.
- [235] Khanna, K.K. et al. (1998). ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* 20, 398-400.
- [236] Lakin, N.D., Hann, B.C. and Jackson, S.P. (1999). The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene* 18, 3989-95.
- [237] Bech-Otschir, D., Kraft, R., Huang, X., Henklein, P., Kapelari, B., Pollmann, C. and Dubiel, W. (2001). COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *Embo J* 20, 1630-9.
- [238] Yang, W.H., Kim, J.E., Nam, H.W., Ju, J.W., Kim, H.S., Kim, Y.S. and Cho, J.W. (2006). Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol* 8, 1074-83.
- [239] Abida, W.M., Nikolaev, A., Zhao, W., Zhang, W. and Gu, W. (2007). FBXO11 promotes the Neddylation of p53 and inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* 282, 1797-804.
- [240] Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M. and Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* 18, 6462-71.

- [241] Kwek, S.S., Derry, J., Tyner, A.L., Shen, Z. and Gudkov, A.V. (2001). Functional analysis and intracellular localization of p53 modified by SUMO-1. *Oncogene* 20, 2587-99.
- [242] Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y. and Dejean, A. (2000). c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem* 275, 13321-9.
- [243] Avantaggiati, M.L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A.S. and Kelly, K. (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* 89, 1175-84.
- [244] Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D. and Berger, S.L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19, 1202-9.
- [245] Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A. and Gu, W. (2000). Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* 408, 377-81.
- [246] Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L. and Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107, 137-48.
- [247] Chuikov, S. et al. (2004). Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* 432, 353-60.
- [248] Shvarts, A. et al. (1996). MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *Embo J* 15, 5349-57.
- [249] Shvarts, A. et al. (1997). Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein, Mdmx. *Genomics* 43, 34-42.
- [250] Bottger, V., Bottger, A., Garcia-Echeverria, C., Ramos, Y.F., van der Eb, A.J., Jochemsen, A.G. and Lane, D.P. (1999). Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces. *Oncogene* 18, 189-99.
- [251] Jackson, M.W., Lindstrom, M.S. and Berberich, S.J. (2001). MdmX binding to ARF affects Mdm2 protein stability and p53 transactivation. *J Biol Chem* 276, 25336-41.
- [252] Stad, R., Little, N.A., Xirodimas, D.P., Frenk, R., van der Eb, A.J., Lane, D.P., Saville, M.K. and Jochemsen, A.G. (2001). Mdmx stabilizes p53 and Mdm2 via two distinct mechanisms. *EMBO Rep* 2, 1029-34.
- [253] Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A. and Ohtsubo, M. (1999). MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett* 447, 5-9.

- [254] Uldrijan, S., Pannekoek, W.J. and Vousden, K.H. (2007). An essential function of the extreme C-terminus of MDM2 can be provided by MDMX. *Embo J* 26, 102-12.
- [255] Marine, J.C., Francoz, S., Maetens, M., Wahl, G., Toledo, F. and Lozano, G. (2006). Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ* 13, 927-34.
- [256] Francoz, S., Froment, P., Bogaerts, S., De Clercq, S., Maetens, M., Doumont, G., Bellefroid, E. and Marine, J.C. (2006). Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3232-7.
- [257] Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. and Howley, P.M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129-36.
- [258] Leng, R.P. et al. (2003). Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* 112, 779-91.
- [259] Dornan, D. et al. (2004). The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* 429, 86-92.
- [260] Esser, C., Scheffner, M. and Hohfeld, J. (2005). The chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP is able to target p53 for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 280, 27443-8.
- [261] Weger, S., Hammer, E. and Heilbronn, R. (2002). Topors, a p53 and topoisomerase I binding protein, interacts with the adeno-associated virus (AAV-2) Rep78/68 proteins and enhances AAV-2 gene expression. *J Gen Virol* 83, 511-6.
- [262] Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J. and Gu, W. (2005). ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121, 1071-83.
- [263] Yamasaki, S. et al. (2007). Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. *Embo J* 26, 113-22.
- [264] Tang, J., Qu, L.K., Zhang, J., Wang, W., Michaelson, J.S., Degenhardt, Y.Y., El-Deiry, W.S. and Yang, X. (2006). Critical role for Daxx in regulating Mdm2. *Nat Cell Biol* 8, 855-62.
- [265] Laine, A. and Ronai, Z. (2007). Regulation of p53 localization and transcription by the HECT domain E3 ligase WWP1. *Oncogene* 26, 1477-83.
- [266] Andrews, P., He, Y.J. and Xiong, Y. (2006). Cytoplasmic localized ubiquitin ligase cullin 7 binds to p53 and promotes cell growth by antagonizing p53 function. *Oncogene* 25, 4534-48.

