



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

Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Βιολογίας
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής

Διδακτορική Διατριβή με θέμα:

**«Μελέτη της ρύθμισης λειτουργικών μονάδων
του δικτύου κυτταρικής πρωτεόστασης στη
γήρανση και τον καρκίνο»**

Ελένη Δήμητρα Παπανάγνου

Βιολόγος

Αθήνα 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιωάννης Τρουγκάκος

Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
(Επιβλέπων)

Ισιδώρα Παπασιδέρη

Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Τέρπος

Καθηγητής, Τομέας Παθολογίας, Εργαστήριο Κλινικής Θεραπευτικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ισιδώρα Παπασιδέρη, Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ανδρέας Σκορίλας, Καθηγητής, Τομέας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ευάγγελος Τέρπος

Καθηγητής, Τομέας Παθολογίας, Εργαστήριο Κλινικής Θεραπευτικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Ιωάννης Τρουγκάκος

Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Ουρανία Τσιτσιλώνη,

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

Ευστάθιος Καστρίτης

Αν. Καθηγητής, Τομέας Παθολογίας, Εργαστήριο Κλινικής Θεραπευτικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Παναγούλα Κόλλια,

Αν. Καθηγήτρια, Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή (ΔΔ) με θέμα “Μελέτη της ρύθμισης λειτουργικών μονάδων του δικτύου κυτταρικής πρωτεόστασης στη γήρανση και τον καρκίνο” εκπονήθηκε στον τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής (Σεπτέμβριος 2014-Ιούλιος 2019). Κατά τη διάρκεια της ΔΔ Διευθυντές του τομέα διετέλεσαν ο Ομότιμος Καθηγητής κ. Σταύρος Χαμόδρακας, η Καθηγήτρια κα. Ισιδώρα Παπασιδέρη καθώς και ο παρών Διευθυντής του Τομέα και επιβλέπων της παρούσας ΔΔ, ο Καθηγητής κ. Ιωάννης Τρουγκάκος τους οποίους ευχαριστώ θερμά. Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής για την άψογη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια.

Η παρούσα ΔΔ συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Πρόγραμμα Χορήγησης Υποτροφιών για Μεταπτυχιακές Σπουδές Δευτέρου Κύκλου Σπουδών» (MIS-5003404), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



This research is co-financed by Greece and the European Union (European Social Fund- ESF) through the Operational Programme «Human Resources Development, Education and Lifelong Learning» in the context of the project "Scholarships programme for post-graduate studies-2nd Study Cycle" (MIS-5003404), implemented by the State Scholarships Foundation (IKY).



Η έγκριση διδακτορικής διατριβής υπό του Βιολογικού Τμήματος της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλεί αποδοχήν απόψεων του συγγραφέα».

(Ν. 5343/1932, Άρθρο 202, Παρ. 2)

«Δηλώνω υπεύθυνα ότι, το κείμενο της ΔΔ δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον»

Παπανάγνου Ελένη-Δήμητρα

Πρόλογος

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκο, υπεύθυνο της ΔΔ μου, που μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ πάνω στο συγκεκριμένο θέμα και μου παρείχε όλη τη γνώση και τα εφόδια για να την ολοκληρώσω. Επίσης, τον ευχαριστώ για την ηθική του υποστήριξη και εμπύχωση καθώς και για το θετικό περιβάλλον εργασίας που δημιούργησε μέσα από το οποίο με βοήθησε να εξελιχθώ ως ερευνήτρια και να αγαπήσω την επιστήμη της Βιολογίας περισσότερο.

Να ευχαριστήσω επίσης την Καθηγήτρια κα. Ισιδώρα Παपाσιδέρη και τον Καθηγητή κ. Ευάγγελο Τέρπο, πρώτον για την τιμή που μου έκαναν να είναι μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, καθώς και για τη γνώση και τη βοήθεια που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια.

Ομοίως, ευχαριστώ όλα τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ανδρέα Σκορίλα, την Καθηγήτρια κα. Ουρανία Τσιτσιλώνη, τον Αν. Καθηγητή κ. Ευστάθιο Καστρίτη και την Αν. Καθηγήτρια κα. Παναγούλα Κόλλια για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην κρίση της ΔΔ μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Μελέτιο Α. Δημόπουλο και την ερευνητική του ομάδα (Τομέας Παθολογίας, Εργαστήριο Κλινικής Θεραπευτικής Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ/Π.Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα») για την άψογη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της ΔΔ. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Αν. Καθηγητή κ. Ευστάθιο Καστρίτη και τη μετα-διδακτορική ερευνήτρια Δρ. Τίνα Μπαγκρατούνη (Τομέας Παθολογίας, Εργαστήριο Κλινικής Θεραπευτικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ/Π.Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα») για τις χρήσιμες συμβουλές τους καθώς και την καθοριστική βοήθειά τους στο κομμάτι που αφορούσε στους ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα, για τη στατιστική επεξεργασία και το διαχωρισμό των δειγμάτων αντίστοιχα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη τον Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη (Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ) και την Αν. Καθηγήτρια κα. Ιωάννα Ανδρεάδου (Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ) για την αгаστή συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια και συνεχίζουμε να έχουμε.

Να ευχαριστήσω τον Professor Manfred Frasch (Department Biologie, Division of Developmental Biology, Friedrich-Alexander University of Erlangen-Nürnberg, Germany) και τον Professor Gabor Juhasz (Department of Anatomy, Cell and Developmental Biology of the Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary) για την προσφορά των διαγωνιδιακών

στελεχών που αφορούν στο στέλεχος «οδηγό» Gal4^{Tinc} και Lamp1^{GFP}, τα οποία ήταν άκρως σημαντικά στη διεκπεραίωση της παρούσας ΔΔ.

Να ευχαριστήσω επίσης τον Associate Professor Gabor Juhasz για μία ακόμη σημαντική προσφορά, αυτή του αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης ref(2)P/p62.

Ευχαριστώ ακόμη και την Assistant Professor Karen Occor (Development, Neuroscience and Aging Research Center, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute) για τη σημαντική βοήθειά της στη διεξαγωγή των πειραμάτων που αφορούν στη μελέτη της καρδιάς.

Επίσης ευχαριστώ από την καρδιά μου τη Ελένη Τσακίρη για τη βοήθεια και τη γνώση που μου μετέφερε στην αρχή ιδιαίτερα της Διατριβής μου καθώς και για την ηθική της στήριξη. Ομοίως ευχαριστώ θερμά τη Sentiljana Gumeni για τις γνώσεις που μου παρείχε ιδιαίτερα σε θέματα συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης αλλά και όχι μόνο, καθώς και για τις συζητήσεις μας και τις πολύτιμες συμβουλές της. Κυρίως όμως την ευχαριστώ για τη στήριξή της όλο αυτό το διάστημα και τη συνεχή ώθηση της να προχωρήσω και να εξελιχθώ.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στη φίλη και συνοδοιπόρο μου σε αυτό το ταξίδι, υποψήφια διδάκτορα Αιμιλία Σκληρού. Ήταν δίπλα μου σε όλες τις ανησυχίες, στις χαρές και τις λύπες μου, τόσο στο επιστημονικό όσο και στο προσωπικό κομμάτι.

Τέλος, να ευχαριστήσω για άλλη μια φορά τον Διευθυντή του Τομέα και επιβλέποντα της ΔΔ, Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκο, όλα τα μέλη του Τομέα, καθώς και όλα τα παιδιά που συνυπήρξαμε στον ίδιο χώρο και διατηρήσαμε ένα πολύ καλό και ευχάριστο κλίμα. Ιδιαίτερα, ευχαριστώ τον Επίκ. Καθηγητή κ. Δημήτριο Στραβοπόδη, τον Αθανάσιο Βελέτζα και την υποψήφια διδάκτορα Σταματία Καταραχιά για τη βοήθειά τους, όποτε τη χρειάστηκα.

Κλείνοντας ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα τωρινά μέλη της ερευνητικής ομάδας «Μοριακής-Κυτταρικής γήρανσης και καρκινογένεσης»: Sentiljana Gumeni, Σκληρού Αιμιλία, Χειμωνίδη Χριστίνα, Ευαγγελάκου Ζωή, Μανολά Μαρία, Γιαννιού Δέσποινα, Ραφελέτου Αλεξάνδρα, Λάμπρου Μαρία.

Επίσης ευχαριστώ τα παλαιότερα μέλη της ομάδας μας: Τσακίρη Ελένη, Sesti Fabiola, Νηφόρου Κατερίνα, Ταλλά Κώστα, Μηνάγια Μαρία, Λιάκη Βίκυ, Ηλιάκη Πόπη, Χατζηγεωργίου Σοφία, Φανίδη Διονύση.

Τους ευχαριστώ θερμά για το υπέροχο κλίμα συνεργασίας και φιλίας που είχαμε και έχουμε όλο αυτό το διάστημα. Μέσα από τις συζητήσεις και όλες τις όμορφες και άσχημες στιγμές που ζήσαμε, διδάχθηκα πως είναι να λειτουργείς σαν ομάδα και όχι σα μονάδα.

*Το τελευταίο ευχαριστώ στον αγαπημένο μου Στέργιο, στους γονείς μου, τον αδερφό μου, και όλους μου τους φίλους. Σε αυτούς τους ανθρώπους που με στήριξαν και μου έδωσαν την ευκαιρία, τη δύναμη και την ελευθερία να προσπαθώ να κάνω τα όνειρά μου πραγματικότητα. **Αφιερώνω λοιπόν αυτή τη δουλειά σε εκείνους.***

Παπανάγνου Ελένη-Δήμητρα

Ιούλιος 2019.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	17
ABSTRACT	25
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	31
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	35
1.1 Το δίκτυο πρωτεόστασης.	37
1.1.1 Οι συνέπειες της απορρύθμισης του δικτύου πρωτεόστασης	38
1.2 Οι δύο κύριοι πρωτεολυτικοί μηχανισμοί	39
1.2.1 Το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος	39
1.2.1.1 Οι αυτοφαγικές πρωτεΐνες ρυθμίζουν τη βιογένεση του αυτοφαγosώματος	41
1.2.1.2 Ειδικές μορφές αυτοφαγίας, μιτοφαγία	42
1.2.1.3 Ισορροπία μεταξύ βιογένεσης μιτοχondρίων-μιτοφαγίας	43
1.2.2 Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος	43
1.2.2.1 Τα ένζυμα του συστήματος ουβικιτίνης	44
1.2.2.2 Το πρωτεάσωμα	45
1.2.2.3 Το 20S καταλυτικό κέντρο	46
1.2.2.4 Το 19S ρυθμιστικό τμήμα	47
1.2.2.5 Εναλλακτικές μορφές του πρωτεασώματος	47
1.2.2.6 Η μεταγραφική ρύθμιση του πρωτεασώματος	48
1.3 Πρωτεοτοξικό στρες, μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και καρκίνος	49
1.4 Μηχανισμός δράσης των πρωτεασωμικών αναστολέων	51
1.5 Το πολλαπλούν μύελωμα	51
1.5.1 Παθογένεια και στάδια της νόσου	53
1.5.2 Πρωτεασωμική αναστολή στα πλάσματοκύτταρα και στα μυελωματικά κύτταρα	54
1.6 Πρωτεασωμικοί αναστολείς στη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος	56
1.6.1 Βορτεζομίπη (Bortezomib, BTZ)	56
1.6.2 Καρφιλζομίπη (Carfilzomib, CFZ)	58
1.6.3 Οι παρενέργειες της χορήγησης του Bortezomib και Carfilzomib στην κλινική	59
1.6.3.1 Οι σημαντικότερες παρενέργειες της χορήγησης του Bortezomib	59
1.6.3.2 Οι σημαντικότερες παρενέργειες της χορήγησης του Carfilzomib	60
1.6.3.3 Καρδιοτοξικότητα, σύγκριση των δύο αναστολέων	60
1.6.3.4 Πρωτεάσωμα και πρωτεοτοξικό στρες στα καρδιομυοκύτταρα	61
1.6.3.5 Καρδιοπροστατευτικές στρατηγικές στη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος	63
1.7 Μετφορμίνη (Metformin, MET)	63
1.7.1 Η δράση της Μετφορμίνης	64
1.7.2 Ο πιθανός καρδιοπροστατευτικός ρόλος της Μετφορμίνης	65

1.7.3 Η Μετφορμίνη ενεργοποιεί την AMPK	65
1.7.3.1 Η AMPK στις καρδιαγγειακές νόσους	66
1.7.3.2 Η AMPK μειώνει το οξειδωτικό στρες στον ενδοθηλιακό ιστό	66
1.7.3.3 Η AMPK ενεργοποιεί την αυτοφαγία στα καρδιομυοκύτταρα	67
1.7.3.4 Η AMPK προστατεύει τα καρδιομυοκύτταρα από την απόπτωση	67
2. ΣΚΟΠΟΣ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ	69
2.1 Σκοπός	71
2.2 Κυτταρικοί τύποι	72
2.2.1 Ερυθροκύτταρα, ΕΚ	72
2.2.2 Μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος, ΜΚΠΑ	72
2.3 Το έντομο <i>Drosophila melanogaster</i>	72
2.3.1 Φυσιολογική ανάπτυξη της <i>Drosophila</i>	73
2.3.1.1 Ωογένεση	74
2.3.1.2 Εμβρυογένεση	75
2.3.1.3 Στάδια της προνύμφης	75
2.3.2 Το ενήλικο άτομο	75
2.3.2.1 Το κυκλοφορικό σύστημα του εντόμου	76
2.3.2.2 Η αιμολémie	77
2.3.2.3 Ο καρδιακός ιστός του ενήλικου εντόμου <i>Drosophila melanogaster</i>	78
2.3.2.4 Οι τύποι κυττάρων που συνιστούν την καρδιά του εντόμου	78
2.3.2.5 Τα καρδιομυοκύτταρα	79
2.3.2.6 Τα όστια	80
2.3.2.7 Οι ενδοκαρδιακές βαλβίδες	81
2.3.2.8 Οι πλευρικοί μύες (Alary muscles)	82
2.3.2.9 Τα περικαρδιακά κύτταρα	82
2.3.2.10 Οι επιμήκεις κοιλιακοί μύες	83
2.3.2.11 Συνδετικός ιστός-ECM	83
2.3.2.12 Επιπρόσθετες καρδιές (Accessory Hearts)	83
2.3.2.13 Ο καρδιακός παλμός στη <i>Drosophila</i>	84
2.3.2.14 Σύγκριση της καρδιάς της <i>Drosophila</i> και των χορδωτών	85
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	89
3.1 Υλικά	91
3.1.1 Μηχανήματα	91
3.1.2 Χημικά αντιδραστήρια	92
3.1.3 Αντισώματα	94
3.1.4 Real-Time PCR εκκινητές (Real-Time PCR primers)	95
3.1.5 Διαγονιδιακά στελέχη <i>Drosophila melanogaster</i>	98
3.1.6 Η τροφή των εντόμων	101

3.1.7 Διαλύματα	101
3.2 Μέθοδοι	104
3.2.1 Διαχωρισμός κυττάρων του αίματος	105
3.2.2 Ανατομία καρδιακού ιστού σε έντομα <i>Drosophila melanogaster</i>	105
3.2.3 Απομόνωση ολικού RNA	105
3.2.4 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, Q-RT PCR)	106
3.2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	106
3.2.6 Απομόνωση πρωτεασωμάτων και καταγραφή των τριών ενζυμικών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων	107
3.2.7 SDS-PAGE-Ανοσοσύπωμα Western	107
3.2.8 Ανίχνευση οξειδωμένων πρωτεϊνών (OxyBlot)	108
3.2.9 Έλεγχος της κινητικότητας των εντόμων (νευρομυϊκή δραστηριότητα)	109
3.2.10 Έλεγχος της βιωσιμότητας των εντόμων	109
3.2.11 Μέτρηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS assay)	109
3.2.12 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των καθεψινών B και L	110
3.2.13 Απομόνωση μιτοχονδρίων από σωματικούς ιστούς των εντόμων	110
3.2.14 Μέτρηση της μιτοχονδριακής αναπνοής	110
3.2.15 Απομόνωση ημι-άθικτου καρδιακού ιστού και οπτικοποίηση καρδιακού παλμού σε ενήλικα έντομα.	111
3.2.16 Χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης (Confocal Laser Scanning Microscopy-CLSM)	112
3.2.17 Μελέτη των πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων του εντόμου	112
3.2.18 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	112
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	115
4.1 Οι βασικές ενεργότητες πρωτεασώματος σε ΜΚΠΑ και ΕΚ από υγιείς δότες χαρακτηρίζονται από σημαντική μεταβλητότητα και μείωση κατά τη διάρκεια της γήρανσης	117
4.2 Η απόκριση στη θεραπεία με Bortezomib ή Carfilzomib παρουσίασε εξάρτηση από τον ασθενή	120
4.3 Η ρύθμιση των στοιχείων πρωτεόστασης στα κύτταρα του περιφερικού αίματος έδειξε σημαντικές συσχετίσεις με τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα που έλαβαν Bortezomib ή	

Carfilzomib	131
4.4 Η γήρανση οδήγησε σε πρωτεωμική αστάθεια με μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στον καρδιακό ιστό εντόμων <i>Drosophila melanogaster</i> και καρδιακή δυσλειτουργία	132
4.5 Η στοχευμένη καταστολή της έκφρασης των υπομονάδων β1 και β5 του 20S πρωτεασώματος στον καρδιακό ιστό, οδήγησε σε μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος προκαλώντας διαταραχές στην ανάπτυξη	134
4.6 Η μειορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των υπομονάδων β1 και β5, μέσω RNAi στον καρδιακό ιστό, επέδρασε στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος	136
4.7 Η στοχευμένη καταστολή της γονιδιακής έκφρασης των υπομονάδων β1 και β5, στον καρδιακό ιστό, προκάλεσε μιτοχονδριακή και καρδιακή δυσλειτουργία, μειώνοντας το προσδόκιμο ζωής των εντόμων	137
4.8 Η γονιδιακή έκφραση και τα επίπεδα ουβικιτινωμένων/ οξειδωμένων πρωτεϊνών των εντόμων με μειωμένη γονιδιακή έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων β1, β5 στον καρδιακό ιστό	140
4.9 Η υπερέκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a/LC3 σε υπόβαθρο <i>Prosβ5^{RNAi}</i> στοχευμένα στον καρδιακό ιστό βελτίωσε την ανάπτυξη και τον ρυθμό εκκόλαψης των εντόμων	143
4.10 Η υπερέκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a σε υπόβαθρο <i>Prosβ5^{RNAi}</i> αύξησε την ενεργότητα των λυσοσωμικών καθεψινών, αυξάνοντας το συνολικό αριθμό των λυσοσωμάτων στον καρδιακό ιστό	144
4.11 Η υπερέκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a σε υπόβαθρο <i>Prosβ5^{RNAi}</i> βελτίωσε τον φαινότυπο της καταστολής της β5 στον καρδιακό ιστό	145
4.12 Η παρατεταμένη έκθεση εντόμων σε πρωτεασωμικούς αναστολείς προκαλεί σοβαρές επιπτώσεις στη φυσιολογική λειτουργία της καρδιάς	148
4.13 Η Μετφορμίνη επάγει το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος και αυξάνει την ενεργότητα των λυσοσωμικών καθεψινών	150
4.14 Η Μετφορμίνη βελτιώνει την κινητική ικανότητα και την καρδιακή λειτουργία των εντόμων	153
4.15 Η μείωση της συγκέντρωσης της Μετφορμίνης δεν επηρέασε τη επίδρασή της στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος	154
4.16 Η επαγωγή του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος μείωσε την πρωτεωμική αστάθεια στον καρδιακό ιστό των εντόμων αυξάνοντας το προσδόκιμο ζωής τους	156
4.17 Η Μετφορμίνη επάγει τη βιογένεση των μιτοχονδρίων και βελτιώνει τη μιτοχονδριακή και καρδιακή λειτουργία σε <i>W¹¹¹⁸</i> έντομα στα οποία χορηγούνται πρωτεασωμικοί αναστολείς	158
4.18 Η χορήγηση Ραπαμυκίνης σε <i>W¹¹¹⁸</i> έντομα που λαμβάνουν πρωτεασωμικούς αναστολείς βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία	159
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	163
6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	175

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΑΚΡΟΒΙΟΤΗΤΑΣ	193
8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ	197
9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ: ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	201
10. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV: ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ	211

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ομοιοστάση του πρωτεώματος (πρωτεόσταση) είναι κρίσιμη για την κυτταρική λειτουργικότητα και συνεπώς για την υγεία του οργανισμού. Για τη διατήρηση της πρωτεόστασης, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα ολοκληρωμένο σύστημα που εξασφαλίζει τον έλεγχο ποιότητας του πρωτεώματος, το λεγόμενο δίκτυο πρωτεόστασης. Βασικά στοιχεία του δικτύου αυτού είναι η πρωτεϊνόςύνθεση, το σύστημα απόκρισης σε μη σωστό δίπλωμα πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου και των μιτοχονδρίων, ένα σύνολο εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μοριακών συνοδών, οι κυτταρικές πρωτεάσες, καθώς και τα δύο κύρια πρωτεολυτικά συστήματα, δηλαδή το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και το σύστημα αυτοφαγίας-λυσosώματος. Αυτό το δίκτυο πολύπλοκων πρωτεϊνικών μηχανών εγγυάται τη φυσιολογική λειτουργία του πρωτεώματος και την ανακύκλωση των μη λειτουργικών πολυπεπτιδίων, ανταποκρινόμενο σε καταστάσεις πρωτεοτοξικού στρες.

Αρκετά στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν υψηλή εξάρτηση από τους μηχανισμούς πρωτεόστασης συμπεριλαμβανομένου και του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Το πολλαπλούν μυέλωμα, μια κλασική νόσος πρωτεωμικής αστάθειας, αποτελεί μια αιματολογική κακοήθεια που προκύπτει από το μετασχηματισμό των Β-λεμφοκυττάρων σε κλώνο παθολογικών πλασματοκυττάρων, τα οποία συσσωρεύονται στο μυελό των οστών και εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες μονοκλωνικής ανοσοσφαιρίνης (IgG). Μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική προσέγγιση είναι αυτή της στόχευσης του πρωτεασώματος με τη χρήση διαφόρων αναστολέων έναντι αυτού. Οι αναστολείς πρωτεασώματος όπως το Bortezomib (BTZ) και το Carfilzomib (CFZ) είναι μικρά μόρια τα οποία προσδένονται στις καταλυτικές υπομονάδες του πρωτεασώματος και έτσι αναστέλλουν τη φυσιολογική του λειτουργία. Η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος οδηγεί στη συσσώρευση μη διπλωμένων πρωτεϊνών και έχει ως αποτέλεσμα τον αποπτωτικό θάνατο των μυελωματικών κυττάρων δεδομένης του «εθισμού» τους σε υψηλές πρωτεασωμικές ενεργότητες.

Οι αναστολείς πρωτεασώματος παρόλο που έχουν βελτιώσει σημαντικά την ολική επιβίωση των ασθενών που πάσχουν από πολλαπλούν μυέλωμα, εμφανίζουν σοβαρές παρενέργειες όπως περιφερική νευροπάθεια και καρδιοτοξικότητα επηρεάζοντας αρνητικά την ποιότητα ζωής των ασθενών και τις καθημερινές δραστηριότητές τους.

Οι σοβαρές καρδιακές επιπλοκές που επιφέρει η θεραπεία με πρωτεασωμικούς αναστολείς, έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη στρατηγικών καρδιοπροστατευτικής δράσης, οι οποίες είναι υπό εξέταση σε προκλινικές μελέτες και περιλαμβάνουν τη συγχορήγηση του θεραπευτικού αναστολέα με άλλα μόρια όπως η δεξαζοζάνη. Η Μετφορμίνη (MET), είναι

ένας αντι-υπεργλυκαιμικός παράγοντας που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 και έχει φανεί πως ασκεί καρδιοπροστατευτική δράση συνδυαζόμενη με χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή αφορά στη μελέτη των μεταβολών της ενεργότητας του πρωτεασώματος σε κύτταρα περιφερικού αίματος κατά τη γήρανση καθώς και στην κατανόηση της μοριακής βάσης και ρύθμισης των λειτουργικών μονάδων πρωτεόστασης (πρωτεάσωμα) σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα μετά από θεραπεία με πρωτεασωμικούς αναστολείς. Επίσης μέρος της εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της ρύθμισης του πρωτεασώματος κατά τη γήρανση στον καρδιακό ιστό, ως οργανισμός μοντέλο για τις συγκεκριμένες μελέτες επιλέχθηκε η *Drosophila melanogaster*. Στο ίδιο σύστημα μελετήθηκε η επίδραση της μερικής πρωτεασωμικής αναστολής στην καρδιακή λειτουργία καθώς η καρδιοτοξικότητα αποτελεί όπως αναφέρθηκε σημαντική παρενέργεια των πρωτεασωμικών αναστολέων. Επίσης θεματική περιοχή της παρούσας εργασίας αποτελεί η ανάδειξη θεραπευτικών παρεμβάσεων για τη μείωση της καρδιοτοξικότητας, η οποία σχετίζεται με τη μερική αναστολή της πρωτεασωμικής λειτουργίας στον καρδιακό ιστό.

Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι η πρωτεασωμική ενεργότητα μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (ΜΚΠΑ) υγιών δοτών, κυμαίνεται σε υψηλότερα επίπεδα από την αντίστοιχη των ερυθροκυττάρων (ΕΚ). Παράλληλα, όπως και στη *Drosophila melanogaster* (σωματικός ιστός), διαπιστώθηκε ότι οι πρωτεασωμικές ενεργότητες μειώνονται κατά τη γήρανση, ενώ τα επίπεδα ουβικιτινιωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών αυξάνονται και στα δύο είδη κυττάρων. Επιπρόσθετα, μελέτες σε κύτταρα ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα στους οποίους χορηγήθηκε CFZ ή BTZ έδειξαν μείωση των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων στους περισσότερους ασθενείς, με τα ΕΚ να είναι περισσότερο ευαίσθητα. Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου έδειξε πως η πρωτεασωμική αναστολή οδήγησε σε επαγωγή της έκφρασης πρωτεοστατικών γονιδίων όπως πρωτεασωμικών, μοριακών συνοδών, αυτοφαγίας και αντιοξειδωτικής απόκρισης. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση χρησιμοποιώντας συντελεστές συσχέτισης Spearman και Pearson προκειμένου να ελεγχθούν οι σχέσεις μεταξύ διαφόρων παραμέτρων και κλινικών δεδομένων. Βρέθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TXNRD1* (αντιοξειδωτική απόκριση), *HSP27/HSPB1* (μοριακή συνοδός), *HDAC6*, *p62/SQSTM1* (απομάκρυνση συσσωματωμάτων/αυτοφαγίας) συσχετίζονται αρνητικά με την ελεύθερη νόσου περίοδο επιβίωσης (PFS) των ασθενών.

Ακολούθως εξετάσθηκε η συμμετοχή της γήρανσης και της πρωτεωμικής αστάθειας που αυτή επιφέρει, στην καρδιακή λειτουργία εντόμων *Drosophila melanogaster*.

Συγκεκριμένα, μελετήσαμε νεαρά και γηρασμένα έντομα ηλικίας 15-18 και 50-53 ημερών αντίστοιχα και διαπιστώθηκε πως η αύξηση της ηλικίας οδήγησε σε μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης στον καρδιακό ιστό. Η μείωση αυτή της πρωτεασωμικής ενεργότητας και η πρωτεωμική αστάθεια που προκλήθηκε από τη γήρανση προκάλεσε καρδιακή δυσλειτουργία. Ειδικότερα ο καρδιακός χτύπος μειώθηκε, ενώ εμφανίσθηκε ιδιαίτερα άρρυθμος στα γηρασμένα έντομα χωρίς να επηρεασθεί όμως ο αριθμός των μιτοχονδρίων των καρδιομυοκυττάρων. Όσον αφορά στη μελέτη της πρωτεασωμικής αναστολής στην καρδιακή λειτουργία εντόμων *Drosophila melanogaster*, διαπιστώθηκε πως η στοχευμένη πρωτεασωμική αναστολή στον καρδιακό ιστό εντόμων μέσω αποσιώπησης RNAi της β1 και β5 πρωτεασωμικής υπομονάδας με γενετικό τρόπο, μείωσε την πρωτεασωμική ενεργότητα και προκάλεσε διαταραχές στην ανάπτυξη, τη μιτοχονδριακή και καρδιακή λειτουργία, μειώνοντας παράλληλα το προσδόκιμο ζωής και την κινητικότητα των εντόμων. Για να καταστεί πιο ήπιος ο παραπάνω φαινότυπος δημιουργήθηκαν διπλά διαγονιδιακά έντομα τα οποία παρουσιάζουν στοχευμένα στην καρδιά μειωμένη έκφραση της β5 πρωτεασωμικής υπομονάδας και ταυτόχρονη υπερέκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a. Οι μελέτες μας έδειξαν ότι τα *Prosβ5^{RNAi}*, *Atg8a^{OE}* έντομα εμφάνισαν βελτιωμένη ανάπτυξη, κινητική ικανότητα, προσδόκιμο ζωής, καρδιακή και μιτοχονδριακή λειτουργία σε σύγκριση με τα έντομα *Prosβ5^{RNAi}*.

Σε συμφωνία με τα παραπάνω βρέθηκε ότι η παρατεταμένη χορήγηση (14 ημέρες) CFZ (50μM και 75μM) ή BTZ (1μM και 5μM) σε έντομα προκαλεί σημαντική καρδιοτοξικότητα, με εμφάνιση αρρυθμίας και μείωση του αριθμού των καρδιακών παλμών. Η χορήγηση και των δύο αναστολέων επέφερε μείωση στον αριθμό των μιτοχονδρίων των καρδιομυοκυττάρων, καθώς και αλλοίωση στη μορφολογία τους, ενώ αύξησε τον αριθμό των ουβικιτινιωμένων/οξειδωμένων πρωτεϊνών στον καρδιακό ιστό.

Επιπρόσθετα, εξετάσθηκε αν η MET (επαγωγέας της αυτοφαγίας μέσω ενεργοποίησης AMPK και μόριο με πιθανή καρδιοπροστατευτική δράση) μετά από συνδυαστική χορήγηση με πρωτεασωμικούς αναστολείς δύναται να βελτιώσει την καρδιακή και μιτοχονδριακή λειτουργία. Έπειτα από την εξέταση διαφόρων συγκεντρώσεων επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 1mM και 5mM. Εν συνεχεία, βρέθηκε ότι η χορήγηση MET για χρονικό διάστημα 14 ημερών (5mM) βελτίωσε την καρδιακή λειτουργία, τον αριθμό των μιτοχονδρίων στα καρδιομυοκύτταρα, μείωσε τα επίπεδα ROS και αύξησε τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a. Επίσης, βελτίωσε την κινητική ικανότητα μόνο των εντόμων στα οποία χορηγήθηκε μαζί με το BTZ, ενώ αντίθετα δε βελτίωσε το προσδόκιμο ζωής των εντόμων. Η χορήγηση MET σε μικρότερη

συγκέντρωση (1mM) βελτίωσε εξίσου την καρδιακή και μιτοχονδριακή λειτουργία, μείωσε τα επίπεδα των ROS και των ουβικιτινωμένων/οξειδωμένων πρωτεϊνών, ενώ αύξησε επίσης τον αριθμό και την ενεργότητα των λυσοσωμάτων σε αγρίου τύπου W^{1118} έντομα στα οποία συγχορηγήθηκε μαζί με CFZ ή BTZ. Όσον αφορά στην κινητική ικανότητα των εντόμων στην περίπτωση συγχορήγησης με το BTZ η MET άσκησε θετική δράση.

Ακολούθως, για να εξετάσουμε εάν το μονοπάτι αυτοφαγίας είναι αυτό που εμπλέκεται στη βελτίωση του έντονου φαινοτύπου που προκαλεί η χορήγηση πρωτεασωμικών αναστολέων μελετήσαμε έναν ακόμη επαγωγέα της αυτοφαγίας. Ειδικότερα, χορηγήσαμε σε έντομα W^{1118} , που έλαβαν θεραπευτικό πρωτεασωμικό αναστολέα, 100μM Ραπαμυκίνη (RAP) και είδαμε βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας καθώς και επαγωγή της βιογένεσης μιτοχονδρίων, υποδεικνύοντας έτσι τον καρδιοπροστατευτικό ρόλο της αυτοφαγίας σε καταστάσεις πρωτεωμικής αστάθειας όπως αυτής που προκαλείται από πρωτεασωμικούς αναστολείς. Αξίζει να σημειωθεί ότι ούτε η MET αλλά ούτε και η RAP επηρέασαν την ανασταλτική δράση του CFZ ή του BTZ στο πρωτεάσωμα.

Συνοψίζοντας, παρατηρήθηκε μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας κατά το γήρας σε κύτταρα του περιφερικού αίματος. Η επίδραση των πρωτεασωμικών αναστολέων στα ΜΚΠΑ οδήγησε στην αύξηση της έκφρασης πρωτεοστατικών γονιδίων στους περισσότερους ασθενείς, πιθανώς προκειμένου το κύτταρο να εξισορροπήσει τη δυσλειτουργία του πρωτεασώματος (δίκτυο ανάδρασης). Παρά τη θεραπεία με αναστολείς πρωτεασώματος, τα ΜΚΠΑ, αλλά και τα ΕΚ, κάποιων ασθενών παρουσίασαν αυξημένες πρωτεασωμικές ενεργότητες. Στην περίπτωση των ΜΚΠΑ οι αποκρίσεις αυτές μπορεί να σχετίζονται με μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης. Η αύξηση της πρωτεασωμικής ενζυμικής ενεργότητας στα ΕΚ (απύρνα κύτταρα) ενδεχομένως αποδίδεται στη σύνθεση περισσότερων νέων ΕΚ από το μυελό των οστών (αυξημένη αιμοποίηση).

Είδαμε επίσης πως ο γηρασμένος καρδιακός ιστός χαρακτηρίζεται από μειωμένη πρωτεασωμική ενεργότητα και αυξημένη πρωτεωμική αστάθεια καθώς και καρδιακή δυσλειτουργία πιθανώς εξαιτίας της διαταραχής του δικτύου πρωτεόστασης. Ακολούθως παρατηρήσαμε πως οι πρωτεασωμικές υπομονάδες β1 (ενεργότητα κασπάσης) αλλά κυρίως η β5 (ενεργότητα χυμοθρυψίνης) είναι βασικές για την ανάπτυξη των εντόμων *Drosophila melanogaster* πιθανότατα εξαιτίας της καρδιακής δυσλειτουργίας και της δυσκολίας στη μετακίνηση θρεπτικών στοιχείων στους ιστούς. Η αποσιώπηση των συγκεκριμένων υπομονάδων προκαλεί σημαντικό πρωτεοτοξικό στρες στον καρδιακό ιστό και διαταραχή της μιτοχονδριακής λειτουργίας οδηγώντας σε καρδιακή δυσλειτουργία. Η

υπερέκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a σε υπόβαθρο β5 RNAi μειώνει το πρωτεοτοξικό στρες στην καρδιά, και επάγει τη βιογένεση των μιτοχονδρίων μέσω επαγωγής του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος και της ήπιας αποκατάστασης της μιτόστασης. Σε συμφωνία με τα παραπάνω ευρήματα, η παρατεταμένη έκθεση εντόμων είτε σε CFZ είτε σε BTZ προκάλεσε πρωτεωμική αστάθεια, με σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργία των μιτοχονδρίων αλλά και της καρδιάς προκαλώντας αρρυθμία καθώς και μείωση του καρδιακού χτύπου. Η χορήγηση MET (αλλά και RAP) οδήγησε σε βελτίωση του φαινοτύπου που προκλήθηκε από τους πρωτεασωμικούς αναστολείς και στην περίπτωση αυτή μέσω επαγωγής του μονοπατιού της αυτοφαγίας-λυσosώματος. Συμπερασματικά, η λειτουργία των μιτοχονδρίων και κατ' επέκταση της καρδιάς πιθανότατα ρυθμίζεται (μεταξύ άλλων) από την ισορροπία μεταξύ βιογένεσης μιτοχονδρίων και μιτοφαγίας, μιας διαδικασίας μέσω της οποίας τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια υποβάλλονται σε αυτοφαγική αποικοδόμηση.

ABSTRACT

ABSTRACT

The integrity of proteome homeodynamics (or proteostasis) is critical for cell homeostasis and viability. Thus, organisms have developed several defense mechanisms in order to inspect the basal functionality and structure of cellular biomolecules and hence avoid proteotoxic stress. The maintenance of proteome functionality and stability along with the clearance of proteome damage are orchestrated by a highly integrated modular system, which is called the proteostasis network. Key elements of this network are the protein synthesis, sorting and trafficking modules, the endoplasmic reticulum unfolded protein response, the molecular chaperones and the two main degradation pathways, namely the ubiquitin-proteasome pathway and the autophagy-lysosome pathway. A wide body of evidence indicates that cancer cells are highly dependent on the increased expression of proteostatic modules, including the ubiquitin-proteasome pathway.