- [267] Tripathi, V., Ali, A., Bhat, R. and Pati, U. (2007). CHIP chaperones wild type p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 282, 28441-54.
- [268] Weger, S., Hammer, E. and Heilbronn, R. (2005). Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 579, 5007-12.
- [269] Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-30.
- [270] Joachimiak, A. (1997). Capturing the misfolds: chaperone-peptide-binding motifs. *Nat Struct Biol* 4, 430-4.
- [271] Pelham, H.R. (1984). Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *Embo J* 3, 3095-100.
- [272] Mayer, M.P. and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62, 670-84.
- [273] Zylicz, M., LeBowitz, J.H., McMacken, R. and Georgopoulos, C. (1983). The dnaK protein of *Escherichia coli* possesses an ATPase and autophosphorylating activity and is essential in an in vitro DNA replication system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 6431-5.
- [274] McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J. and Bukau, B. (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J Mol Biol* 249, 126-37.
- [275] Liberek, K., Skowyra, D., Zylicz, M., Johnson, C. and Georgopoulos, C. (1991). The *Escherichia coli* DnaK chaperone, the 70-kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein. *J Biol Chem* 266, 14491-6.
- [276] Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. and Zylicz, M. (1991). *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2874-8.
- [277] Hohfeld, J. and Jentsch, S. (1997). GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *Embo J* 16, 6209-16.
- [278] Takayama, S., Bimston, D.N., Matsuzawa, S., Freeman, B.C., Aime-Sempe, C., Xie, Z., Morimoto, R.I. and Reed, J.C. (1997). BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *Embo J* 16, 4887-96.
- [279] Ziegelhoffer, T., Johnson, J.L. and Craig, E.A. (1996). Chaperones get Hip. *Protein folding. Curr Biol* 6, 272-5.
- [280] Frydman, J. and Hohfeld, J. (1997). Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends Biochem Sci* 22, 87-92.

- [281] Pratt, W.B. and Welsh, M.J. (1994). Chaperone functions of the heat shock proteins associated with steroid receptors. *Semin Cell Biol* 5, 83-93.
- [282] Pratt, W.B. and Toft, D.O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med* (Maywood) 228, 111-33.
- [283] Neckers, L. and Neckers, K. (2005). Heat-shock protein 90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutics - an update. *Expert Opin Emerg Drugs* 10, 137-49.
- [284] Ferrarini, M., Heltai, S., Zocchi, M.R. and Rugarli, C. (1992). Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer* 51, 613-9.
- [285] Beliakoff, J. and Whitesell, L. (2004). Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy. *Anticancer Drugs* 15, 651-62.
- [286] Whitesell, L., Mimnaugh, E.G., De Costa, B., Myers, C.E. and Neckers, L.M. (1994). Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8324-8.
- [287] Sharp, S. and Workman, P. (2006). Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status. *Adv Cancer Res* 95, 323-48.
- [288] Ballinger, C.A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L.J., Yin, L.Y. and Patterson, C. (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* 19, 4535-45.
- [289] Hatakeyama, S., Yada, M., Matsumoto, M., Ishida, N. and Nakayama, K.I. (2001). U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* 276, 33111-20.
- [290] Jiang, J., Ballinger, C.A., Wu, Y., Dai, Q., Cyr, D.M., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2001). CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem* 276, 42938-44.
- [291] Demand, J., Alberti, S., Patterson, C. and Hohfeld, J. (2001). Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol* 11, 1569-77.
- [292] Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T. and Tanaka, K. (2001). CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep* 2, 1133-8.
- [293] Galigniana, M.D., Harrell, J.M., Housley, P.R., Patterson, C., Fisher, S.K. and Pratt, W.B. (2004). Retrograde transport of the glucocorticoid receptor in neurites requires

- dynamic assembly of complexes with the protein chaperone hsp90 and is linked to the CHIP component of the machinery for proteasomal degradation. *Brain Res Mol Brain Res* 123, 27-36.
- [294] Hinds, P.W., Finlay, C.A., Frey, A.B. and Levine, A.J. (1987). Immunological evidence for the association of p53 with a heat shock protein, hsc70, in p53-plus-ras-transformed cell lines. *Mol Cell Biol* 7, 2863-9.
- [295] Selkirk, J.K., Merrick, B.A., Stackhouse, B.L. and He, C. (1994). Multiple p53 protein isoforms and formation of oligomeric complexes with heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 in the human mammary tumor, T47D, cell line. *Appl Theor Electrophor* 4, 11-8.
- [296] Nagata, Y. et al. (1999). The stabilization mechanism of mutant-type p53 by impaired ubiquitination: the loss of wild-type p53 function and the hsp90 association. *Oncogene* 18, 6037-49.
- [297] Peng, Y., Chen, L., Li, C., Lu, W., Agrawal, S. and Chen, J. (2001). Stabilization of the MDM2 oncoprotein by mutant p53. *J Biol Chem* 276, 6874-8.
- [298] Grossman, S.R., Deato, M.E., Brignone, C., Chan, H.M., Kung, A.L., Tagami, H., Nakatani, Y. and Livingston, D.M. (2003). Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300, 342-4.
- [299] Esser, C., Alberti, S. and Hohfeld, J. (2004). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 1695, 171-88.
- [300] Muller, P., Hrstka, R., Coomber, D., Lane, D.P. and Vojtesek, B. (2008). Chaperone-dependent stabilization and degradation of p53 mutants. *Oncogene* 27, 3371-83.
- [301] Lang, G.A. et al. (2004). Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* 119, 861-72.
- [302] King, F.W., Wawrzynow, A., Hohfeld, J. and Zyllicz, M. (2001). Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. *Embo J* 20, 6297-305.
- [303] Zyllicz, M., King, F.W. and Wawrzynow, A. (2001). Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *Embo J* 20, 4634-8.
- [304] Asher, G. and Shaul, Y. (2005). p53 proteasomal degradation: poly-ubiquitination is not the whole story. *Cell Cycle* 4, 1015-8.
- [305] Liang, S.H. and Clarke, M.F. (2001). Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* 268, 2779-83.