Multiple myeloma, a typical proteome instability disease, is a hematologic malignancy that results from B lymphocytes transformation into a clone of pathological plasma cells which accumulate and secrete large amounts of monoclonal immunoglobulins (IgGs). A promising therapeutic approach employs specific inhibitors against 20S proteasome activities. Specifically, proteasome inhibitors such as Bortezomib (BTZ) and Carfilzomib (CFZ) are small molecules that were developed against the $\beta 5$ catalytic (chymotrypsin-like) subunit of the proteasome. Proteasome dysfunction due to cell exposure to proteasome inhibitors leads to the progressive accumulation of unfolded proteins in myeloma cells and increased (vs. normal cells) toxicity.

Despite the fact that proteasome inhibitors have improved significantly overall survival of multiple myeloma patients, severe side effects such as peripheral neuropathy and cardiotoxicity adversely affect life quality of patients. Consequently, the serious cardiovascular complications caused by treatment with proteasome inhibitors have led to the development of cardioprotective strategies many of which are currently studied in preclinical studies (e.g. proteasome inhibitors combined with other molecules such as dexrazoxane).

Metformin (MET) is a first-line medication for the treatment of type 2 diabetes and has been shown to exert likely cardioprotective properties especially when combined with chemotherapeutic agents.

Herein, we investigated proteasome activity levels in peripheral blood cells during aging, as well as the molecular basis and regulation of proteasome functional units in multiple myeloma patients following treatment with proteasome inhibitors. We also studied

the regulation of proteasome during aging in cardiac tissue using *Drosophila melanogaster* as a model organism. The effect of targeted partial proteasome inhibition on the cardiac tissue and function was also examined, as cardiotoxicity is a significant side effect of proteasome inhibitors.

In healthy donors we found that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) express higher, as compared to red blood cells (RBCs) basal proteasome activities, as well as that proteasome activities decline during aging. Studies in cells isolated from multiple myeloma patients treated with proteasome inhibitors revealed that in most (but, interestingly enough, not all) patients, proteasome activities decline in both cell types during therapy. In PBMCs, most proteostatic genes expression patterns showed a positive correlation during therapy indicating that proteostasis network modules likely respond to proteasome inhibition as a functional unit. Finally, the expression levels of specific antioxidant, chaperone and aggresomes removal/autophagy genes were found to inversely associate with patients' overall survival.

Proteome instability, as a result of aging was also examined in heart of *Drosophila* flies. In particular, young and old flies of 15-18 and 50-53 days old respectively, were studied. We observed that aging led to a significant reduction of the main chymotrypsin-like (CT-L) proteasomal activity in heart tissue. Moreover, we noticed that the decreased levels of proteasome activity during aging led to cardiac dysfunction. On the other hand, aging did not affect mitochondrial number in cardiomyocytes, as compared to readouts after administration of proteasome inhibitors.

Subsequently, we studied heart functionality following knock down (KD) of the $\beta 1$ (C-L activity) and $\beta 5$ (CT-L activity) proteasomal subunits specifically in flies' heart tube. We found that RNAi-mediated suppression of either $\beta 5$ or $\beta 1$ 20S proteasomal subunits led to significant reduced proteasome activities and caused severe developmental disorders, as well as mitochondrial and cardiac dysfunction. We also noted reduced healthspan/lifespan and climbing activity in *Pros $\beta 1$ ^{RNAi}* and *Pros $\beta 5$ ^{RNAi}* flies.

In order to alleviate the proteasome genes KD-mediated toxic effects, we sought to over-express autophagic protein Atg8a/LC3 in a *Pros $\beta 5$ ^{RNAi}* background specifically in the heart tissue. We noticed that *Pros $\beta 5$ ^{RNAi}*, *Atg8a^{OE}* flies showed improved growth, locomotion, lifespan, heart rate and mitochondrial function as compared to *Pros $\beta 5$ ^{RNAi}* insects.

Next, we exposed *Drosophila* flies for 14 days to CFZ at concentrations of 50 μ M and 75 μ M CFZ or BTZ at concentrations of 1 μ M and 5 μ M (comparable inhibition). According to our findings both inhibitors caused cardiotoxicity in the fly model. This effect was

manifested by bradycardia and/or arrhythmia and likely relates to reduced mitochondria number, as well as to significant disruption of mitochondrial structure and respiration machineries functionality. We further observed accumulation of proteome instability in flies' hearts as shown by increased levels of ubiquitinated/oxidized proteins.

Next, we studied MET (an autophagy inducer via AMPK activation) for possible cardioprotective properties against proteasome inhibitors cardiotoxic effects. After testing a wide range of concentrations, we selected 1mM and 5mM concentrations. Firstly autophagy induction in heart tissues was confirmed after MET administration. In line with our observations in the genetic model (over-expression of a main autophagic module) induction of the autophagy-lysosome pathway by MET (5mM) administration in flies, that were in parallel exposed to proteasome inhibitors, led to improved cardiac function, increased number of mitochondria in cardiomyocytes and reduced ROS levels in the heart tissue. We also found that at this concentration MET addition in flies' culture medium parallel to BTZ ameliorated the BTZ-induced severe reduction in flies' climbing (neuromuscular) activity; a phenotype that recapitulates the peripheral neuropathy seen in the clinic.

Similarly, addition of 1mM MET improved cardiac and mitochondrial functionality and reduced both ROS levels and accumulation of ubiquitinated/oxidized proteins in heart tissues of W¹¹¹⁸ flies when co-administered with CFZ or BTZ. Administration of MET at the concentration of 1mM parallel to BTZ partially increased flies' lifespan as compared to flies exposed solely to BTZ and improved CFZ treated flies' healthspan. On the other hand, only locomotion of flies exposed to BTZ was improved upon co-administration of 1mM MET as was also found in 5mM MET. The possible implication of the autophagy-lysosome pathway in conferring protection against cardiotoxicity caused by proteasome dysfunction was also investigated following administration of 100µM of Rapamycin (RAP) in W¹¹¹⁸ flies treated with BTZ or CFZ. Likewise MET, we found improvement of the heart tube functionality by induction of both the heartbeat and of mitochondrial biogenesis. Notably, neither MET nor RAP reduced the inhibitory activity exerted by CFZ or BTZ at proteasome.

In conclusion, our observations in multiple myeloma patients largely recapitulate the findings in the fly model indicating that *Drosophila* represents a unique *in vivo* experimental platform for studying proteostatic modules functionality during normal aging and in diseases. Of particular interest is our finding that despite treatment with PIs, the PBMCs, and even more interestingly RBCs, of several patients expressed elevated proteasomal activities during therapy. In the case of PBMCs these responses may relate to gene expression alterations that trigger the over-expression of UPP components in order to surpass the

inhibitory effects of the proteasome inhibitors. In the case of the anucleated RBCs higher proteasome activities may relate to increased clearance of damaged (e.g. prematurely senescent) RBCs via erythrophagocytosis that may lead to bone marrow-mediated increased erythropoiesis or proteasome load in newly produced RBCs.

Our studies in the fly model indicated that aged heart tissue is characterized by significant proteasome activity reduction, accumulation of proteome instability, as well as cardiac dysfunction probably due to proteostasis network disruption. We also observed that $\beta 1$, but mainly $\beta 5$ subunits are essential for developmental stages in *Drosophila* flies, probably due to the fact that heart fails to pump hemolymph, a liquid enriched with hormones, peptide and nutrients, to other tissues. In addition, proteome imbalance caused by proteasome KD specifically in heart led to mitochondrial disorder resulting in cardiac dysfunction. Moreover, over-expression of Atg8a protein in the *Pros $\beta 5$ ^{RNAi}* background reduced proteotoxic stress in heart and induced mitochondrial biogenesis by activation of the autophagy-lysosome pathway and hence mitophagy. Mitophagy as a process aims to degrade damaged mitochondria and restore mitostasis in cells (mitochondrial homeostasis). At the same time, prolonged exposure to either CFZ or BTZ caused in insects' tissues proteome instability, with severe effects on mitochondrial function and consequently on heart, causing arrhythmia and bradycardia. In addition, both MET and RAP administration alleviated the phenotype caused by proteasome inhibitors via induction of autophagy-lysosome pathway. In conclusion, the mitochondrial health and hence heart functionality is (among others) regulated by the interplay between mitochondria biogenesis and mitophagy, a communication which can be disrupted after proteasome dysfunction.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADP	Adenosine Diphosphate Διφωσφορική αδενοσίνη
APS	Ammonium persulphate Υπερθειικό αμμώνιο
Atg8a	Autophagy-related 8a Σχετιζόμενη με αυτοφαγία 8α
ATP	Adenosine Triphosphate Τριφωσφορική αδενοσίνη
BTZ	Bortezomib Βορτεζομίμη
BSA	Bovine serum albumin Αλβουμίνη ορού βοός
cDNA	Complementary DNA Συμπληρωματικό DNA
CFZ	Carfilzomib Καρφιλζομίμη
CH ₃ COOH	Acetic acid Οξικό οξύ
ClCH ₂ COONa	Sodium chloroacetate Χλωροξικό νάτριο
CMA	Chaperone-Mediated Autophagy Αυτοφαγία μέσω μοριακών συνοδών
CncC	cap'n'collar isoform C
CO ₂	Carbon dioxide Διοξείδιο του άνθρακα

DMSO	Dimethylsulfoxid Διμεθυλο-σουλφοξειδίο
DNP	Dinitrophenyl Δινιτροφαινόλη
DTT	Dithiothreitol Διθειοθρεϊτόλη
dH2O	Distilled water Απεσταγμένο νερό
EDTA	Ethylenediamine-tetra-acetic acid Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid Αιθυλενο-γλυκόλη τετραοξικό οξύ
ER	Endoplasmic reticulum Ενδοπλασματικό δίκτυο
GFP	Green Fluoresence Protein Πράσινη Φθρίζουσα πρωτεΐνη
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid N-2-υδροξυαιθυλοπιπεραζινο-N-2-αιθανοσουλφονικό οξύ
KCl	Potassium chloride Χλωριούχο κάλιο
KCN	Potassium cyanide Κυανιούχο κάλιο
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
MET	Metformin Μετφορμίνη
MetOH	Methanol Μεθανόλη

MGUS	Monoclonal gammopathy of undetermined significance/
ΜΓΑΣ	Μονοκλωνική γαμμαπάθεια ακαθόριστης σημασίας
MgCl ₂	Magnesium chloride Χλωριούχο μαγνήσιο
mRNA	Messenger RNA Αγγελιοφόρο RNA
NaCl	Sodium chloride Χλωριούχο νάτριο
NaHCO ₃	Sodium bicarbonate Όξινο ανθρακικό νάτριο
Nonidet P-40 (NP-40)	Non-ionic detergent 2-[2- [4- (2, 4, 4-trimethylpentary) phenoxy] ethoxy] ethanol Μη ιονικό απορρυπαντικό 2-[2- [4- (2, 4, 4-τριμεθυπεντανυλ) φαινοξυ] αιθοξυ] αιθανόλη
NRF2	Nuclear factor-erythroid derived 2-like 2, NFE2L2
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης
PBS	Phosphate buffered saline Διάλυμα φωσφορικών αλάτων
Q-RT-PCR	Quantitative Real Time PCR Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου
RAP	Rapamycin Ραπαμυκίνη
RNAi	Interference RNA Παρεμβολή RNA

ROS	Reactive oxygen species Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
SDS	Sodium dodecyl sulfate Θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine N, N, N', N'-τετραμεθυλαιθυλενο-διαμίνη
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane Τρις-(υδροξυμεθυλο)-αμινομεθάνιο
Triton X-100	Non-ionic detergent Iso-octylphenoxy-polyethoxy-ethanol Μη ιονικό απορρυπαντικό Ισο-οκτυλοφαινοξυ-πολυαιθοξυ-αιθανόλη

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το δίκτυο πρωτεόστασης

Η ομοιόσταση του πρωτεώματος (πρωτεόσταση) είναι κρίσιμη για την κυτταρική λειτουργικότητα και συνεπώς για την υγεία του οργανισμού. Τα πολυάριθμα κυτταρικά πολυπεπτίδια και οι πρωτεϊνικές μηχανές μπορούν να τροποποιηθούν και να ρυθμισθούν είτε μέσω αυστηρά ελεγχόμενων ενζυμικών τροποποιήσεων (φωσφωρυλίωση, ακετυλίωση, ουβικιτινίλωση), είτε μέσω στοχαστικών μη ενζυμικών τροποποιήσεων (οξειδωση πρωτεϊνών, γλυκοζυλίωση) (Nedić et al., 2013). Οι πρωτεΐνες που τροποποιούνται ενζυμικά παραμένουν πλήρως λειτουργικές, σε αντίθεση με τις μη ενζυμικές τροποποιήσεις, οι οποίες προκαλούν λανθασμένο δίπλωμα ή ξεδίπλωμα στις πρωτεΐνες, καταλήγοντας σε αυξημένη πρωτεωμική αστάθεια.

Για να διατηρηθεί η πρωτεόσταση, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα ολοκληρωμένο σύστημα που εξασφαλίζει το γενικότερο έλεγχο ποιότητας του πρωτεώματος, το οποίο καλείται δίκτυο πρωτεόστασης (proteostasis network) και έχει ως στόχο την επιδιόρθωση, όταν είναι εφικτό, ή την αποικοδόμηση των μη λειτουργικών πρωτεϊνών (Morimoto, 2008; Niforou et al., 2014; Trougakos et al., 2013). Το δίκτυο πρωτεόστασης εξασφαλίζει τη βασική λειτουργικότητα του πρωτεώματος και ανταποκρίνεται επίσης στο πρωτεοτοξικό στρες, οδηγώντας τις πρωτεΐνες προς επιδιόρθωση ή προς αποικοδόμηση. Συγκεκριμένα, αποτελείται από διάφορα σύμπλοκα πρωτεϊνικών μηχανών, τα οποία σε συνθήκες πρωτεωμικής αστάθειας έχουν στόχο αρχικά την αναγνώριση και ακολούθως την επιδιόρθωση ή την αποικοδόμηση των δυσλειτουργικών πολυπεπτιδίων. Βασικά στοιχεία του δικτύου αυτού είναι η μηχανή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, το σύστημα απόκρισης σε μη σωστό δίπλωμα πρωτεϊνών (Unfolded Protein Response, UPR) του ενδοπλασματικού δικτύου (Endoplasmic reticulum, ER) και των μιτοχονδρίων, ένα σύνολο εξωκυττάρων και ενδοκυττάρων μοριακών συνοδών, ένας αριθμός πρωτεασών (σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα όπως κυτοσόλιο και μιτοχόνδρια), καθώς και τα δύο κύρια πρωτεολυτικά συστήματα, το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Ubiquitin-Proteasome System) και το σύστημα αυτοφαγίας-λυσσοσώματος (Autophagy-Lysosome System) (Niforou et al., 2014; Trougakos et al., 2013, Tsakiri and Trougakos, 2015). Μέρος επίσης του δικτύου πρωτεόστασης αποτελεί το σηματοδοτικό μονοπάτι NRF2 (Nuclear factor-erythroid derived 2-like 2, NFE2L2)/ KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του κυττάρου έναντι του οξειδωτικού (ή πρωτεοτοξικού) στρες (Gumeni and Trougakos, 2016). Αυτό το σύνολο των πολύπλοκων πρωτεϊνικών μηχανών

εγγυάται τη φυσιολογική σύνθεση του πρωτεώματος και την ανακύκλωσή του ή ανταποκρίνεται σε καταστάσεις πρωτεοτοξικού στρες, προωθώντας την απόκριση στη βλάβη των πρωτεϊνών (proteome damage response), κατά την οποία αρχικά προσδιορίζονται και έπειτα διασώζονται ή αποικοδομούνται οι μη διπλωμένες πρωτεΐνες, οι μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες και τα μη φυσικά πεπτίδια. Συνεπώς, γίνεται αντιληπτός ο εξέχων ρόλος της διασταυρούμενης επικοινωνίας μεταξύ των διάφορων συνιστωσών του δικτύου αυτού για τη διατήρηση της κυτταρικής πρωτεόστασης και της σταθερότητας του πρωτεώματος (Trougakos et al., 2013).

Αναλυτικότερα το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσσώματος εμπλέκεται στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών με μεγάλο χρόνο ημιζωής, των συσσωματωμάτων ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών και την ανακύκλωση κατεστραμμένων οργανιδίων (Jankowska et al., 2013). Από την άλλη πλευρά, το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος αποκαθιστά την πρωτεωμική σταθερότητα σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, όπως στον πυρήνα, το ER, το κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια, ακόμα και τον εξωκυττάριο χώρο. Ως εκ τούτου, είναι το κύριο σημείο του ελέγχου της ποιότητας της κυτταρικού πρωτεώματος και εμπλέκεται επίσης στην ανακύκλωση τόσο των πρωτεϊνών με μικρό χρόνο ημιζωής, όσο και των μη σωστά διπλωμένων ή μη διπλωμένων πρωτεϊνών (Baker et al., 2011). Τα επίπεδα έκφρασης και η δράση του ρυθμίζονται αυστηρά σε μεταγραφικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο, είτε υπό φυσιολογικές συνθήκες, είτε σε καταστάσεις αυξημένου οξειδωτικού και πρωτεοτοξικού στρες.

1.1.1 Οι συνέπειες της απορρύθμισης του δικτύου πρωτεόστασης

Η δυσλειτουργία του ποιοτικού ελέγχου του πρωτεώματος όπως αναφέρθηκε οδηγεί σταδιακά και αναπόφευκτα σε πρωτεωμική αστάθεια και εκδήλωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων και ασθενειών σχετιζόμενων με τη γήρανση. Η αύξηση ηλικίας θεωρείται ένας από τους κυριότερους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης ενός ευρέως φάσματος ασθενειών, όπως ανοσολογικών και μεταβολικών διαταραχών (διαβήτης τύπου 2), νευροεκφυλιστικών και καρδιαγγειακών ασθενειών, αλλά και διαφόρων μορφών καρκίνου (Klaips et al., 2018; Skliru et al., 2018). Συγκεκριμένα, η εμφάνιση της γήρανσης σχετίζεται με τη σταδιακή συσσώρευση βλαβών στα βιομόρια του κυττάρου κατά τη διάρκεια της ζωής, στις οποίες συμβάλλουν τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς στρεσογόνοι παράγοντες και σχετίζεται με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα (Argyropoulou et al., 2013). Αυτοί οι παράγοντες οδηγούν σε σταδιακή συσσώρευση κατεστραμμένων βιομορίων, επιδρώντας αρνητικά στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιοδυναμικής και

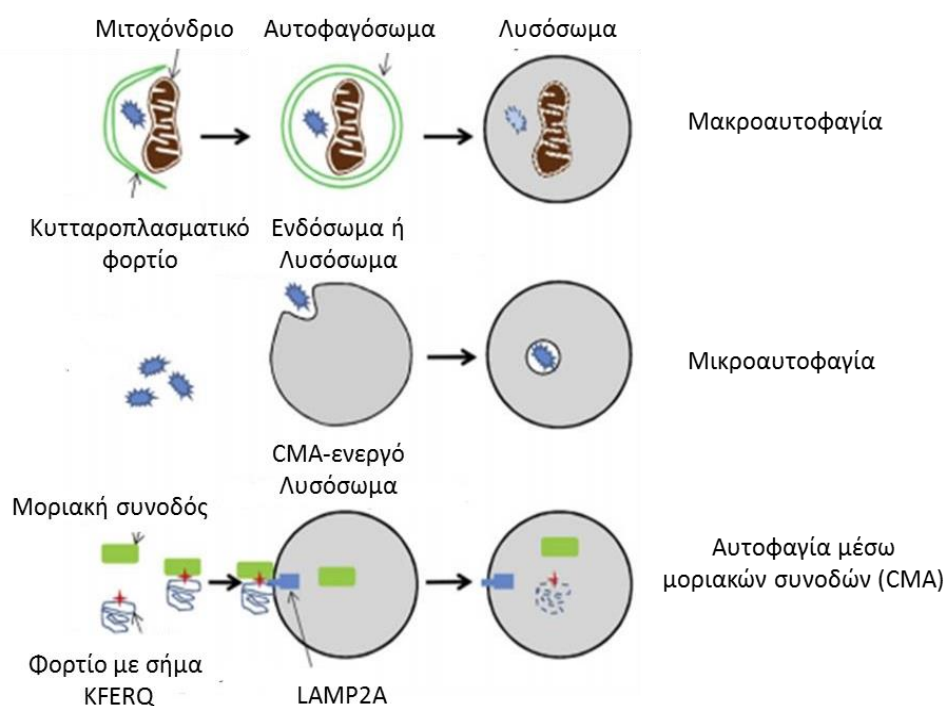
ακεραιότητας (López-Otín et al., 2013). Συνεπώς γίνεται αντιληπτό ότι ο φαινότυπος της γήρανσης και των ηλικιο-εξαρτώμενων ασθενειών όπως νευροεκφυλιστικών, καρδιαγγειακών νόσων και διαφόρων μορφών καρκίνου χαρακτηρίζονται επίσης από απορρύθμιση της ομοιοστασίας του πρωτεώματος (Luo et al., 2009; Powers et al., 2009; Trougakos et al., 2013). Για το λόγο αυτό, η απώλεια της πρωτεόστασης αναγνωρίστηκε ως ορόσημο της γήρανσης, υπογραμμίζοντας έτσι τη μεγάλη σημασία του πρωτεοστατικού δικτύου στην κυτταρική λειτουργικότητα και επιβίωση (López-Otín et al., 2013).

1.2 Οι δύο κύριοι πρωτεολυτικοί μηχανισμοί

1.2.1 Το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος

Στην αυτοφαγία, τα κύτταρα μεταφέρουν οργανίδια και κυτταροπλασματικό υλικό στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση και ανακύκλωση. Βασικός ρόλος της αυτοφαγίας είναι ο ποιοτικός έλεγχος του πρωτεώματος του κυττάρου, ο οποίος επιτυγχάνεται με την αποικοδόμηση των ελαττωματικών οργανιδίων και των πρωτεϊνών που παρουσιάζουν τάση προς συσσωμάτωση. Η επαγόμενη αυτοφαγία είναι ένας μηχανισμός επιβίωσης σε περιόδους στρες (π.χ. σε συνθήκες αστίας) για την παραγωγή θρεπτικών συστατικών και δομικών στοιχείων όπως αμινοξέα. Το κυτταροπλασματικό υλικό μπορεί να μεταφερθεί στα λυσοσώματα μέσω τριών διαφορετικών μονοπατιών (Eskelinen, 2019; Galluzzi et al., 2017) (Εικ. 1.1). Στη μακροαυτοφαγία, το πρώτο βήμα είναι η εγκόλπωση του κυτταροπλασματικού φορτίου σε δομές που καλούνται αυτοφαγοσώματα και βρίσκονται δεσμευμένα στην κυτταρική μεμβράνη. Ακολούθως, τα αυτοφαγοσώματα ενώνονται με τα λυσοσώματα και παραδίδουν το φορτίο τους προς αποικοδόμηση και ανακύκλωση (Mercer et al., 2018). Στην μικροαυτοφαγία, η ενδοσωμική ή λυσοσωμική μεμβράνη περιορισμού εγκολπώνει το κυτταροπλασματικό φορτίο σε μια διαδικασία παρόμοια με την ενδοκύτωση. Το φορτίο αυτό αποικοδομείται στη συνέχεια από τις λυσοσωμικές υδρολάσες (Tekirdag and Cuervo, 2018). Η τρίτη μορφή αυτοφαγίας είναι η αυτοφαγία μέσω μοριακών συνοδών (Chaperone-Mediated Autophagy, CMA), δεδομένου ότι συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή κυτταροπλασματικές και λυσοσωμικές μοριακές συνοδοί. Η CMA είναι υπεύθυνη για την πρωτεόλυση κυτοσωλικών πρωτεϊνών, οι οποίες φέρουν ένα συγκεκριμένο μοτίβο αναγνώρισης, το πενταπεπτίδιο KFERQ. Οι μοριακές συνοδοί (HSC70, HSP40, HSP90, κ.α.) αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη που προορίζεται για πρωτεόλυση μέσω του μοτίβου που φέρει και δημιουργούν μαζί της ένα σύμπλοκο. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο αυτό προσδένεται στον υποδοχέα LAMP2A της λυσοσωμικής μεμβράνης μέσα από τον οποίο θα περάσει η πρωτεΐνη αφού πρώτα ξεδιπλωθεί. Κοντά

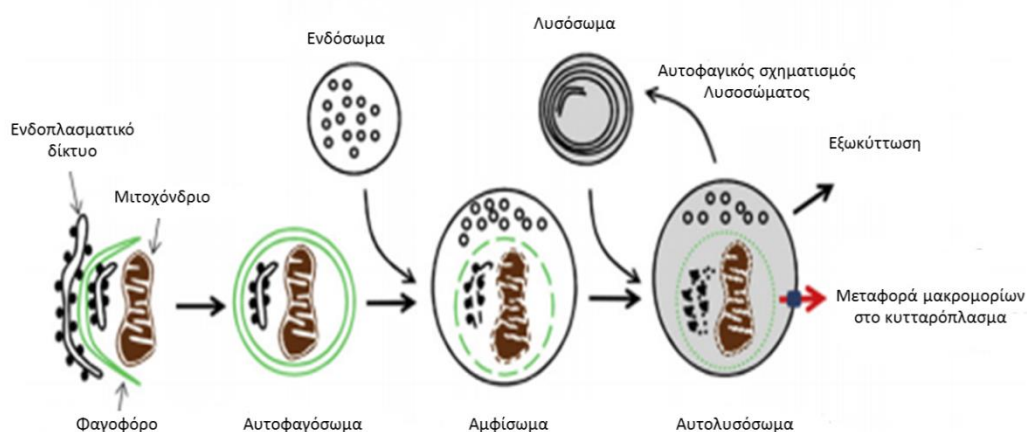
στην ενδοκυτταρική πλευρά του υποδοχέα LAMP2A υπάρχει μια ενδολυσosomalική μοριακή συνοδός (HSC70) που θα παραλάβει τη ξεδιπλωμένη πρωτεΐνη και θα την εισάγει στη λυσοσωμική κοιλότητα όπου και θα αποικοδομηθεί. Τέλος, το σύμπλοκο των μοριακών συνοδών απελευθερώνεται από τη λυσοσωμική μεμβράνη και είναι έτοιμο να παραλάβει το επόμενο υπόστρωμα (Kaushik and Cuervo, 2018).



Εικόνα 1.1. Σχηματική απεικόνιση των τριών μορφών αυτοφαγίας (προσαρμογή από Eskelinen, 2019).

Στη μακροαυτοφαγική οδό, τα αυτοφαγοσώματα σχηματίζονται από μεμβρανικές δομές που ονομάζονται φαγοφόρα ή μεμβράνες απομόνωσης (Εικ. 1.2). Το αυτοφαγόσωμα, που προκύπτει έπειτα από την εγκόλπωση του κυτταροπλασματικού φορτίου από το φαγοφόρο, διαθέτει μία διπλή λιπιδική μεμβράνη γύρω από αυτό. Η εξωτερική μεμβράνη περιορισμού του αυτοφαγοσώματος στη συνέχεια συγχωνεύεται με τα ενδοσώματα και τελικώς με τα λυσοσώματα. Μετά τη σύντηξη με τα ενδοσώματα, τα αυτοφαγοσώματα μετατρέπονται σε αμφισώματα. Η σύντηξη με τα λυσοσώματα παράγει τα αυτολυσosomalάματα. Το κυτταροπλασματικό φορτίο παραμένει «περικυκλωμένο» από τη μεμβράνη περιορισμού του αυτοφαγοσώματος, η οποία πρέπει είτε να αποικοδομηθεί είτε να γίνει διαπερατή πριν οι υδρολάσες αποικοδομήσουν το φορτίο. Στη συνέχεια, οι λυσοσωμικές υδρολάσες αποικοδομούν το κυτταροπλασματικό φορτίο, απελευθερώνοντας

μακρομόρια πίσω στο κυτταρόπλασμα. Ακολούθως, τα αυτολυσosώματα μπορούν να συγχωνευθούν με τη μεμβράνη του πλάσματος και να αδειάσουν τα περιεχόμενα τους στον εξωκυτταρικό χώρο (Medina et al., 2011). Τέλος μια άλλη πιθανότητα είναι ο σχηματισμός των λυσosωμάτων από τα αυτολυσosώματα (Yu et al., 2010).



Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού της μακροαυτοφαγίας. Το φαγοφόρο εμφανίζεται στο ER και κλείνει για να σχηματισθεί το αυτοφαγόσωμα. Τα αυτοφαγοσώματα συγχωνεύονται με τα ενδοσώματα και τα λυσosώματα σχηματίζοντας το αυτολυσosώμα, το κύριο πρωτεολυτικό συστατικό του μονοπατιού αυτού. Λυσosώματα μπορούν να επανασχηματισθούν από τα αυτολυσosώματα. Τα αυτολυσosώματα μπορούν επίσης να συνδεθούν με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και να απελευθερώσουν το φορτίο στο εξωκυττάριο περιβάλλον (προσαρμογή από Eskelinen, 2019).

1.2.1.1 Οι αυτοφαγικές πρωτεΐνες ρυθμίζουν τη βιογένεση του αυτοφαγοσώματος

Τα αυτοφαγικά γονίδια και πρωτεΐνες (Autophagy, atg) αρχικά ανακαλύφθηκαν στο ζυμομύκητα (Baba et al., 1997; Thumm et al., 1994), ενώ ορθόλογα γονίδια και πρωτεΐνες ανακαλύφθηκαν αργότερα και σε κύτταρα θηλαστικών. Κατά την έναρξη της αυτοφαγίας το πρωτεϊνικό σύμπλοκο κινάσης ULK1, το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες ULK1, ATG13, RB1CC1/FIP200 και ATG101 ενεργοποιείται και μετατοπίζεται στο ER. Το επόμενο βήμα είναι η στρατολόγηση του ειδικού για την αυτοφαγία συμπλόκου PI3K (phosphoinositide 3-kinase) που περιέχει την PI3 κινάση κλάσης III PIK3C3/VPS34, PIK3R4/VPS15, BECLIN1, ATG14 και άλλες πρωτεΐνες. Αυτό οδηγεί στην παραγωγή του PI3P και στο σχηματισμό δομών γνωστών ως ωμεγασώματα (Omegasomes) σε συγκεκριμένη θέση στο ER, όπου αργότερα λαμβάνει χώρα η βιογένεση των αυτοφαγοσωμάτων (Axe et al., 2008). Τα ωμεγασώματα χαρακτηρίζονται από την πρωτεΐνη ZFYVE1/DFCP1, η οποία αποτελεί

χαρακτηριστική πρωτεΐνη δέσμευσης PI3P. Το PI3P στρατολογεί επίσης το πρωτεϊνικό σύμπλοκο WIPI για το σχηματισμό του φαγοφόρου. Οι πρωτεΐνες WIPI και το σύμπλεγμα ATG12-ATG5-ATG16 προάγουν τη λιπιδίωση των ATG8 ομόλογων πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένης της LC3. Η πρωτεΐνη LC3 αποτελεί τον πιο ευρέως διαδεδομένο δείκτη αυτοφαγίας και η λιπιδιοποιημένη μορφή της ονομάζεται LC3-II. Η οικογένεια πρωτεϊνών ATG8 στα θηλαστικά περιέχει τις τρεις ισομορφές της LC3 (A, B και C) και τις πρωτεΐνες GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL1 και GABARAPL2/GATE-16.

1.2.1.2 Ειδικές μορφές αυτοφαγίας, μιτοφαγία

Η αυτοφαγία μπορεί να ταξινομηθεί περαιτέρω ανάλογα με το υλικό που εγκολπώνεται από τα αυτοφαγοσώματα σε επιλεκτική και μη επιλεκτική αυτοφαγία. Στην επιλεκτική αυτοφαγία μεσολαβούν ειδικοί υποδοχείς αυτοφαγίας και ταξινομείται ανάλογα με το υπόστρωμα που θα αποικοδομηθεί σε μιτοφαγία (μιτοχόνδρια), ER-φαγία (ER), πρωτεαφαγία (πρωτεάσωμα), ξενοφαγία (παθογόνα) κ.α. (Grumati et al., 2018; Hyttinen et al., 2014). Η μιτοφαγία είναι μια μορφή επιλεκτικής μακροαυτοφαγίας, που αναγνωρίζει ειδικά και αποικοδομεί ελαττωματικά μιτοχόνδρια. Έκπληξη δεν αποτελεί το γεγονός ότι η γενετική αποσιώπηση των αυτοφαγικών πρωτεϊνών ή η δυσλειτουργία της μιτοφαγίας έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση κατεστραμμένων μιτοχονδρίων στο κύτταρο, το οποίο οδηγεί αναπόφευκτα σε κυτταρικό θάνατο. Το μιτοχονδριακό στρες επάγει τη μιτοφαγία και τον κυτταρικό θάνατο μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού, το αποτέλεσμα του οποίου καθορίζεται από μία ενδογενή ισορροπία. Το στρες αυξάνει τη διαπερατότητα της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Outer Mitochondrial Membrane, OMM) μέσω των πρωτεϊνών BAX (BCL2 associated X) και BAK (BCL2 antagonist/killer 1), απελευθερώνοντας προαποπτωτικούς παράγοντες όπως τον παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης, AIF (apoptosis-inducing factor) και το κυτόχρωμα c. Το στρες συμβάλλει επίσης στο άνοιγμα ενός πόρου στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Inner Mitochondrial Membrane, IMM), του mPTP (mitochondrial permeability transition pore) που οδηγεί σε διόγκωση μιτοχονδρίων και ρήξη λόγω της ταχείας εισροής νερού (Kubli and Gustafsson, 2012). Αν και το μιτοχονδριακό ρυθμιστικό διάλυμα Ca^{2+} ασκεί γενικά κυτταροπροστατευτική δράση στις περισσότερες περιπτώσεις, η υπερβολική πρόσληψη που προκαλείται σε καταστάσεις στρες οδηγεί σε υπερφόρτωση Ca^{2+} και σε άνοιγμα του mPTP (Givvimani et al., 2012). Η μιτοφαγία στις περιπτώσεις αυτές λειτουργεί ως κυτταροπροστατευτικό μέτρο, αφαιρώντας τα ελαττωματικά μιτοχόνδρια, διατηρώντας έτσι την κυτταρική ομοιόσταση. Σε καταστάσεις υπερβολικού στρες όμως, η μιτοφαγία δυσλειτουργεί, οδηγώντας το κύτταρο

σε απόπτωση. Από την άλλη πλευρά, η υπερβολική μιτοφαγία είναι επίσης επιζήμια λόγω αποικοδόμησης υγιών μιτοχονδρίων (Kubli and Gustafsson, 2012). Ένα από τα πιο περιγραφέντα μονοπάτια μιτοφαγίας διενεργείται με τη μεσολάβηση των πρωτεϊνών PINK1 (PTEN-induced kinase 1)/PRKN (Ding and Yin, 2012). Ωστόσο, η μιτοφαγία μπορεί επίσης να συμβεί και ανεξάρτητα από τη διαμεσολάβηση της E3 λιγάσης ουβικιτίνης, PRKN (γνωστή και ως PARKIN).

1.2.1.3 Ισορροπία μεταξύ βιογένεσης μιτοχονδρίων-μιτοφαγίας

Η μιτοχονδριακή βιογένεση είναι υπεύθυνη για την αντικατάσταση των κατεστραμμένων και μη φυσιολογικών μιτοχονδρίων με νέα λειτουργικά, έτσι ώστε να καλυφθούν οι ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου (Ren et al., 2010). Μία πολύπλοκη ισορροπία υπάρχει μεταξύ μιτοφαγίας και μιτοχονδριακής βιογένεσης, η οποία παίζει ρόλο σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως σε διάφορους τύπους καρκίνου, σε νευροεκφυλιστικές και καρδιαγγειακές νόσους κ.α. Ο μεταγραφικός συμπαράγοντας PPARGC1A (peroxisome-proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α , γνωστός ως και PGC-1 α) ενεργοποιείται κατά τη βιογένεση των μιτοχονδρίων. Παράλληλα, καταστάσεις αστίας και νηστείας οδηγούν στην ταχύτατη αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *PPARGC1A* σε ιστούς όπως ο καρδιακός, με παράλληλη αύξηση της μιτοφαγίας, βελτιώνοντας έτσι παθολογικές καταστάσεις όπως τα ισχαιμικά επεισόδια (Rowe and Jiang, 2010). Η PARKIN, ως βασικός ρυθμιστής της μιτοφαγίας, μπορεί επίσης να ρυθμίσει τη μιτοχονδριακή βιογένεση μέσω αποικοδόμησης του PARIS (υπόστρωμα αλληλεπίδρασης της PARKIN) και ενεργοποίησης της γονιδιακής έκφρασης του *PPARGC1A* (Franz et al., 2015; Tanaka et al., 2010).