- [306] Middeler, G., Zerf, K., Jenovai, S., Thulig, A., Tschodrich-Rotter, M., Kubitscheck, U. and Peters, R. (1997). The tumor suppressor p53 is subject to both nuclear import and export, and both are fast, energy-dependent and lectin-inhibited. *Oncogene* 14, 1407-17.
- [307] Shaulsky, G., Ben-Ze'ev, A. and Rotter, V. (1990). Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene* 5, 1707-11.
- [308] Shaulsky, G., Goldfinger, N., Tosky, M.S., Levine, A.J. and Rotter, V. (1991). Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene* 6, 2055-65.
- [309] Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J. and Wahl, G.M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo J* 18, 1660-72.
- [310] Zhang, Y. and Xiong, Y. (2001). A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 292, 1910-5.
- [311] Carter, S., Bischof, O., Dejean, A. and Vousden, K.H. (2007). C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat Cell Biol* 9, 428-35.
- [312] Lohrum, M.A., Woods, D.B., Ludwig, R.L., Balint, E. and Vousden, K.H. (2001). C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export. *Mol Cell Biol* 21, 8521-32.
- [313] Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R. and Gu, W. (2003). Mono-versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* 302, 1972-5.
- [314] Boyd, S.D., Tsai, K.Y. and Jacks, T. (2000). An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat Cell Biol* 2, 563-8.
- [315] Gu, J., Nie, L., Wiederschain, D. and Yuan, Z.M. (2001). Identification of p53 sequence elements that are required for MDM2-mediated nuclear export. *Mol Cell Biol* 21, 8533-46.
- [316] Nikolaev, A.Y., Li, M., Puskas, N., Qin, J. and Gu, W. (2003). Parc: a cytoplasmic anchor for p53. *Cell* 112, 29-40.
- [317] Wadhwa, R., Takano, S., Robert, M., Yoshida, A., Nomura, H., Reddel, R.R., Mitsui, Y. and Kaul, S.C. (1998). Inactivation of tumor suppressor p53 by mot-2, a hsp70 family member. *J Biol Chem* 273, 29586-91.

- [318] Chipuk, J.E. and Green, D.R. (2004). Cytoplasmic p53: bax and forward. *Cell Cycle* 3, 429-31.
- [319] Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M. and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010-4.
- [320] Marchenko, N.D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K. and Moll, U.M. (2007). Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *Embo J* 26, 923-34.
- [321] Friguet, B., Bulteau, A.L., Chondrogianni, N., Conconi, M. and Petropoulos, I. (2000). Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. *Ann N Y Acad Sci* 908, 143-54.
- [322] Gaczynska, M., Osmulski, P.A. and Ward, W.F. (2001). Caretaker or undertaker? The role of the proteasome in aging. *Mech Ageing Dev* 122, 235-54.
- [323] Bulteau, A.L., Moreau, M., Nizard, C. and Friguet, B. (2002). Impairment of proteasome function upon UVA- and UVB-irradiation of human keratinocytes. *Free Radic Biol Med* 32, 1157-70.
- [324] Petropoulos, I., Conconi, M., Wang, X., Hoemel, B., Bregegere, F., Milner, Y. and Friguet, B. (2000). Increase of oxidatively modified protein is associated with a decrease of proteasome activity and content in aging epidermal cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55, B220-7.
- [325] Louie, J.L., Kappahn, R.J. and Ferrington, D.A. (2002). Proteasome function and protein oxidation in the aged retina. *Exp Eye Res* 75, 271-84.
- [326] Merker, K. and Grune, T. (2000). Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence. *Exp Gerontol* 35, 779-86.
- [327] Chondrogianni, N., Stratford, F.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: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J Biol Chem* 278, 28026-37.
- [328] Chondrogianni, N., Tzavelas, C., Pemberton, A.J., Nezis, I.P., Rivett, A.J. and Gonos, E.S. (2005). Overexpression of proteasome beta5 assembled subunit increases the amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates. *J Biol Chem* 280, 11840-50.
- [329] Katsiki, M., Chondrogianni, N., Chinou, I., Rivett, A.J. and Gonos, E.S. (2007). The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and

- confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res* 10, 157-72.
- [330] Bulteau, A.L., Lundberg, K.C., Humphries, K.M., Sadek, H.A., Szweda, P.A., Friguets, B. and Szweda, L.I. (2001). Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem* 276, 30057-63.
- [331] Bulteau, A.L., Petropoulos, I. and Friguets, B. (2000). Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. *Exp Gerontol* 35, 767-77.
- [332] Grune, T., Shringarpure, R., Sitte, N. and Davies, K. (2001). Age-related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56, B459-67.
- [333] Sitte, N., Huber, M., Grune, T., Ladhoff, A., Doecke, W.D., Von Zglinicki, T. and Davies, K.J. (2000). Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *Faseb J* 14, 1490-8.
- [334] Carrard, G., Dieu, M., Raes, M., Toussaint, O. and Friguets, B. (2003). Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 728-39.
- [335] Sitte, N., Merker, K., von Zglinicki, T. and Grune, T. (2000). Protein oxidation and degradation during proliferative senescence of human MRC-5 fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 28, 701-8.
- [336] Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Davies, K.J. and Grune, T. (2000). Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II--aging of nondividing cells. *Faseb J* 14, 2503-10.
- [337] Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Grune, T. and Davies, K.J. (2000). Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I--effects of proliferative senescence. *Faseb J* 14, 2495-502.
- [338] Bulteau, A.L., Verbeke, P., Petropoulos, I., Chaffotte, A.F. and Friguets, B. (2001). Proteasome inhibition in glyoxal-treated fibroblasts and resistance of glycated glucose-6-phosphate dehydrogenase to 20 S proteasome degradation in vitro. *J Biol Chem* 276, 45662-8.
- [339] Friguets, B., Szweda, L.I. and Stadtman, E.R. (1994). Susceptibility of glucose-6-phosphate dehydrogenase modified by 4-hydroxy-2-nonenal and metal-catalyzed oxidation to proteolysis by the multicatalytic protease. *Arch Biochem Biophys* 311, 168-73.
- [340] Wickens, A.P. (2001). Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol* 128, 379-91.

- [341] Gerstein, A.D., Phillips, T.J., Rogers, G.S. and Gilchrest, B.A. (1993). Wound healing and aging. *Dermatol Clin* 11, 749-57.
- [342] Donehower, L.A. (2002). Does p53 affect organismal aging? *J Cell Physiol* 192, 23-33.
- [343] Kohn, K.W. (1999). Molecular interaction map of the mammalian cell cycle control and DNA repair systems. *Mol Biol Cell* 10, 2703-34.
- [344] Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. and Haupt, Y. (2003). Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 116, 4077-85.
- [345] Dartnell, L., Simeonidis, E., Hubank, M., Tsoka, S., Bogle, I.D. and Papageorgiou, L.G. (2005). Robustness of the p53 network and biological hackers. *FEBS Lett* 579, 3037-42.
- [346] Kohn, K.W. and Pommier, Y. (2005). Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the Off-On switch of p53 in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 816-27.
- [347] Clarke, A.R. and Hollstein, M. (2003). Mouse models with modified p53 sequences to study cancer and ageing. *Cell Death Differ* 10, 443-50.
- [348] Tyner, S.D. et al. (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415, 45-53.
- [349] Maier, B. et al. (2004). Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev* 18, 306-19.
- [350] Matlashewski, G., Pim, D., Banks, L. and Crawford, L. (1987). Alternative splicing of human p53 transcripts. *Oncogene Res* 1, 77-85.
- [351] Flaman, J.M., Waridel, F., Estreicher, A., Vannier, A., Limacher, J.M., Gilbert, D., Iggo, R. and Frebourg, T. (1996). The human tumour suppressor gene p53 is alternatively spliced in normal cells. *Oncogene* 12, 813-8.
- [352] Arai, N., Nomura, D., Yokota, K., Wolf, D., Brill, E., Shohat, O. and Rotter, V. (1986). Immunologically distinct p53 molecules generated by alternative splicing. *Mol Cell Biol* 6, 3232-9.
- [353] Courtois, S., Verhaegh, G., North, S., Luciani, M.G., Lassus, P., Hibner, U., Oren, M. and Hainaut, P. (2002). DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene* 21, 6722-8.

- [354] Rohaly, G., Chemnitz, J., Dehde, S., Nunez, A.M., Heukeshoven, J., Deppert, W. and Dornreiter, I. (2005). A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell* 122, 21-32.
- [355] Ray, P.S., Grover, R. and Das, S. (2006). Two internal ribosome entry sites mediate the translation of p53 isoforms. *EMBO Rep* 7, 404-10.
- [356] Yin, Y., Stephen, C.W., Luciani, M.G. and Fahraeus, R. (2002). p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol* 4, 462-7.
- [357] Lavigne, A., Maltby, V., Mock, D., Rossant, J., Pawson, T. and Bernstein, A. (1989). High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol* 9, 3982-91.
- [358] Scrable, H., Sasaki, T. and Maier, B. (2005). DeltaNp53 or p44: priming the p53 pump. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 913-9.
- [359] Ghosh, A., Stewart, D. and Matlashewski, G. (2004). Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol* 24, 7987-97.
- [360] Gannon, J.V. and Lane, D.P. (1991). Protein synthesis required to anchor a mutant p53 protein which is temperature-sensitive for nuclear transport. *Nature* 349, 802-6.
- [361] Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Sczakiel, G., Grosse, F. and Deppert, W. (1995). Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *Embo J* 14, 4442-9.
- [362] Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11, 577-90.
- [363] Garcia-Cao, I. et al. (2002). "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *Embo J* 21, 6225-35.
- [364] Gems, D. and Partridge, L. (2001). Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture. *Curr Opin Genet Dev* 11, 287-92.
- [365] Richardson, A., Liu, F., Adamo, M.L., Van Remmen, H. and Nelson, J.F. (2004). The role of insulin and insulin-like growth factor-I in mammalian ageing. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18, 393-406.
- [366] Rovinski, B. and Benchimol, S. (1988). immortalization of rat embryo fibroblasts by the cellular p53 oncogene. *Oncogene* 2, 445-52.