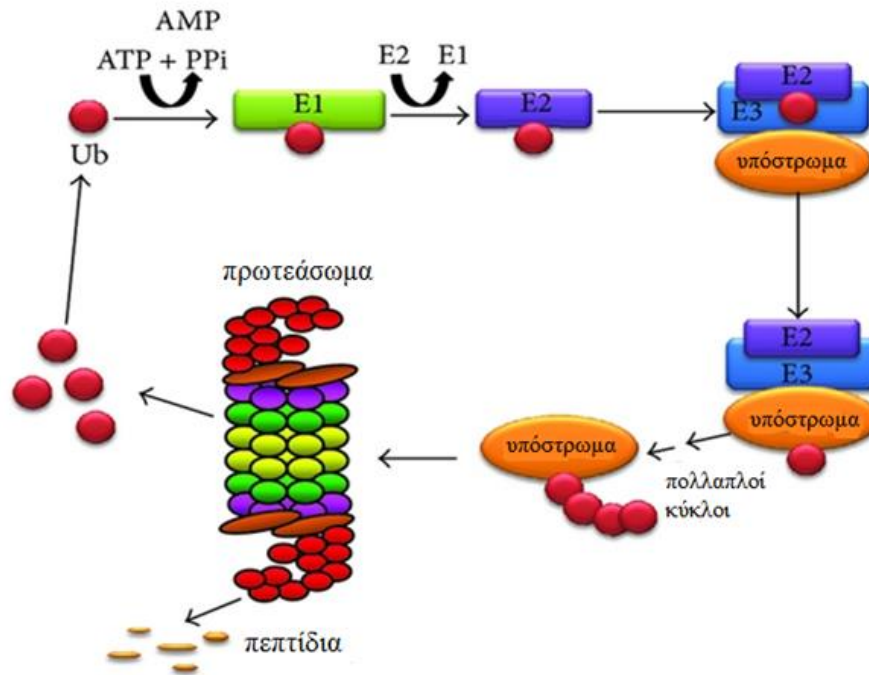
1.2.2 Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος

Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος αποτελεί το δεύτερο κύριο πρωτεολυτικό μηχανισμό του κυττάρου. Η ουβικιτίνη είναι μια πρωτεΐνη 76 αμινοξέων και εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών. Αν και απουσιάζει από τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, υπάρχουν ορισμένες βακτηριακές πρωτεΐνες που εμφανίζουν λειτουργικές και δομικές ομοιότητες με τα συστατικά του συστήματος ουβικιτίνης (Lehmann et al., 2006). Η ουβικιτίνη σχηματίζει διαφορετικές αλυσίδες που συνδέονται μέσω των επτά καταλοίπων λυσίνης της, της λυσίνης (Lys-K) 6, 11, 27, 29, 33, 48

και 63. Επιπλέον, η ουβικιτίνη μπορεί να συνδεθεί μέσω της αμινοτελικής μεθειονίνης της και του καρβοξυτελικού άκρου μιας άλλης ουβικιτίνης. Η ουβικιτίνη συνδέεται σε άλλες πρωτεΐνες είτε ως μονομερές, είτε ως αλυσίδα πολυουβικιτίνης μέσω ενζυμικών αντιδράσεων, διαδικασία που ονομάζεται ουβικιτινιλίωση, ρυθμίζοντας έτσι τη «μοίρα» των τροποποιημένων υποστρωμάτων στα διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένων του πυρήνα και του κυτοσολίου (von Mikecz, 2006). Η «μοίρα» της πρωτεΐνης που θα τροποποιηθεί κατ' αυτόν τον τρόπο, διαφέρει ανάλογα με τον τύπο της αλυσίδας που προστίθεται. Για παράδειγμα, η ουβικιτινιλίωση σε κατάλοιπα λυσίνης 11 σχετίζεται με τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, σε λυσίνης 48 με την αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα και σε λυσίνης 63 με την επιδιόρθωση του γενετικού υλικού, την αντιγραφή και τη μεταγωγή σήματος (Ikeda et al., 2010).

1.2.2.1 Τα ένζυμα του συστήματος ουβικιτίνης

Η σύζευξη της ουβικιτίνης σε πολυπεπτίδια είναι ATP-εξαρτώμενη και μεσολαβείται από μια σειρά ενζύμων. Ειδικότερα, η ουβικιτίνη μεταφέρεται με κατανάλωση ενέργειας, στο ενεργό κέντρο ενός κατάλοιπου κυστεΐνης του ενζύμου που ενεργοποιεί την ουβικιτίνη, το E1. Η ενεργοποιημένη ουβικιτίνη, στη συνέχεια, μεταφέρεται στο ενεργό κέντρο μιας άλλης οικογένειας ενζύμων, που καταλύουν τη σύζευξη των ουβικιτινίων, το E2. Στο τέλος, οι E3 λιγάσες της ουβικιτίνης συνδέουν την καρβοξυλική ομάδα του καρβοξυτελικού κατάλοιπου γλυκίνης της ουβικιτίνης με την ε-αμινομάδα μιας εσωτερικής λυσίνης της πρωτεΐνης στόχου (Hershko and Ciechanover, 1998) (Εικ. 1.3).



Εικόνα 1.3. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας πρωτεϊνικής αποικοδόμησης μέσω του συστήματος ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (προσαρμογή από Gomes, 2013).

Η απελευθέρωση της ουβικιτίνης από τα διάφορα προϊόντα της είναι κρίσιμη τόσο για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών όσο και για τη βιοσύνθεσή της. Τα ένζυμα από-ουβικιτινίωσης (deubiquitinating enzymes, DUBs) διαδραματίζουν βασικό ρόλο σε αυτήν τη διαδικασία. Πρόκειται για μικρές πρωτεΐνες που υδrolύουν μικρά αμύδια και εστέρες στο καρβοξυτελικό άκρο της ουβικιτίνης (Amerik and Hochstrasser, 2004). Έτσι, συμμετέχουν στην επεξεργασία των ανενεργών ουβικιτινών, στην επιδιόρθωση του συζεύγματος ουβικιτίνης-πρωτεΐνης, στην απομάκρυνση της ουβικιτίνης από τα προϊόντα προσθήκης της, καθώς και στη διατήρηση του 26S πρωτεασώματος ελεύθερου από ανασταλτικές αλυσίδες ουβικιτίνης.

1.2.2.2 Το πρωτεάσωμα

Το πρωτεάσωμα είναι μια μεγάλη και πολύπλοκη κυτταρική μηχανή με μοριακό βάρος της τάξης των 2,5 MDa, που διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στις διαδικασίες της κυτταρικής ομοιοδυναμικής και της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης, από τα αρχαιοβακτήρια μέχρι τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από το 20S καταλυτικό κέντρο (core particle) και ένα ή δύο 19S ρυθμιστικά μόρια (regulatory particles) τα οποία συνδέονται στα άκρα του καταλυτικού κέντρου (Liu and Jacobson, 2013; Saeki and

Tanaka, 2012). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα οι ουβικιτινιωμένες πρωτεΐνες μικρής διάρκειας ημιζωής αποικοδομούνται από το 26S πρωτεάσωμα (Ciechanover et al., 2000; Pickart, 2000). Αντίθετα, η δράση του 20S πρωτεασώματος φαίνεται πως εστιάζεται στην αποικοδόμηση μη διπλωμένων, μη σωστά διπλωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών, καθώς και μη φυσικών πεπτιδίων (Hohn and Grune, 2014)

1.2.2.3 Το 20S καταλυτικό κέντρο

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το 20S καταλυτικό κέντρο αποτελείται από 28 α - και β -τύπου υπομονάδες που οργανώνονται σε τέσσερεις δακτυλίους (Maurin-Furlow, 2013). Οι εσωτερικοί δακτύλιοι απαρτίζονται από β υπομονάδες ($\beta 1-7$) και οι εξωτερικοί από α υπομονάδες ($\alpha 1-7$). Το 20S πρωτεάσωμα έχει μια κοίλη κυλινδρική α - β - β - α οργάνωση που φέρει καταλυτικά κέντρα με τρεις ενεργότητες πεπτιδασών (Groll et al., 1997). Ειδικότερα, οι πρωτεολυτικές αυτές ενεργότητες βρίσκονται στους εσωτερικούς δακτυλίους, όπου η $\beta 1$, $\beta 2$ και $\beta 5$ (*PMSB6*, *PMSB7*, *PMSB5* γονίδια στον άνθρωπο) υπομονάδες παρουσιάζουν ενεργότητες κασπάσης, θρυψίνης και χυμοθρυψίνης, αντίστοιχα (Groll and Clausen, 2003). Η πρωτεασωμική ενεργότητα χυμοθρυψίνης πρωτεολύει έπειτα από υδρόφοβα κατάλοιπα αμινοξέων, ενώ οι ενεργότητες κασπάσης και θρυψίνης μετά από όξινα και βασικά κατάλοιπα, αντίστοιχα (Arendt and Hochstrasser, 1997). Οι α υπομονάδες στερούνται πρωτεολυτικής ενεργότητας και για αυτό το λόγο θεωρούνται ρυθμιστικές υπομονάδες (Groll and Clausen, 2003), καθώς το αμινοτελικό τους άκρο οργανώνεται μέσα στην πύλη του κεντρικού θαλάμου του δακτυλίου ρυθμίζοντας την είσοδο των μη διπλωμένων από-ουβικιτινιωμένων πολυπεπτιδίων στο κεντρικό πρωτεολυτικό θάλαμο (Kunjappu and Hochstrasser, 2014).

Η συγκρότηση του 20S τμήματος είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, η οποία απαιτεί τη συμμετοχή μοριακών συνοδών ή την αυτό-συγκρότηση των υπομονάδων, καθώς και την ωρίμαση των β υπομονάδων (Kunjappu and Hochstrasser, 2014). Το πρώτο βήμα είναι ο σχηματισμός ενός επταμερούς δακτυλίου με α υπομονάδες με τη βοήθεια παραγόντων που ρυθμίζουν τη σωστή οργάνωση (Stadtmueller et al., 2012). Έχει βρεθεί ότι ο σχηματισμός προωθείται από δύο ετεροδιμερείς μοριακές συνοδούς, την PAC1/PAC2 (*Pba1/Pba2* στη *Drosophila*) και την PAC3/PAC4 (*Pba3/Pba4* στη *Drosophila*) (Hirano et al., 2005). Μετά την ολοκλήρωση του σχηματισμού του α δακτυλίου, η POMP1 (Proteasome maturation protein 1) πρωτεΐνη προωθεί τη μετατόπιση του συμπλόκου PAC3/PAC4 και τη συγκρότηση των β υπομονάδων μέσα στους α δακτυλίους. Ο σχηματισμός των β δακτυλίων ξεκινάει με τη $\beta 2$ υπομονάδα και την POMP1 (Yashiroda et al., 2008). Παρόλο που τα προπεπτίδια όλων των

β υπομονάδων συνεισφέρουν στο σχηματισμό του 20S κεντρικού τμήματος, το προπεπτίδιο της β5 υπομονάδας είναι κρίσιμο, καθώς φαίνεται να ασκεί δράση μοριακής συνοδού (Ramos et al., 1998). Στο τελικό βήμα, η συγκρότηση του 20S ολοκληρώνεται με την αυτόλυση των προπεπτιδίων των β υπομονάδων και την αποικοδόμηση της POMP1 και της PAC1/PAC2 από το ενεργοποιημένο 20S πρωτεάσωμα (Hirano et al., 2005; Ramos et al., 1998). Η πύλη του 20S πρωτεασώματος παραμένει κλειστή από τα αμινοτελικά άκρα των α-υπομονάδων και ανοίγει με τη ρυθμιστική δράση του 19S τμήματος (Groll et al., 2000).

1.2.2.4 Το 19S ρυθμιστικό τμήμα

Το 19S ρυθμιστικό μόριο αποτελείται από 20 υπομονάδες οι οποίες είναι εξελικτικά συντηρημένες και οργανώνονται σε δύο υποσύμπλοκα, τη βάση και το κάλυμμα (Liu and Jacobson, 2013). Συγκεκριμένα, αναγνωρίζει τη σημασμένη με ουβικιτίνη πρωτεΐνη-στόχο και τη μεταφέρει στον καταλυτικό πυρήνα. Η βάση αποτελείται από έξι ATPάσες τύπου AAA, τις RPT1-6, και από τρεις υπομονάδες που δεν ανήκουν στις ATPάσες, τις RPN1, RPN2 και RPN13 (Tanaka, 2013). Το κάλυμμα αποτελείται από εννέα υπομονάδες που δεν ανήκουν στις ATPάσες με διακριτή αλληλουχία, δομή και λειτουργία, τις RPN3, RPN5-9, RPN11, RPN12 και RPN15. Η βάση και το κάλυμμα συνδέονται με τη βοήθεια του μορίου RPN10 σχηματίζοντας έτσι το 19S ρυθμιστικό τμήμα. Οι υπομονάδες RPN13 και RPN10 δρουν ως υποδοχείς πολυουβικιτίνης, ενώ η υπομονάδα RPN11 φέρει ενεργότητα απο-ουβικιτινάσης (Lander et al., 2012). Το 26S πρωτεάσωμα αποικοδομεί κυρίως πρωτεΐνες που έχουν σημανθεί με ουβικιτίνη. Η επιλογή αυτών γίνεται από το ένα εκ των δύο 19S μορίων (Glickman and Ciechanover, 2002). Αντίθετα, ο ATP-ανεξάρτητος πρωτεολυτικός μηχανισμός λειτουργεί χωρίς τη διαμεσολάβηση της ουβικιτίνης και έχει προταθεί ότι συμμετέχει στην αποικοδόμηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών (Shringarpure et al., 2003).

1.2.2.5 Εναλλακτικές μορφές του πρωτεασώματος

Η πρωτεολυτική δραστηριότητα του 20S πρωτεασώματος μπορεί να διαμορφωθεί με την αντιστρεπτή σύνδεση διάφορων ρυθμιστικών τμημάτων. Έχουν αναγνωρισθεί άλλα δύο ρυθμιστικά μόρια, το 11S και το PA200. Τα τμήματα αυτά μπορούν να συνδεθούν στο 20S καταλυτικό κέντρο ασύμμετρα και να σχηματίσουν υβριδικά πρωτεάσματα. Εναλλακτικά, μπορεί να συνδεθεί μόνο ένα ρυθμιστικό μόριο και η άλλη πλευρά του 20S να παραμείνει ασύνδετη.

Η 11S υπομονάδα έχει την ικανότητα, παρουσία ιντερφερόνης- γ (IFN- γ) να προσδένεται στη θέση ενός συμπλόκου 19S στο 20S πρωτεάσωμα, δημιουργώντας έτσι ένα υβριδικό 19S:20S:11S πρωτεάσωμα (Tanahashi et al., 2000). Το πρωτεάσωμα που προκύπτει καλείται ανοσοπρωτεάσωμα και εμπλέκεται στην επεξεργασία ενδοκυτταρικών αντιγόνων και την παρουσίασή τους από MHC μόρια τάξης I (Barton et al., 2002). Το 11S είναι επταμερές και δεν περιέχει ATP-άσες, ενώ μπορεί να επάγει πρωτεόλυση μικρών πεπτιδίων (για παράδειγμα ιικών πεπτιδίων), αλλά και οξειδωμένων υποστρωμάτων, όχι όμως ολόκληρων πρωτεϊνών αφού δε δύναται να τις ξεδιπλώσει (Förster et al., 2005). Στο ανοσοπρωτεάσωμα οι καταλυτικές υπομονάδες $\beta 1$, $\beta 2$ και $\beta 5$, αντικαθίστανται από τις ανοσο-υπομονάδες $\beta 1i$, $\beta 2i$, και $\beta 5i$ η έκφραση των οποίων επάγεται και σε αυτήν την περίπτωση από την IFN- γ (Kimura et al., 2009).

Το PA200 ρυθμιστικό μόριο ενισχύει την υδρόλυση των πεπτιδίων, αλλά στην πραγματικότητα μειώνει την ενεργότητα του 20S πρωτεασώματος απέναντι στις άθικτες πρωτεΐνες (Pickering and Davies, 2012). Συνδέεται στον έναν ή και στους δύο α δακτυλίους και αυξάνει το άνοιγμα για τον πρωτεολυτικό θάλαμο (Ortega et al., 2005).

Τέλος, μία ακόμη εναλλακτική μορφή πρωτεασώματος αποτελεί το θυμοπρωτεάσωμα που εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα του φλοιού του θύμου αδένος και το οποίο περιέχει την καταλυτική υπομονάδα $\beta 5t$. Το θυμοπρωτεάσωμα παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των CD8 T-κυττάρων και στην διαδικασία της θετικής επιλογής των T κλώνων, δημιουργώντας πεπτίδια (Tanaka, 2013).

1.2.2.6 Η μεταγραφική ρύθμιση του πρωτεασώματος

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι έπειτα από αναστολή του πρωτεασώματος, παρατηρείται μια συντονισμένη *de novo* σύνθεση των υπομονάδων του 26S πρωτεασώματος και ταυτόχρονη συγκρότησή του (Li et al., 2011; Meiners et al., 2003). Στα θηλαστικά έχειδειχθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας NRF1 (nuclear factor erythroid 2-related factor 1) είναι απαραίτητος για την έκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων μετά από την αναστολή του πρωτεασώματος (Radhakrishnan et al., 2010). Ο NRF1 ουβικιτινιλιώνεται από περισσότερες από μία E3 λιγάσες ουβικιτίνης και πιθανώς αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα (Steffen et al., 2010). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο NRF1 είναι συνδεδεμένος στο ER. Η ελευθέρωση και η μετατόπισή του στον πυρήνα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής απαιτεί την απογλυκοζυλίωσή του, την ουβικιτινίωσή του και τη μερική αποικοδόμησή του από το πρωτεάσωμα. Η προσθήκη μικρής συγκέντρωσης

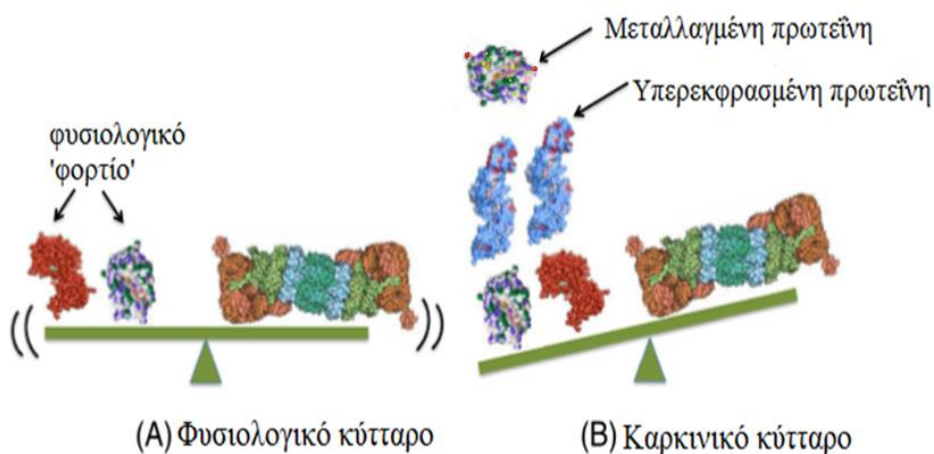
πρωτεασωμικού αναστολέα έχει ως αποτέλεσμα την επεξεργασία του NRF1 και τη μετατόπιση του στον πυρήνα, την αυξημένη ρύθμιση των πρωτεασωμικών υπομονάδων, καθώς και άλλων γονιδίων που σχετίζονται με το πρωτεάσωμα, ενώ τέτοια απόκριση δε συμβαίνει παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων αναστολέων. Σε απουσία αναστολέα, ο NRF1 αποικοδομείται ταχέως (Sha and Goldberg, 2014).

Ο NRF1 αλλά και ο NRF2 είναι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (antioxidant response elements, AREs) στους υποκινητές των γονιδίων στόχων. Μελέτες έδειξαν ότι γονίδια των πρωτεασωμικών υπομονάδων φέρουν τα AREs στους υποκινητές τους, δηλώνοντας ίσως ότι η αυξημένη ρύθμιση του πρωτεασώματος που μεσολαβείται από τον NRF1 και έπεται της αναστολής του, οφείλεται στη σύνδεση του NRF1 στα στοιχεία αυτά (Radhakrishnan et al., 2010; Steffen et al., 2010). Ο NRF2 είναι και αυτός υπόστρωμα για το UPS. Υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι συνδεδεμένος με την πρωτεΐνη KEAP1, που χρησιμεύει ως συστατικό για την αναγνώρισή του από την E3 λιγάση της ουβικιτίνης. Η λιγάση ουβικιτινιλιώνει τον NRF2, στοχεύοντάς τον προς πρωτεασωμική αποικοδόμηση. Η αυξημένη ρύθμιση του NRF2 κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες θεωρείται ότι εκδηλώνεται με την αποσύνδεσή του από τον KEAP1 παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης οξειδωτικού στρες και καταλήγει στη σταθεροποίηση και μετατόπισή του στον πυρήνα, εκεί όπου επάγει τη μεταγραφή των πρωτεασωμικών γονιδίων (Malloy et al., 2013).

1.3 Πρωτεοτοξικό στρες, μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και καρκίνος

Αρκετά στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν υψηλή εξάρτηση από τους μηχανισμούς πρωτεόστασης (Balch et al., 2008), συμπεριλαμβανομένου και του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος αποκάλυψε ότι τα καρκινικά γονιδιώματα φέρουν δεκάδες έως εκατοντάδες σημειακές μεταλλαγές σε κωδικές αλληλουχίες πρωτεϊνών (Vogelstein et al., 2013). Πολλές από αυτές τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες αντιμετωπίζουν σημαντικές προκλήσεις αναφορικά με την αναδίπλωσή τους, καταλήγοντας στην αυξημένη αποικοδόμησή τους μέσω του πρωτεασώματος. Επιπλέον, τα καρκινικά γονιδιώματα συχνά περιέχουν μεγάλους διπλασιασμούς, διαγραφές, αναστροφές και μεταθέσεις, καθώς και διαφορετικό αριθμό αντιγράφων ολόκληρων χρωμοσωμάτων (ανευπλοειδία). Εκτιμάται ότι περισσότεροι από

το 90% των ανθρώπινων όγκων περιέχουν κύτταρα με πάνω από δύο αντίγραφα ενός ή και περισσότερων χρωμοσωμάτων (Weaver et al., 2006). Τα επιπλέον χρωμοσώματα συνεχίζουν να εκφράζονται και συνεπώς η πρωτεϊνική σύνθεση σε αυτά τα κύτταρα διαταράσσεται καθώς παράγεται περίσσεια πρωτεϊνών (Williams et al., 2008). Αυτό είναι ένα σημαντικό πρόβλημα για τις πρωτεΐνες που σχηματίζουν στοιχειομετρικά σύμπλοκα όπως είναι τα ριβοσώματα. Σε τέτοιες περιπτώσεις η περίσσεια των πρωτεϊνών σχεδόν πάντα δε μπορεί να διατηρήσει μια σταθερή διαμόρφωση, με αποτέλεσμα να αποικοδομούνται από το πρωτεάσωμα (Derhoure et al., 2014). Θεωρητικά, αυτό το γεγονός δημιουργεί στα καρκινικά κύτταρα μια υψηλή εξάρτηση στους μηχανισμούς ποιοτικού ελέγχου όπως είναι το δίκτυο των μοριακών συνοδών, το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσosώματος (Guo et al., 2013). Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι οι παράγοντες που αναστέλλουν τα μονοπάτια ποιοτικού ελέγχου των πρωτεϊνών είναι πιο τοξικοί στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, καθιστώντάς τους χρήσιμα εργαλεία στη θεραπεία μιας ευρείας ποικιλίας μορφών καρκίνου (Εικ. 1.4).



Εικόνα 1.4. Πρωτεοτοξική κρίση στα καρκινικά κύτταρα. (Α) Στα φυσιολογικά κύτταρα, το φορτίο των υποστρωμάτων για αποικοδόμηση βρίσκεται σε ισορροπία με την ικανότητα αποικοδόμησης από το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. (Β) Στα καρκινικά κύτταρα το φορτίο είναι αυξημένο λόγω της έκφρασης μεταλλαγμένων πρωτεϊνών ή/και της έκφρασης περίσσειας πρωτεϊνών που οφείλεται στην ανευπλοειδία. Έτσι το σύστημα οδηγείται σε ανισορροπία, όπου το φορτίο προς αποικοδόμηση υπερβαίνει τη λειτουργία του πρωτεασώματος (προσαρμογή από Deshaies, 2014).

1.4 Μηχανισμός δράσης των πρωτεασωμικών αναστολέων

Οι αναστολείς πρωτεασώματος ασκούν την αντινεοπλασματική τους δράση μέσω στόχευσης στον καταλυτικό πυρήνα (20S) του 26S πρωτεασώματος, του ενζυμικού συμπλόκου που είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση πρωτεϊνών (Jain et al., 2011). Όπως ήδη αναφέρθηκε, το κεντρικό και καταλυτικό τμήμα του πρωτεασώματος εμπεριέχει πρωτεολυτικές ενεργότητες χυμοθρυψίνης, θρυψίνης και κασπάσης και στοχεύει πρωτεΐνες με ουβικιτινο-εξαρτώμενο τρόπο. Η ενεργότητα χυμοθρυψίνης είναι απαραίτητη για την επιβίωση του κυττάρου, ενώ μπορεί εύκολα να στοχευθεί περιορίζοντας έτσι το ρυθμό της πρωτεολυτικής διαδικασίας (Bennett and Kirk, 2008). Οι συνέπειες της αναστολής του πρωτεασώματος περιλαμβάνουν 1) τη συσσώρευση μη σωστά διπλωμένων πρωτεϊνών, γεγονός που οδηγεί σε στρες του ER, 2) την ενεργοποίηση της αυτοφαγίας, 3) την αναστολή του μονοπατιού του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, το οποίο ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την επιβίωση και 4) τη σταθεροποίηση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών, των ογκοκατασταλτικών γονιδιακών προϊόντων, καθώς και την απορρύθμιση των κυκλινών, των κινασών των κυκλινών και των αναστολέων τους (Hideshima and Anderson, 2012).

1.5 Το πολλαπλούν μυέλωμα

Το πολλαπλούν μυέλωμα αποτελεί μία αιματολογική κακοήγη νεοπλασία των Β κυττάρων, η οποία χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση μονόκλωνων πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών. Τα κύτταρα αυτά, υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγουν τα αντισώματα, στην περίπτωση όμως του πολλαπλού μυελώματος υφίστανται κακοήγη εξαλλαγή με αποτέλεσμα να διαιρούνται ανεξέλεγκτα. Τα κακοήγη πλασματοκύτταρα παράγουν αντισώματα ή και απλά τμήματα αντισωμάτων, τις λεγόμενες παραπρωτεΐνες, οι οποίες παράγονται από τον ίδιο κλώνο πλασματοκυττάρων και για το λόγο αυτό ονομάζονται μονοκλωνικές. Ο πολλαπλασιασμός των μη φυσιολογικών πλασματοκυττάρων μέσα στο μυελό των οστών, οδηγεί σε διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας του, δηλαδή σε διαταραχή της ομαλής ανάπτυξης και ωρίμανσης των αιμοποιητικών κυττάρων, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη αναιμίας ή θρομβοκυτταροπενίας (έλλειψη αιμοπεταλίων).

Το πολλαπλούν μυέλωμα αποτελεί μια από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες αιματολογικές κακοήθειες (δεύτερη πιο συχνή στις Ηνωμένες Πολιτείες), ενώ συνιστά το 1%

όλων των καρκινικών τύπων (Raab et al., 2009). Η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 69 έτη, με τα τρία τέταρτα των ασθενών να είναι ηλικίας πάνω από 55 ετών και οι δύο στους τρεις ασθενείς να είναι άντρες. Φαίνεται επίσης πως είναι πλέον κοινό σε αфро-Αμερικανούς και πιο σπάνιο σε Αμερικανούς ασιατικής καταγωγής, με την αιτία αυτή της διαφοράς να είναι άγνωστη (Landgren et al., 2006). Με την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών θεραπευτικών στρατηγικών και τη βελτίωση της ήδη ισχύουσας θεραπείας, η μέση επιβίωση των ασθενών αυξήθηκε από τρία σε έξι έτη τις δύο τελευταίες δεκαετίες.

Το πολλαπλούν μυέλωμα μπορεί να υφίσταται επί σειρά ετών χωρίς εμφανή συμπτώματα ασθένειας. Κατά κανόνα, τα περισσότερα συμπτώματα δεν εμφανίζονται παρά μόνο αφού η ασθένεια υφίσταται για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ δύναται να προκύψει *de novo*, είτε να εξελιχθεί από την κατάσταση της μονοκλωνικής γαμμαπάθειας ακαθόριστης σημασίας (ΜΓΑΣ, Monoclonal gammopathy of undetermined significance/MGUS). Η ΜΓΑΣ χαρακτηρίζεται από χαμηλά επίπεδα πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών και IgM ανοσοσφαιρίνης, ενώ απουσιάζουν οι οστεολυτικές βλάβες, η αναιμία, η υπερασβεστιαμία και η δυσλειτουργία των νεφρών που παρουσιάζονται σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα (Agarwal and Ghobrial, 2013). Όταν το ποσοστό των κακόηθων πλασματοκυττάρων [διακρίνονται από τον συνδυασμό επιφανειακών δεικτών CD19-/CD56+/CD45-/CD38+, από τα αντίστοιχα φυσιολογικά (CD19+/CD56-/CD45+/CD38-+)] είναι λιγότερο του 10% όλων των μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών, η νόσος χαρακτηρίζεται ως ΜΓΑΣ. Όταν το ποσοστό των κακόηθων πλασματοκυττάρων υπερβαίνει το 10%, η πάθηση ορίζεται ως πολλαπλούν μυέλωμα, το οποίο ταξινομείται σε δύο ομάδες, το ασυμπτωματικό πολλαπλούν μυέλωμα και το συμπτωματικό, ανάλογα με την απουσία ή την παρουσία υπερασβεστιαμίας, νεφρικής ανεπάρκειας, αναιμίας και λυτικών αλλοιώσεων στα οστά. Εκτιμάται ότι η ΜΓΑΣ εξελίσσεται σε πολλαπλούν μυέλωμα με ρυθμό 1-2 % ετησίως (Barlogie et al., 2004; Rollig et al., 2015).

Ειδικότερα, φαίνεται πως με την πρόοδο της νόσου, τα μυελωματικά κύτταρα αποκτούν την ικανότητα να ανεξαρτητοποιούνται από το μικροπεριβάλλον του μυελού των οστών, να αναπτύσσονται και να επεκτείνονται εκτός αυτού, σχηματίζοντας εξωμυελικές αλλοιώσεις (πλασματοκύττωμα) ή να γίνονται λευχαιμικά (πλασματοκυτταρική λευχαιμία) στα τελικά στάδια. Συγκεκριμένα, η πορεία της νόσου περιλαμβάνει τα εξής στάδια: 1. μετασχηματισμός των φυσιολογικών πλασματοκυττάρων σε ΜΓΑΣ, 2. εξέλιξη της ΜΓΑΣ σε πολλαπλούν μυέλωμα και 3. εξέλιξη σε εξωμυελική νόσο.

1.5.1 Παθογένεια και στάδια της νόσου

Τα πλασματοκύτταρα είναι τελικά διαφοροποιημένα Β-κύτταρα, τα οποία έχουν υποστεί σωματικές υπερμεταλλάξεις και επιλογή τάξης με αποτέλεσμα να αποκτούν την ικανότητα παραγωγής ειδικών ανοσοσφαιρινών κατά την έκθεσή τους σε αντιγόνα (Nutt et al., 2011; Pieper et al., 2013). Τα ενεργοποιημένα αυτά πλασματοκύτταρα σταματούν στη φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου και παραμένουν στο μυελό των οστών ως μακρόβια πλασματοκύτταρα ή στους λεμφαδένες ως Β-κύτταρα μνήμης μέχρι την επόμενη επαφή με τα αντιγόνα. Ως εκ τούτου, το αρχικό βήμα στην εξέλιξη του μυελώματος είναι να αποκτήσουν τα πλασματοκύτταρα ή Β-κύτταρα μνήμης πλεονέκτημα ανάπτυξης. Αυτή η διαδικασία ολοκληρώνεται μέσω της απορρύθμισης των κυκλινών D μέσω δύο μηχανισμών. Οι κυκλίνες D αποτελούν έναν κρίσιμο ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου και συγκεκριμένα του σημείου μετάβασης από τη φάση G1 στη φάση S. Η ρύθμιση αυτή πραγματοποιείται μέσω δύο μηχανισμών.

Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει τη δημιουργία συνεχών χρωμοσωμικών μεταθέσεων στο χρωμόσωμα 14q32 και συγκεκριμένα στο γονιδιακό τόπο της βαριάς αλυσίδας (IgH) (~50% των περιπτώσεων). Οι μεταθέσεις αυτές συμβαίνουν κυρίως κατά τις σωματικές υπερμεταλλάξεις και τον ανασυνδυασμό για επιλογή τάξης (Walker et al., 2013). Η πιο συχνή χρωμοσωμική μετάθεση είναι η t(11;14)(p13;q32) (~15-20% των περιπτώσεων) (González et al., 2007), ακολουθούμενη από τη t(4;14)(p16;q32) (~12-15% των περιπτώσεων) (Chesi et al., 1997). Έχει παρατηρηθεί ότι στα μυελωματικά κύτταρα που φέρουν τις χρωμοσωμικές μεταθέσεις t(11;14) και t(6;14), οι κυκλίνες D1 και D3 αντίστοιχα ενεργοποιούνται άμεσα από τον ενισχυτή της IgH (Bergsagel et al., 2005). Ακόμα, στα μυελωματικά κύτταρα που φέρουν τη γονιδιακή μετάθεση t(4;14) έχει παρατηρηθεί ότι η μεθυλοτρανσφεράση της ιστόνης (η οποία επηρεάζεται και αυτή από τον ενισχυτή της IgH) επάγει την υπερέκφραση της κυκλίνης D2 (Martinez-Garcia et al., 2011). Ομοίως, ενεργοποίηση του γονιδίου της κυκλίνης D2 παρατηρείται στα μυελωματικά κύτταρα με μετάθεση t(14;16) και t(14;20) από την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων Maf (Hurt et al., 2004).

Ο δεύτερος μηχανισμός της κακοήθους μεταλλαγής των πλασματοκυττάρων είναι η υπερδιπλοειδία, η οποία παρατηρείται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 55% των ασθενών. Συγκεκριμένα, η τρισωμία του χρωμοσώματος 11 καταλήγει σε ενισχυμένη έκφραση της κυκλίνης D1 εξαιτίας της αυξημένης ύπαρξης του γονιδίου της. Έτσι, η υπερέκφραση των γονιδίων της οικογένειας των κυκλινών D προσδίδουν πλεονέκτημα ανάπτυξης στα

μυελωματικά κύτταρα, καθώς επίσης επάγουν γενωμική αστάθεια που οδηγεί σε δευτερογενείς γενετικές ανωμαλίες (Smadja et al., 2001).

Παρόλα αυτά, για να εξελιχθεί η ΜΓΑΣ σε πολλαπλούν μύελωμα, απαιτείται περαιτέρω αύξηση του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των μυελωματικών κυττάρων, καθώς η διαδικασία αυτή, όπως αναφέρθηκε, χαρακτηρίζεται από ποσοτική αύξηση του αριθμού των κακόηθων πλασματοκυττάρων στο μυελό των οστών σε ποσοστό μεγαλύτερο του 10%. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται μέσω της ενεργοποίησης δύο μείζονος σημασίας ογκογονιδίων, των RAS και MYC. Το RAS γονίδιο υπόκειται σε σημειακές μεταλλαγές (Lohr et al., 2014), ενώ το MYC υπερεκφράζεται, πιθανώς λόγω ενισχυμένης ενεργοποίησης της μεταγραφής του (Loven et al., 2013). Σε επόμενο στάδιο, παρατηρείται απώλεια του χρωμοσώματος 13, ένα κρίσιμο γεγονός το οποίο συμβάλλει στην περαιτέρω εξέλιξη της νόσου εξαιτίας της απώλειας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου RB καθώς και εξαιτίας της υπομεθυλίωσης του DNA η οποία προκαλεί γενωμική αστάθεια (Chiecchio et al., 2009).

Το τελικό στάδιο της εξέλιξης σε πολλαπλούν μύελωμα χαρακτηρίζεται από την ικανότητα ανεξαρτητοποίησης των μυελωματικών κυττάρων από τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Αποτέλεσμα της προαναφερθείσας διεργασίας είναι η δημιουργία εξωμυελικής νόσου και πλασμοκυτταρικής λευχαιμίας εξαιτίας της ενεργοποίησης μεταλλαγμένων στοιχείων στο μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ (Demchenko et al., 2010), της δημιουργίας δομικών ανωμαλιών στο χρωμόσωμα που εντοπίζεται το C-MYC γονίδιο (Walker et al., 2014) καθώς και της απώλειας του 17p που καταλήγει σε απενεργοποίηση της p53 (Avet-Loiseau et al., 2012).

1.5.2 Πρωτεασωμική αναστολή στα πλασματοκύτταρα και στα μυελωματικά κύτταρα

Τα πλασματοκύτταρα εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών και διάφορες κυτταροκίνες απαραίτητες για τη διατήρηση των αλληλεπιδράσεων με τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών. Αυτές συσσωρεύονται κατά τη σύνθεσή τους, απαιτούν δίπλωμα, γλυκοζυλίωση και μεταφορά στο κατάλληλο υποκυτταρικό διαμέρισμα. Η σωστή λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών βασίζεται στην εύρυθμη λειτουργία τόσο του ER όσο και του πρωτεασώματος. Πράγματι, η προοδευτική μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος έχει συσχετισθεί με τη μειωμένη διάρκεια ζωής των πλασματοκυττάρων (Cenci et al., 2006). Συγκεκριμένα, σε μοντέλο ποντικού με ασθένεια που προσομοιάζει το συστηματικό ερυθματώδη λύκο έχει

δειχθεί ότι τόσο τα βραχείας όσο και τα μακράς διάρκειας μη κακοήγη πλασματοκύτταρα ήταν εξαιρετικά ευαίσθητα στη θεραπεία με πρωτεασωμικό αναστολέα. Ο κυτταρικός θάνατος στο μοντέλο αυτό φαίνεται πως επάγεται κατά κύριο λόγο μέσω του UPR (Neubert et al., 2008).