- [367] Mowat, M., Cheng, A., Kimura, N., Bernstein, A. and Benchimol, S. (1985). Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. *Nature* 314, 633-6.
- [368] Papazoglu, C. and Mills, A.A. (2007). p53: at the crossroad between cancer and ageing. *J Pathol* 211, 124-33.
- [369] Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P. and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* 22, 4212-22.
- [370] Beausejour, C.M. and Campisi, J. (2006). Ageing: balancing regeneration and cancer. *Nature* 443, 404-5.
- [371] Jansen, J.F., Shablott, M.J., van Zijl, P.C., Lehtimaki, K.K., Bulte, J.W., Gearhart, J.D. and Hakumaki, J.M. (2006). Stem cell profiling by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Magn Reson Med* 56, 666-70.
- [372] Krishnamurthy, J., Ramsey, M.R., Ligon, K.L., Torrice, C., Koh, A., Bonner-Weir, S. and Sharpless, N.E. (2006). p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 443, 453-7.
- [373] Molofsky, A.V., Slutsky, S.G., Joseph, N.M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., Sharpless, N.E. and Morrison, S.J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 443, 448-52.
- [374] Campisi, J. (2005). Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science* 309, 886-7.
- [375] Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513-22.
- [376] Keyes, W.M., Wu, Y., Vogel, H., Guo, X., Lowe, S.W. and Mills, A.A. (2005). p63 deficiency activates a program of cellular senescence and leads to accelerated aging. *Genes Dev* 19, 1986-99.
- [377] Wesierska-Gadek, J. and Schmid, G. (2005). The subcellular distribution of the p53 tumour suppressor, and organismal ageing. *Cell Mol Biol Lett* 10, 439-53.
- [378] Wesierska-Gadek, J., Ranftler, C. and Schmid, G. (2005). Physiological ageing: role of p53 and PARP-1 tumor suppressors in the regulation of terminal senescence. *J Physiol Pharmacol* 56 Suppl 2, 77-88.
- [379] Keyes, W.M. and Mills, A.A. (2006). p63: a new link between senescence and aging. *Cell Cycle* 5, 260-5.

- [380] Girardi, A.J., Weinstein, D. and Moorhead, P.S. (1966). SV40 transformation of human diploid cells. A parallel study of viral and karyologic parameters. *Ann Med Exp Biol Fenn* 44, 242-54.
- [381] Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R. and Stark, G.R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8493-7.
- [382] Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113 ( Pt 20), 3613-22.
- [383] Harlow, E. and Lane, D. (1999) *Using antibodies : a laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour.
- [384] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- [385] Mandel, M. and Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53, 159-62.
- [386] Chondrogianni, N., Petropoulos, I., Franceschi, C., Friguet, B. and Gonos, E.S. (2000). Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. *Exp Gerontol* 35, 721-8.
- [387] Hara, E., Uzman, J.A., Dimri, G.P., Nehlin, J.O., Testori, A. and Campisi, J. (1996). The helix-loop-helix protein Id-1 and a retinoblastoma protein binding mutant of SV40 T antigen synergize to reactivate DNA synthesis in senescent human fibroblasts. *Dev Genet* 18, 161-72.
- [388] Rivett, A.J. (1993). Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem J* 291 ( Pt 1), 1-10.
- [389] Rivett, A.J. (1993). Characterization of proteasomes isolated from rat liver. *Enzyme Protein* 47, 210-9.
- [390] Tanaka, K. (1998). Molecular biology of the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 537-41.
- [391] Voges, D., Zwickl, P. and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68, 1015-68.
- [392] Schwarze, S.R., Shi, Y., Fu, V.X., Watson, P.A. and Jarrard, D.F. (2001). Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in the growth arrest at senescence in human prostate epithelial and uroepithelial cells. *Oncogene* 20, 8184-92.