Το UPR είναι ένα σηματοδοτικό μονοπάτι του ER που ενεργοποιείται από τη συσσώρευση μη διπλωμένων πρωτεϊνών σε αυτό και το κυτοσόλιο. Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα εξαιρετικό σύστημα αποικοδόμησης πρωτεϊνών συσχετιζόμενο με το ER (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation, ERAD), με τη βοήθεια του οποίου οι μη σωστά διπλωμένες πρωτεΐνες αποβάλλονται από αυτό, ουβικιτινιλιώνονται και υπόκεινται σε πρωτεόλυση μέσω του πρωτεασώματος. Παράλληλα, το κύτταρο οδηγείται βαθμιαία στη μείωση της πρωτεϊνικής σύνθεσης, στην αύξηση της έκφρασης των μοριακών συνοδών και των συστατικών του πρωτεασώματος, με στόχο την πρόληψη της συσσώρευσης των μη σωστά διπλωμένων πρωτεϊνών. Αυτό επιτρέπει προσωρινά στο κύτταρο να ανταπεξέλθει στο επιβλαβές περιβαλλοντικό στρες και να επιβιώσει. Ωστόσο, αν το στρες είναι έντονο ή παρατεταμένο, όπως συμβαίνει στη θεραπεία με πρωτεασωμικούς αναστολείς, η ενεργοποίηση του UPR οδηγεί σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου και επαγωγή της απόπτωσης (Brewer et al., 2000).

Η επίδραση της αναστολής του πρωτεασώματος στα κακοήγη πλασματοκύτταρα περιλαμβάνει επίσης και μείωση της ρύθμισης του αντι-αποπτωτικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ. Η δράση του στα μυελωματικά κύτταρα προωθεί την επιβίωση και την ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία και τις ακτινοβολίες, επάγοντας με αυτόν τον τρόπο την έκφραση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, μορίων προσκόλλησης, αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών όπως η IL-6. Ο NF-κΒ υπό φυσιολογικές συνθήκες παραμένει αδρανής στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένος με ανασταλτικές πρωτεΐνες που καλούνται IκΒ (Inhibitor of κΒ). Η ενεργοποίηση του NF-κΒ απαιτεί την αποικοδόμηση του IκΒ από το πρωτεάσωμα έπειτα από την πολυουβικιτινίωση του από την κινάση του αναστολέα του NF-κΒ (IKK). Έτσι ο μεταγραφικός παράγοντας απελευθερώνεται και ενεργοποιείται η μεταγραφή των γονιδίων που ελέγχει. Εντούτοις η ειδική αναστολή του NFκΒ σε μυελωματικά κύτταρα οδήγησε σε μερική αναστολή του πολλαπλασιαστικού δυναμικού των κυττάρων (20-50%), υποδεικνύοντας ότι η ευαισθησία των μυελωματικών κυττάρων στους πρωτεασωμικούς αναστολείς οφείλεται επίσης και σε άλλους παράγοντες όπως η ύπαρξη υψηλών επιπέδων παραπρωτεϊνών (απόπτωση μέσω UPR) (Bianchi et al., 2009; Hideshima et al., 2007; Meister et al., 2007).

Ειδικότερα, έχει φανεί πως τα μυελωματικά κύτταρα εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έκφρασης μοριακών συνοδών του ER όπως οι HSP70, HSP90 (Obeng et al., 2006). Η HSP90 μαζί με άλλες κυτοσολικές και μιτοχονδριακές μοριακές συνοδούς καθώς και μεταβολικά ένζυμα παίρνουν μέρος στην ενεργοποίηση των B-κυττάρων σε πλασματοκύτταρα για την παραγωγή αντισωμάτων (van Anken et al., 2003). Η HSP70 από την άλλη έχει δείχθει ότι συνδέεται στη βαριά αλυσίδα των ανοσοσφαιρινών και βοηθάει στη σύνδεσή της με την ελαφριά, συμβάλλοντας έτσι στο σχηματισμό των ανοσοσφαιρινών. Τόσο η HSP70 όσο και η HSP90 συμβάλλουν στη στόχευση των αδέσμευτων υπομονάδων των ανοσοσφαιρινών προς αποικοδόμηση.

1.6 Πρωτεασωμικοί αναστολείς στη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος

Οι πρωτεασωμικοί αναστολείς μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες σύμφωνα με τον τρόπο σύνδεσής τους (ομοιοπολικός ή μη) στο ενεργό κέντρο του πρωτεασώματος. Οι μη ομοιοπολικοί αναστολείς δε χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, ενώ μόνο τρεις από τους οκτώ δομικά διαφορετικούς ομοιοπολικούς αναστολείς έχουν εγκριθεί από το FDA (Food and Drug Administration), οι οποίοι βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια της κλινικής ανάπτυξης. Αυτοί είναι τα βορονικά πεπτίδια, οι εποξυκετόνες και οι β-λακτόνες (Kisselev et al., 2012).

1.6.1 Βορτεζομίμη (Bortezomib, BTZ)

Το BTZ είναι ο πρώτης γενιάς πρωτεασωμικός αναστολέας που εγκρίθηκε από το FDA και από το EMA (European Medicines Agency) για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος το 2003 και το 2004 αντίστοιχα. Πρόκειται για ένα βορονικό διπεπτίδιο που δεσμεύεται και αναστέλλει αντιστρεπτά τη β5 καταλυτική υπομονάδα του πρωτεασώματος στην οποία εδράζεται η ενεργότητα χυμοθρυψίνης (ή της β5i υπομονάδας του ανοσοπρωτεασώματος αντίστοιχα) και σε μικρότερο βαθμό τη β1 και β2 υπομονάδες με ενεργότητα κασπάσης και θρυψίνης αντίστοιχα. Η ακριβής φαρμακοκινητική του BTZ σε ασθενείς με πολλαπλούν μύελωμα δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Ειδικότερα, έπειτα από ενδοφλέβια (IV) χορήγηση, το φάρμακο διανέμεται γρήγορα στους ιστούς μέσω του πλάσματος. Ο χρόνος ημιζωής της διανομής του BTZ είναι λιγότερος από 10 λεπτά, ενώ ο χρόνος ημιζωής της αποβολής του είναι περισσότερο από 40 ώρες (Cengiz Seval and Beksac,

2018). Η δράση του αναστολέα BTZ έχει συσχετισθεί με το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ, τον αποπτωτικό θάνατο, τον κυτταρικό κύκλο και την κυτταρική μετανάστευση (Kubiczkova et al., 2014). Όσον αφορά στο μονοπάτι του NF-κΒ, το BTZ όπως προαναφέρθηκε έχει την ικανότητα να αναστέλλει την ενεργοποίηση του μεταγραφικού αυτού παράγοντα επιβίωσης, μέσω σταθεροποίησης του αναστολέα του ΙκΒ. Συγκεκριμένα, ο NF-κΒ εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ως ένα αδρανές σύμπλοκο με τον ΙκΒ. Καθώς το BTZ προκαλεί αναστολή της λειτουργίας του πρωτεασώματος, δεν επιτρέπει την αποικοδόμηση του ΙκΒ και κατά συνέπεια εμποδίζει τη μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ στον πυρήνα και την πρόσδεση στους υποκινητές των γονιδίων στόχων (Li et al., 2010).

Κλινικά, οι ασθενείς που λαμβάνουν το BTZ ως μέρος της θεραπείας τους παρουσιάζουν καλύτερα ποσοστά απόκρισης, σημαντική μείωση του όγκου, βελτίωση στην ελεύθερη νόσου επιβίωση (Progression free survival, PFS) και στην ολική επιβίωση (overall survival). Ωστόσο, ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας στη χορήγησή του είναι η περιφερική νευροπάθεια, η οποία μπορεί να φτάνει το 80% σε συνδυασμό με ανοσορρυθμιστικά φάρμακα (Richardson et al., 2010). Η προαναφερθείσα παρενέργεια οφείλεται στο ότι το BTZ πέραν της πρωτεασωμικής αναστολής που προκαλεί, αναστέλλει επίσης και διάφορες πρωτεάσες σερίνης, μία εκ των οποίων εμπλέκεται στην επιβίωση των νευρικών κυττάρων (Arastu-Kapur et al., 2011). Η σχετιζόμενη με το BTZ νευροπάθεια μπορεί εν μέρει να περιορισθεί αλλάζοντας το θεραπευτικό σχήμα και την οδό χορήγησης χωρίς να επηρεάζεται παράλληλα και η δράση του (Moreau et al., 2011; Wang et al., 2012).

Παρόλο που η αναστολή του πρωτεασώματος αποδείχθηκε ότι είναι αποτελεσματική στο πολλαπλούν μυέλωμα, ορισμένοι ασθενείς αναπτύσσουν ανθεκτικότητα. Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες του φαινομένου αυτού. Αναλυτικότερα, μεταξύ άλλων φαίνεται πως η χορήγηση πρωτεασωμικών αναστολέων οδηγεί σε ενεργοποίηση της αυτοφαγίας με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και την αποικοδόμησή τους μέσω του λυσοσώματος (Zeng et al., 2012). Ένας επιπρόσθετος μηχανισμός ανάπτυξης ανθεκτικότητας στους πρωτεασωμικούς αναστολείς είναι η αυξημένη λειτουργία πρωτεϊνών όπως η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη ή η MDR1 (multidrug resistance protein 1), οι οποίες αποτελούν μεμβρανικούς μεταφορείς που οδηγούν τις ξένες προς τον οργανισμό ουσίες εκτός κυττάρου (de Jong et al., 2001). Τέλος, η αυξημένη έκφραση των HS πρωτεϊνών (heat shock proteins) ωθούν τα μυελωματικά κύτταρα στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αυτό το είδος φαρμάκων (Chauhan et al., 2003; Papanagnou et al., 2018). Για το λόγο αυτό νέοι

πρωτεασωμικοί αναστολείς που υπερνικούν αυτούς τους περιορισμούς και προκαλούν λιγότερες παρενέργειες αναπτύσσονται συνεχώς. Επιπλέον, νέοι στόχοι όπως η HDAC6 πρωτεΐνη (histone deacetylase 6) που διαδραματίζει βασικό ρόλο στην απομάκρυνση των συσσωματωμάτων ανακαλύπτονται, οι αναστολείς των οποίων μπορούν να συνδυαστούν με το BTZ και να ενισχύσουν τη δράση του (Badros et al., 2009; Parapanagou et al., 2018).

1.6.2 Καρφυλζομίμπη (Carfilzomib, CFZ)

Το CFZ είναι πρωτεασωμικός αναστολέας δεύτερης γενιάς που εγκρίθηκε από το FDA και από το EMA για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος το 2012 και το 2016 αντίστοιχα. Πρόκειται για ένα τετραπεπτίδιο εποξυκετόνης (μη αντιστρεπτός πρωτεασωμικός αναστολέας), το οποίο διαφέρει δομικά και μηχανιστικά από το διπεπτίδιο βορονικού οξέος του BTZ (Arastu-Kapur et al., 2011). Οι εποξυκετόνες είναι παράγωγα της εποξομικίνης, ενός φυσικού προϊόντος που απομονώνεται από τον ακτινομύκητα και σχηματίζει ένα μη αντιστρεπτό, και ιδιαίτερα ειδικό προϊόν, με το αμινοτελικό κατάλοιπο θρεονίνης της β5 υπομονάδας με ενεργότητα χυμοθρυψίνης του 20S πρωτεασώματος, (Meng et al., 1999). Μελέτες φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής έδειξαν ότι το CFZ μεταβολίζεται ταχέως σε ανενεργούς μεταβολίτες και ότι ο μέσος χρόνος ημιζωής του είναι κάτω από 30 λεπτά. (Alsina et al., 2012; O'Connor et al., 2009). Παρόλο που και το BTZ αναστέλλει την ενεργότητα χυμοθρυψίνης με παρόμοια δραστηριότητα, το CFZ εμφανίζει υψηλότερη ειδικότητα, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών (Groen et al., 2019). Σε αντίθεση με το BTZ, το CFZ έχει μικρότερη επίδραση στις ενεργότητες θρυψίνης και κασπάσης του πρωτεασώματος (Demo et al., 2007). Σε πειράματα *in vitro*, φάνηκε ότι το CFZ επάγει την απόπτωση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές (Demo et al., 2007) και αναστέλλει την πρωτογενή οξεία μυελογενή λευχαιμία (Starnes et al., 2007). Επίσης, έχει δείχθει πως είναι ικανό να επάγει την απόπτωση σε μυελωματικές κυτταρικές σειρές και σε μυελωματικά κύτταρα ασθενών με υποτροπιάζον πολλαπλούν μυέλωμα, στους οποίους είχε χορηγηθεί πρώτα BTZ ή κάποια άλλη θεραπεία (Kuhn et al., 2007). Συμπερασματικά, τα προαναφερθέντα αποτελέσματα σε συνδυασμό και με άλλες σχετικές μελέτες συνηγορούν στο ότι το CFZ πλεονεκτεί σε ότι αφορά την αποτελεσματικότητα και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε σύγκριση με το BTZ (Groen et al., 2019; Yang et al., 2011).

1.6.3 Οι παρενέργειες της χορήγησης του Bortezomib και Carfilzomib στην κλινική

Το πολλαπλούν μυέλωμα όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι μια κακοήθης νεοπλασία, οι κλινικές εκδηλώσεις του οποίου περιλαμβάνουν τον οστικό πόνο που οφείλεται στην οστεόλυση, υπερασβεστιαμία, αναιμία και νεφρική ανεπάρκεια. Οι αναστολές πρωτεασώματος έχουν βελτιώσει σημαντικά την ολική επιβίωση των ασθενών που πάσχουν από πολλαπλούν μυέλωμα, παρέχοντας κυρίως μια αποτελεσματική θεραπευτική επιλογή για το υποτροπιάζον και ανθεκτικό πολλαπλούν μυέλωμα. Παρόλο που το BTZ και CFZ ανήκουν και τα δύο στην κατηγορία των πρωτεασωμικών αναστολέων διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά τις μη αιματολογικές παρενέργειες τους (Heckmann et al., 2018).

1.6.3.1 Οι σημαντικότερες παρενέργειες της χορήγησης του Bortezomib

Οι συνήθεις παρενέργειες της χορήγησης του θεραπευτικού αναστολέα BTZ μεταξύ άλλων είναι κόπωση, ναυτία, διάρροια, θρομβοπενία, ανορεξία, περιφερική νευροπάθεια, έμετος, πυρεξία, αναιμία (χαμηλός αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων), περιφερικό οίδημα και δύσπνοια (Jagannath et al., 2008; Richardson et al., 2003). Η περιφερική νευροπάθεια είναι μία από τις σημαντικότερες επιπλοκές της θεραπείας με BTZ επηρεάζοντας αρνητικά την ποιότητα ζωής των ασθενών και τις καθημερινές δραστηριότητες. Μπορεί να προκληθεί από την ίδια την ασθένεια, είτε λόγω της επίδρασης της υψηλής συγκέντρωσης μονοκλωνικής πρωτεΐνης, είτε υπό τη μορφή ριζοπάθειας που προκαλείται από ορισμένες θεραπείες, συμπεριλαμβανομένου και του BTZ. Η κλινική αξιολόγηση έδειξε ότι έως και το 20% των ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα εμφανίζουν περιφερική νευροπάθεια στη διάγνωση και έως και το 75% μπορεί να την παρουσιάσει κατά τη διάρκεια της θεραπείας (Field-Smith et al., 2006). Η διαταραχή των νεύρων μπορεί να εξελιχθεί προοδευτικά και χαρακτηρίζεται από υπεραισθησία, υποαισθησία, παραισθησία, νευροπαθητικό πόνο και/ή αδυναμία (Cengiz Seval and Beksac, 2018). Οι λιγότερο συνήθεις επιπλοκές από τη θεραπεία με τον θεραπευτικό αναστολέα BTZ περιλαμβάνουν την καρδιακή ανεπάρκεια, καρδιακή προσβολή, θωρακικό άλγος, δυσφορία στο στήθος, αυξημένο ή μειωμένο καρδιακό ρυθμό, ανεπαρκή κυκλοφορία κ.α. (European Medicines Agency-Europa EU).

1.6.3.2 Οι σημαντικότερες παρενέργειες της χορήγησης του Carfilzomib

Οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χορήγηση του CFZ (επηρεάζει περισσότερους από 1/5 ανθρώπους) είναι μεταξύ άλλων η αναιμία, κόπωση, ναυτία, διάρροια, θρομβοπενία, πυρεξία, δύσπνοια (δυσκολία στην αναπνοή), βήχας και η ουδετεροπενία (χαμηλά επίπεδα ουδετερόφιλων, ένας τύπος λευκών αιμοσφαιρίων). Οι πιο σοβαρές παρενέργειες περιλαμβάνουν τοξικές επιδράσεις στην καρδιά (Heckmann et al., 2018), τους πνεύμονες, το ήπαρ και υπέρταση (European Medicines Agency-Europa EU).