- [393] Matheu, A., Maraver, A. and Serrano, M. (2008). The Arf/p53 pathway in cancer and aging. *Cancer Res* 68, 6031-4.
- [394] Drexler, H.C., Risau, W. and Konecny, M.A. (2000). Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *Faseb J* 14, 65-77.
- [395] Min, J.N., Whaley, R.A., Sharpless, N.E., Lockyer, P., Portbury, A.L. and Patterson, C. (2008). CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Mol Cell Biol* 28, 4018-25.
- [396] Baulcombe, D.C. (2000). Molecular biology. Unwinding RNA silencing. *Science* 290, 1108-9.
- [397] Tuschl, T. (2001). RNA interference and small interfering RNAs. *ChemBiochem* 2, 239-45.
- [398] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11.
- [399] Bukau, B., Weissman, J. and Horwich, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125, 443-51.
- [400] Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-8.
- [401] Hsu, A.L., Murphy, C.T. and Kenyon, C. (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 300, 1142-5.
- [402] Kimura, K., Tanaka, N., Nakamura, N., Takano, S. and Ohkuma, S. (2007). Knockdown of mitochondrial heat shock protein 70 promotes progeria-like phenotypes in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 282, 5910-8.
- [403] Hayashi, T. and Goto, S. (1998). Age-related changes in the 20S and 26S proteasome activities in the liver of male F344 rats. *Mech Ageing Dev* 102, 55-66.
- [404] Goldberg, A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895-9.
- [405] Dumble, M., Moore, L., Chambers, S.M., Geiger, H., Van Zant, G., Goodell, M.A. and Donehower, L.A. (2007). The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood* 109, 1736-42.
- [406] Garcia-Cao, I., Garcia-Cao, M., Tomas-Loba, A., Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Klatt, P., Blasco, M.A. and Serrano, M. (2006). Increased p53 activity does not accelerate telomere-driven ageing. *EMBO Rep* 7, 546-52.



- [407] Matheu, A. et al. (2007). Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* 448, 375-9.
- [408] Campisi, J. (2000). Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* 14, 183-8.
- [409] Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-31.
- [410] Soussi, T. and Lozano, G. (2005). p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 834-42.
- [411] Lukashchuk, N. and Vousden, K.H. (2007). Ubiquitination and degradation of mutant p53. *Mol Cell Biol* 27, 8284-95.
- [412] Schmid, G., Kramer, M.P., Maurer, M., Wandl, S. and Wesierska-Gadek, J. (2007). Cellular and organismal ageing: Role of the p53 tumor suppressor protein in the induction of transient and terminal senescence. *J Cell Biochem* 101, 1355-69.
- [413] Geiger-Thornsberry, G.L. and Mackay, T.F. (2004). Quantitative trait loci affecting natural variation in *Drosophila* longevity. *Mech Ageing Dev* 125, 179-89.
- [414] Kenyon, C. (2005). The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120, 449-60.
- [415] Guarente, L. (2005). Calorie restriction and SIR2 genes--towards a mechanism. *Mech Ageing Dev* 126, 923-8.
- [416] Sgro, C.M. and Partridge, L. (1999). A delayed wave of death from reproduction in *Drosophila*. *Science* 286, 2521-4.
- [417] Woodland, D.L. and Blackman, M.A. (2006). Immunity and age: living in the past? *Trends Immunol* 27, 303-7.
- [418] Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.
- [419] Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y. and Shkedy, D. (1999). Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14973-7.
- [420] Feng, Z., Hu, W., Teresky, A.K., Hernando, E., Cordon-Cardo, C. and Levine, A.J. (2007). Declining p53 function in the aging process: a possible mechanism for the increased tumor incidence in older populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16633-8.
- [421] Campeljoh, R.S. et al. (2003). Apoptosis, ageing and cancer susceptibility. *Br J Cancer* 88, 487-90.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

**AA:** Αμινοξέα, Amino acids

**APS:** Υπερθειικό αμμώνιο, Ammonium persulfate

**ATCC:** Αμερικάνικη συλλογή τύπων καλλιέργειας, American Type Culture Collection

**ATP:** 5-τριφωφορική αδενοσίνη, Adenosine 5'-triphosphate

**BSA:** Αλβουμίνη ορού βοός, Bovine serum albumin

**Cdk:** Κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση, Cyclin dependent kinase

**CDKI:** Αναστολέας των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών,

Inhibitor of cyclin-dependent kinase

**cDNA:** Συμπληρωματικό DNA, DNA complementary to mRNA

**CFTR:** Ρυθμιστής της διαμεμβρανικής αγωγιμότητας στην κυστική ίνωση,

Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

**CHIP:** Πρωτεΐνη αλληλεπιδρούσα με το καρβοξυτελικό άκρο της Hsp70,

Carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein

**CPD:** Αθροιζόμενος αριθμός κυτταρικών διπλασιασμών, Cumulative population doubling

**CT-L:** Ενεργότητα χυμοθρυψίνης, Chymotrypsin-like

**DAPI:** 4,6-Διαμίδινο-2-φενυλινδόλη, 4,6-Diamidino-2-phenylindole

**DBD:** Περιοχή που προσδέεται στο DNA, DNA binding domain

**DMEM:** Dulbecco's modified Eagles medium

**DMSO:** Διμεθυλοσουλφοξείδιο, Dimethyl sulphoxide

**DNA:** Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ, Deoxyribonucleic acid

**dNTPs:** Τριφωφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, Deoxyribonucleotide triphosphate

**DTT:** Διθειοθρεϊτόλη, Dithiothreitol

**DUB:** Απο-ουμπικιτυλίωσης, De-Ubiquitilating

**ECL:** Ενισχυμένη Χημειοφωτάγεια, Enhanced chemiluminescence

**EDTA:** Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, Ethylene diamine tetra-acetate

**EtBr:** Βρωμιούχο αιθίδιο, Ethidium bromide

**FCS:** Εμβρυϊκός Ορός Μόσχου, Foetal calf serum

**GAPDH:** Δεϋδρογονάση 3-φωφορικής γλυκεριναλδεϋδης,

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

**HDAC-1:** Αποακετυλάση 1 της ιστόνης, Histone DeAcetylase1

**HEPES:** N'-2'-υδροξυαιθυλ-πιπεραζιν-N'-2'-αιθανοσουλφονικό οξύ,

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid

**HRP:** Υπεροξειδάση της αγριοραφανίδας, Horseradish peroxidase

**Hsp:** Πρωτεΐνη θερμικού σοκ, Heat shock protein

**kDa:** Kilodalton

**LB:** Luria-Bertani medium

**LFS:** Lifraumeni Syndrome

**mRNA:** Μηνυματοφόρο RNA, Messenger RNA

**NLS:** Σινιάλο πυρηνικού εντοπισμού, Nuclear localisation signal

**NES:** Σινιάλο εξόδου από τον πυρήνα, Nuclear export signal

**NP-40:** Nonidet P40

**NQO1:** Οξειδοαναγωγή της NAD(P)H κινόνης, NAD(P)H Quinone Oxidoreductase 1

**OD:** Περιοχή ολιγομερισμού, Oligomerization domain

**PARP:** Poly-ADP-Ribose-Polymerase

**PBS:** Διάλυμα φωσφορικών αλάτων, Phosphate buffered saline

**PCR:** Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, Polymerase chain reaction

**PD:** Περιοχή πλούσια σε προλίνες, Proline rich domain

**PFA:** Παραφορμαλδεΰδη, Paraformaldehyde

**PGPH:** Ενεργότητα πεπτιδυλογλουταμυλο-υδρολάσης,  
Peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing

**PMSF:** Φαινυλο-μεθυλο-σουλφονύλο-φθορίδιο, Phenylmethylsulphonyl fluoride

**RD:** Ρυθμιστική περιοχή, Regulatory domain

**RNA:** Ριβονουκλεϊκό οξύ, Ribonucleic acid

**RNase:** Ριβονουκλεάση, Ribonuclease

**ROS:** Ενεργές ρίζες οξυγόνου, Reactive Oxygen Species

**Rpm:** Στροφές ανά λεπτό, Rounds per minute

**rRNA:** Ριβοσωμικό RNA, Ribosomal RNA

**RT-PCR:** Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο,  
Reverse transcription polymerase chain reaction

**SD:** Τυπική απόκλιση, Standard deviation

**SDS:** Δωδεκυλ-υπερθευκό νάτριο, Sodium dodecyl sulphate

**SIPS:** Πρόωρα επαγόμενη γήρανση εξαιτίας στρες, Stress-induced premature senescence

**Sir2a:** Silent Information Regulator 2α

**siRNA:** Σύντομα παρεμβαλλόμενα RNA, Short interfering RNA

**TA:** Περιοχή δια-ενεργοποίησης, Transactivation domain

**TBS-T:** Ρυθμιστικό διάλυμα Tris με Tween 20, Tris buffered saline – Tween 20

**TE:** Διάλυμα Tris-EDTA

**TEMED:** N,N, N', N', τετραμεθυλεν-διαμίνη, N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

**T-L:** Ενεργότητα θρυψίνης, Trypsin-like

**Tris:** Τρις-υδροξυμεθυλο-αμινομεθάνιο

**Ts:** Θερμοευαίσθητο, Temperature sensitive

**Ub:** Ουμπικιτίνη, Ubiquitin

**UCHs:** Καρβοξυτελικές υδρολάσες ουμπικιτίνης, Ubiquitin C-terminal hydrolases

**USPs:** Πρωτεάσες ειδικές για ουμπικιτίνη, Ubiquitin-specific processing protease

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΙΣΟΥΛΑ

#### Προσωπικά στοιχεία

**Διεύθυνση:** Ικτίνου 12, Αιγάλεω, 12243, Αθήνα

**Ημερομηνία Γέννησης:** 10 Ιουνίου 1981

**e-mail:** [csisoula@eie.gr](mailto:csisoula@eie.gr)

#### Εκπαίδευση

**2006-2010:** Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής

- Τομέας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), Αθήνα
- Εργαστήριο Μοριακής και Κυτταρικής Γήρανσης, Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (ΕΙΕ)

**2000-2005:** Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα **Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών**, Ιωάννινα (Βαθμός Πτυχίου: **8,22/10**)

#### Διδακτική Εμπειρία

**2006-2009:** Εργαστηριακός βοηθός στα προπτυχιακά μαθήματα του Τομέα Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Αθήνα

#### Υποτροφίες

**2006-2010:** Υπότροφος του Ιδρύματος Μποδοσάκη

**2006-2009:** Υπότροφος του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών

#### Δημοσιεύσεις

1. **Christina Sisoula**, Efstathios S. Gonos (2011). "CHIP E3 ligase regulates mammalian senescence by modulating the levels of oxidized proteins". *Mechanisms of Ageing and Development*, 132: 269-272.
2. **Christina Sisoula**, Varvara Trachana, Cam Patterson, Efstathios S. Gonos (2011). "CHIP-dependent p53 regulation occurs specifically during cellular senescence". *Free Radical Biology and Medicine*, 50: 157-165.
3. Kolettas E, Thomas C, Leneti E, Skoufos I, Mbatsi C, **Sisoula C**, Manos G, Evangelou A (2006). "Rosmarinic acid failed to suppress hydrogen peroxide-mediated apoptosis but induced apoptosis of Jurkat cells which was suppressed by Bcl-2". *Molecular and Cellular Biochemistry*, 285: 111-20.

#### Παρουσιάσεις σε Διεθνή Συνέδρια

- **60<sup>th</sup> Meeting of Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology**  
"CHIP ligase is a major regulator of p53 in cellular senescence". **Christina Sisoula**, Varvara Trachana, Suzanne Kapeta and Efstathios S. Gonos. Αθήνα, Ελλάδα. Νοέμβριος 2009 (Γραπτή ανακοίνωση - **1<sup>ο</sup> Βραβείο Καλύτερης Αναρτημένης Παρουσίασης**).
- **2009 Annual meeting of LINK-AGE and Topic Research Group Meetings third edition (με υποτροφία)**

“CHIP overrides Mdm2-mediated degradation of p53 during replicative senescence”. **Christina Sisoula**, Varvara Trachana, Suzanne Kapeta and Efstathios S. Gonos. Brussels, Belgium. November 2009 (Γραπτή ανακοίνωση).

- **34<sup>th</sup> FEBS Congress: Life’s Molecular Interactions (με υποτροφία)**  
“CHIP ligase plays a central role in p53 regulation during senescence”. **Christina Sisoula**, Varvara Trachana, Suzanne Kapeta and Efstathios S. Gonos. Prague, Czech Republic. July 2009 (Γραπτή ανακοίνωση).
- **FEBS Practical Course on Protein Interaction Modules (με υποτροφία)**  
“CHIP ligase plays a central role in p53 regulation during senescence”. **Christina Sisoula**, Varvara Trachana and Efstathios S. Gonos. MedILS, Split, Croatia. April 2009 (Γραπτή ανακοίνωση και Προφορική παρουσίαση).
- **SFRR-E Free Radical Summer School 2008: “Lipid Peroxidation- and Free Radical-Signalling: Roles in Pathophysiology” (με υποτροφία)**  
“p53 ubiquitylation and degradation during cellular senescence”. **Christina Sisoula** and Efstathios S. Gonos. Spetses, Greece. September 2008 (Γραπτή ανακοίνωση).
- **33<sup>rd</sup> FEBS Congress & 11<sup>th</sup> IUBMB Conference (με υποτροφία)**  
“Altered expression of p53 ubiquitin ligases in human senescence”. **Christina Sisoula** and Efstathios S. Gonos. Athens, Greece. July 2008 (Γραπτή ανακοίνωση).
- **30<sup>th</sup> Meeting of Hellenic Society for Biological Science**  
“Regulation of p53 and its ubiquitin ligases in human cellular senescence”. **Christina Sisoula** and Efstathios S. Gonos. Thessaloniki, Greece. May 2008 (Γραπτή ανακοίνωση και Προφορική παρουσίαση).
- **59<sup>th</sup> Meeting of Hellenic Society of Biochemistry & Molecular Biology**  
“Role of ubiquitin ligases of p53 in human senescence”. **Christina Sisoula** and Efstathios S. Gonos. Athens, Greece. December 2007 (Γραπτή ανακοίνωση).
- **Proteome – Annual Scientific Meeting**  
“Role of specific ligases of p53 in human aging”. **Christina Sisoula** and Efstathios S. Gonos. Waterloo, Belgium. October 2007 (Προφορική παρουσίαση).
- **Proteome – Summer School**  
Spetses, Greece. May 2006 (Προφορική παρουσίαση).

### Σεμινάρια

Πρώτων Βοηθειών - Ελληνικός Ερυθρός Σταυρός

### Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά - First Certificate in English (Cambridge University)

### Η/Υ

Πτυχίο: Microsoft Office Specialist.

Ειδικά Προγράμματα: Adobe Illustrator CS2, Image Quant 5.2, EndNote

### Άλλες Δραστηριότητες

- Μέλος της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας
- Μέλος της Πανελλήνιας Ένωσης Βιοεπιστημόνων