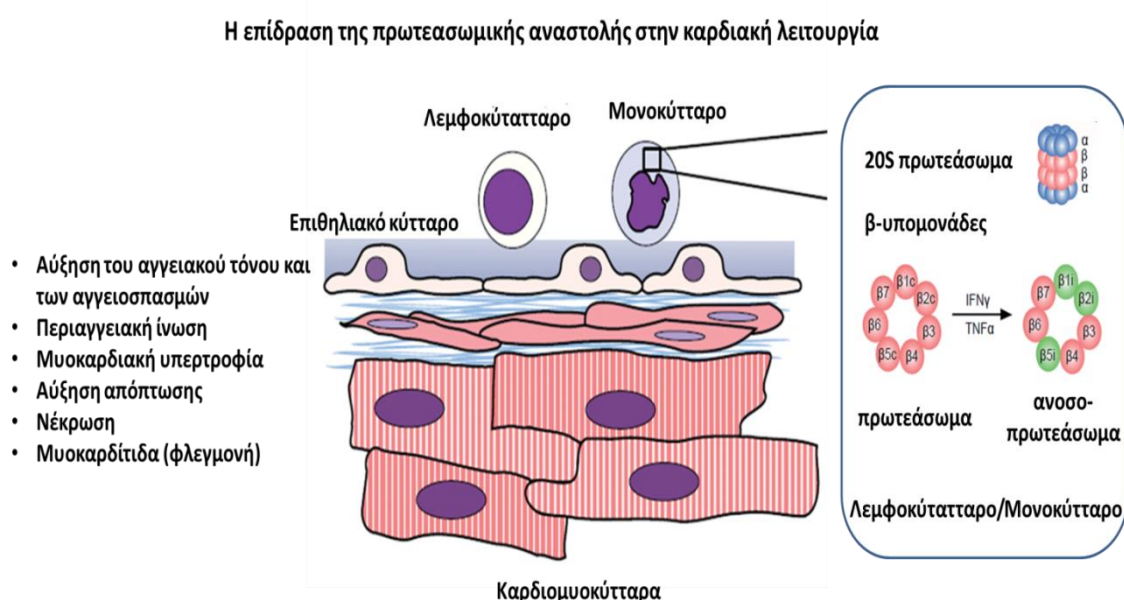
1.6.3.3 Καρδιοτοξικότητα, σύγκριση των δύο αναστολέων

Το 2003 ο FDA ενέκρινε τη χορήγηση του BTZ για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος βασιζόμενος σε δεδομένα της κλινικής μελέτης SUMMIT (φάσης II) (Richardson et al., 2003). Η μερικώς αναστρέψιμη νευροτοξικότητα αναφέρθηκε ως η κύρια μη αιματολογική παρενέργεια (Richardson et al., 2005; Richardson et al., 2009), ενώ οι καρδιαγγειακές επιπλοκές δεν εκτιμήθηκαν. Η κλινική μελέτη APEX ήταν η πρώτη που εκτίμησε τις επιπλοκές που επιφέρει η αναστολή του πρωτεασώματος στην καρδιά. Αυτή η μελέτη έδειξε παρόμοια ποσοστά καρδιολογικών συμβάντων μεταξύ της ομάδας ασθενών που έλαβε και της ομάδας που δεν έλαβε το θεραπευτικό αναστολέα BTZ (Richardson et al., 2005). Το 2012 σημαντική βελτίωση στα ποσοστά απόκρισης στη θεραπεία σε σύγκριση με το BTZ, οδήγησε τον FDA να δώσει έγκριση για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος στον πρωτεασωμικό αναστολέα CFZ (Dimopoulos et al., 2016; Stewart et al., 2015). Παρόλα αυτά, αποτελέσματα της κλινικής μελέτης ASPIRE έδειξαν αύξηση της υπέρτασης καθώς και των περιστατικών καρδιακής ανεπάρκειας και ισχαιμικής καρδιοπάθειας έπειτα από θεραπεία με CFZ. Για το λόγο αυτό απαιτήθηκε η διεξαγωγή και άλλης δοκιμής που θα παρακολουθούσε στενά σημαντικές αλλαγές στην καρδιακή λειτουργία ασθενών που δέχονται θεραπεία με πρωτεασωμικούς αναστολείς. Ακολούθως η κλινική μελέτη ENDEAVOR αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια τόσο του CFZ (ομάδα 464 ασθενών) όσο και του BTZ (ομάδα 465 ασθενών). Τα ποσοστά απόκρισης στη θεραπεία αλλά και των καρδιολογικών ανεπιθύμητων ενεργειών (υπέρταση και συγκοπτικά επεισόδια) ήταν σημαντικά υψηλότερα στο βραχίονα της ομάδας CFZ, ενώ τα ποσοστά νευροτοξικών παρενεργειών εμφανίσθηκαν κυρίως στο βραχίονα της ομάδας BTZ (Dimopoulos et al., 2016).

1.6.3.4 Πρωτεάσωμα και πρωτεοτοξικό στρες στα καρδιομυοκύτταρα

Το πρωτεάσωμα όπως περιγράφηκε και σε παραπάνω ενότητα είναι ένα κυτταρικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο υπεύθυνο για την ανακύκλωση των πρωτεϊνών. Εντοπίζονται ευρέως στο κυτοσόλιο και στον πυρήνα όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Στο κυτοσόλιο, τα πρωτεασώματα συνδέονται με τα κεντροσώματα, τον κυτταροσκελετό, και την εξωτερική επιφάνεια του ER. Στον πυρήνα, τα πρωτεασώματα υπάρχουν σε ολόκληρη την περιοχή του νουκλεοπλάσματος εκτός του πυρηνίσκου (Brooks et al., 2000; Powell, 2012). Το πρωτεάσωμα όπως έχει ήδη αναφερθεί υπάρχει σε όλους τους τύπους κυττάρων. Στα λεμφοκύτταρα και στα μονοκύτταρα, οι πρωτεΐνες IFN- γ και TNF- α ενεργοποιούνται και οδηγούν στο σχηματισμό των ανοσοπρωτεασωμάτων, όπου οι υπομονάδες $\beta 1$, $\beta 2$ και $\beta 5$ αντικαθίστανται από τις $\beta 1i$, $\beta 2i$ και $\beta 5i$ (Εικ. 1.5). Το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος είναι το κύριο πρωτεολυτικό μονοπάτι στην καρδιά (Cui et al., 2014). Έως και 30% των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών αποκτούν λανθασμένη διαμόρφωση εξαιτίας εσφαλμένου διπλώματος και για το λόγο αυτό αποικοδομούνται από το πρωτεάσωμα λίγο μετά από τη σύνθεσή τους (Schubert et al., 2000). Δυσλειτουργία αυτού του πρωτεολυτικού μονοπατιού έχει συνδεθεί με καρδιαγγειακές παθήσεις όπως υπερτροφία, αθηροσκλήρωση, καρδιομυοπάθεια, ισχαιμία του μυοκαρδίου, βλάβη επαναϊμάτωσης, καρδιακή ανεπάρκεια κ.α. (Day, 2013; Predmore et al., 2010; Su and Wang, 2010). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η δράση του πρωτεασώματος είναι αρκετά υψηλή στον καρδιακό και νεφρικό ιστό (Patel and Majetschak, 2007). Αυτό δεν αποτελεί έκπληξη, διότι τα κύτταρα που δεν πολλαπλασιάζονται πρέπει να ελέγχουν αυστηρά την ανακύκλωση των πρωτεϊνών τους. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η συγκέντρωση του CFZ στην καρδιά είναι επίσης υψηλή οδηγώντας σε ισχυρή αναστολή του πρωτεασώματος στα καρδιομυοκύτταρα, όπως υπέδειξαν τα αρχικά δεδομένα της έγκρισης από το FDA. Επιπλέον, διάφορες μελέτες υποδεικνύουν πως η αναστολή είναι ισχυρότερη από ότι στα στοχευθέντα κύτταρα του μυελού των οστών [Δες TR-0018-171/TXC-004/TR-0011-171/TXC-003/TR-0046-171-PD σε FDA: 202714Orig1s000 PHARMACOLOGY REVIEW(s)]. Επίσης δεδομένα σε πιθήκους στους οποίους χορηγήθηκαν επαναλαμβανόμενες δόσεις CFZ, πάνω από 1mg/kg σωματικού βάρους, έδειξαν πως τα ζώα ανέπτυξαν αυξημένη υπόταση και αυξημένα επίπεδα τροπονίνης T (δείκτης εμφράγματος) στον ορό. Οι ιστοπαθολογικές αναλύσεις έδειξαν την παρουσία φλεγμονής, υπερτροφίας των καρδιομυοκυττάρων και εκφυλισμό του μυοκαρδίου [Δες FDA: 202714Orig1s000 MEDICAL REVIEW(s) Section 4.3]. Ταυτόχρονα με τη δυσλειτουργία των κυττάρων της καρδιάς έχει παρατηρηθεί επίσης και ενδοθηλιακή

δυσλειτουργία μετά από αγωγή με CFZ, η οποία οδηγεί σε αύξηση του αγγειακού τόνου και των αγγειοσπασμών. Οι διαταραχές αυτές μπορούν να αντιστραφούν εν μέρει μόνο με την εφαρμογή νιτρικών και ανταγωνιστών ασβεστίου. Συμπερασματικά, οι παραπάνω παρατηρήσεις εξηγούν την εμφάνιση υπέρτασης, της πιο συχνής καρδιαγγειακής παρενέργειας και ίσως σε κάποιο βαθμό την αύξηση των περιστατικών με έμφραγμα του μυοκαρδίου (Chen-Scarabelli et al., 2017; Herrmann, 2013). Επιπρόσθετα, οι αναστολείς πρωτεασώματος (το CFZ αλλά και σε μικρότερο βαθμό και το BTZ), που χορηγούνται σε θεραπευτικές δόσεις, έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνουν τη συγκέντρωση των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών, υποδεικνύοντας ενδοκυτταρική συσσώρευση λανθασμένων και πιθανά τοξικών πρωτεϊνών. Επίσης, ενεργοποιούν μόρια όπως το Akt και το μονοπάτι NFAT-καλσινευρίνης, οδηγώντας έτσι το μυοκάρδιο σε υπερτροφία. Αυτή η αύξηση των ενδοκυτταρικών ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών επηρεάζει περαιτέρω την ενδοκυτταρική σηματοδότηση, προκαλώντας μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και δομικών αλλαγών. Τέλος, οι αλλαγές αυτές οδηγούν σε αύξηση της απόπτωσης, της νέκρωσης και της απελευθέρωσης της καρδιακής τροπονίνης (Εικ. 1.5) (Komander, 2009; Zhang et al., 2017).



Εικόνα 1.5. Η επίδραση της αναστολής του πρωτεασώματος στην καρδιακή λειτουργία. 1. Οι παθολογικές αλλαγές, που σχετίζονται με τη χορήγηση CFZ (αριστερή πλευρά), 2. σχηματική αναπαράσταση των εμπλεκόμενων κυτταρικών τύπων (μεσαίο), 3. σχηματική αναπαράσταση του 20S πρωτεασώματος (δεξιά πλευρά), με τις διαφορές μεταξύ του πρωτεασώματος και του ανοσοπρωτεασώματος που ανευρίσκεται στα TNF- α ή IFN- γ ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα όπως υποδεικνύεται (προσαρμογή από Heckmann et al., 2018).

1.6.3.5 Καρδιοπροστατευτικές στρατηγικές στη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος

Λαμβάνοντας υπόψιν τις σοβαρές καρδιακές επιπλοκές που επιφέρει η θεραπεία με πρωτεασωμικούς αναστολείς, στρατηγικές καρδιοπροστατευτικής δράσης αναπτύσσονται και εξετάζονται σε προκλινικές μελέτες, οι οποίες περιλαμβάνουν τη συγχορήγηση του θεραπευτικού αναστολέα με μόρια όπως η δεξαζοζάνη (dexrazoxane) (Hasinoff et al., 2017). Ο βασικός μηχανισμός της καρδιοπροστατευτικής δράσης αυτού του χηλικοποιητή δεν είναι πλήρως κατανοητός. Μόρια επίσης που βρίσκονται σε κλινικές μελέτες και εξετάζονται για τη συγχορήγηση τους με πρωτεασωμικούς αναστολείς είναι το rutin, το οποίο έχει την ικανότητα δέσμευσης του NO, μειώνοντας τα επίπεδα ROS των κυττάρων (Imam et al., 2017) και το apremilast, ένας αναστολέας φωσφοδιεστεράσης 4, ο οποίος μειώνει την έκκριση του TNF-α (Imam et al., 2019).

Τέλος, άλλο μόριο με πιθανή προστατευτική δράση ενάντια στην καρδιοτοξικότητα που επιφέρουν οι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες και θα μπορούσε να εφαρμοσθεί στην κλινική αποτελεί η Μετφορμίνη (MET). Πρόκειται για ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και έχει προταθεί η συγχορήγησης της με χημειοθεραπευτικά μόρια όπως δοξορουβικίνη ή CFZ με στόχο τη μείωση των καρδιοτοξικών παρενεργειών της θεραπείας (Ashour et al., 2012; Efentakis et al., 2019).

1.7 Μετφορμίνη (Metformin, MET)

Η MET είναι ένα φάρμακο με πλειοτροπική δράση. Συμμετέχει στην ομοιόσταση της γλυκόζης, κυρίως μέσω της αναστολής της παραγωγής της στο ήπαρ (Li et al., 2018). Επίσης, τροποποιεί την παραγωγή ROS στο κύτταρο. Ιστορικά, η προέλευση της MET (διμεθυλοδιαγουινιδίνη) εντοπίζεται στο μεσαίωνα, όπου οι μεσαιωνικοί γιατροί χρησιμοποιούσαν εκχύλισμα από το φυτό *Galega officinalis* για θεραπεία διαφόρων ασθενειών (Witters, 2001). Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, βρέθηκε πως το φυτό αυτό είναι εμπλουτισμένο με γουανιδίνη, ένα ενεργό συστατικό το οποίο αργότερα αναφέρθηκε ότι έχει αντι-υπεργλυκαιμικές ιδιότητες. Η MET η οποία ανήκει στις διγουανίδες είναι το μοναδικό μέλος της οικογένειας αυτής που χρησιμοποιείται στη θεραπεία διαβήτη τύπου 2 λόγω της αποτελεσματικότητάς της στη μείωση της επίδρασης της γλυκόζης και της μείωσης του ρίσκου εμφάνισης υπογλυκαιμικού επεισοδίου (Lu et al., 2019).

1.7.1 Η δράση της Μετφορμίνης

Όπως πολλά άλλα φάρμακα η επίδραση της MET στηρίζεται στα μοναδικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της, τα οποία περιλαμβάνουν υψηλή υδροφιλικότητα, ικανότητα δέσμευσης σε μέταλλα και pKa σε φυσιολογικό εύρος pH, υποδηλώνοντας ότι το μόριο υπάρχει αποκλειστικά στη θετικά φορτισμένη μορφή του κατιόντος (Graham et al., 2011). Λόγω της χαμηλής λιποφιλικότητας, η MET δε διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη με παθητική διάχυση και η διασπορά της στηρίζεται σε ιστοειδικούς υποδοχείς. Ειδικότερα, λειτουργεί μειώνοντας την εντερική απορρόφηση της γλυκόζης και βελτιώνοντας την απορρόφηση της στην περιφέρεια, ενώ παράλληλα μειώνει τα επίπεδα της ινσουλίνης στο πλάσμα σε περιόδους νηστείας και αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα χωρίς να προκαλείται υπογλυκαιμία (Grzybowska et al., 2011). Επιπλέον, το μόριο αυτό μπορεί να αναστείλει τη γλυκονεογένεση με την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης AMPK (Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase) (Matthaei and Greten, 1991). Η AMPK είναι μία πρωτεϊνική κινάση σημαντική στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού και διαδραματίζει καίριο ρόλο στο διαβήτη και σε άλλες μεταβολικές παθήσεις. Έχει αποδειχθεί ότι απαιτείται για τη διατήρηση της ομοιοστασίας της γλυκόζης (Zhang et al., 2009). Οι πιο συχνές παρενέργειες της MET είναι οι γαστρεντερικές διαταραχές (συχνότητα εμφάνισης 20%-30%), συμπεριλαμβανομένης της ναυτίας και του εμέτου (Wang et al., 2017), με πιο σοβαρή παρενέργεια τη γαλακτική οξέωση (συχνότητα εμφάνισης 1/30.000) κυρίως σε διαβητικούς ασθενείς με ηπατική και νεφρική δυσλειτουργία (Salpeter et al., 2006).

Δεδομένου ότι η χρήση της MET στο σακχαρώδη διαβήτη πραγματοποιείται για περισσότερο από 50 χρόνια, πολυάριθμες μελέτες έχουν προκύψει σχετικά με άλλες πιθανές δράσεις της, οι οποίες έδειξαν ότι μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως αντικαρκινικός, νευροπροστατευτικός, αντιγηραντικός και καρδιοπροστατευτικός παράγοντας (Wang et al., 2017).

1.7.2 Ο πιθανός καρδιοπροστατευτικός ρόλος της Μετφορμίνης

Η στεφανιαία νόσος είναι από τις κυριότερες αιτίες θνησιμότητας και νοσηρότητας παγκοσμίως με τεράστιες οικονομικές επιπτώσεις στην κοινωνία (Benjamin et al., 2018). Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου είναι πολλαπλοί, μερικοί εκ των οποίων είναι το κάπνισμα, η παχυσαρκία, η υπέρταση και η υψηλή χοληστερόλη στο αίμα. Ο σακχαρώδης διαβήτης θεωρείται ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου στην ανάπτυξη στεφανιαίας νόσου. Το μεγαλύτερο ποσοστό των διαβητικών ασθενών υφίσταται καρδιαγγειακές επιπλοκές (Benjamin et al., 2017; Wang et al., 2017), συμπεριλαμβανομένων μακροαγγειακών επιπλοκών (όπως εγκεφαλικό επεισόδιο, ασθένεια στεφανιαίων αρτηριών και έμφραγμα του μυοκαρδίου) και μικροαγγειακών επιπλοκών (όπως νεφρική νόσο, βλάβη του αμφιβληστροειδούς και νόσο περιφερικού νεύρου). Η MET έχειδειχθεί ότι ασκεί ευεργετικά αποτελέσματα στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων. Οι παράγοντες κινδύνου καρδιαγγειακών παθήσεων περιλαμβάνουν δυσλιπιδαιμία, παχυσαρκία, υπέρταση, ανοχή στην ινσουλίνη κ.α. Συγκεκριμένα, η MET έχει φανεί ότι μπορεί να βελτιώσει το μεταβολισμό των λιπών και να μειώσει το επίπεδο της LDL χοληστερόλης με την ενεργοποίηση της AMPK (Seifarth et al., 2013). Επίσης η δράση της έχει συσχετισθεί με απώλεια βάρους ή με μικρότερη αύξηση βάρους, μηχανισμός του οποίου θεωρείται ότι είναι η μειωμένη αίσθηση πείνας με αποτέλεσμα τη μειωμένη λήψη θερμίδων (Fontbonne et al., 2009; Malin et al., 2013). Επιπλέον, πρόσφατη μετα-ανάλυση έδειξε ότι η MET μειώνει αποτελεσματικά τη συστολική αρτηριακή πίεση σε μη διαβητικούς ασθενείς (Zhou et al., 2017). Οι πιθανοί μηχανισμοί μείωσης της αρτηριακής πίεσης από τη χορήγηση MET περιλαμβάνουν τη μείωση της ανοχής στην ινσουλίνη και την ινσουλίνη πλάσματος, απενεργοποίηση αδρενεργικού υποδοχέα, ελάττωση του ενδοκυτταροπλασματικού ασβεστίου, αναστολή της συμπαθητικής οδού (ειδικά σε συνθήκες υψηλής πρόσληψης άλατος μέσω της διατροφής) και αύξηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και απέκκρισης νατρίου (Thomopoulos et al., 2017).

1.7.3 Η Μετφορμίνη ενεργοποιεί την AMPK

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών υποδεικνύουν ότι η πλειοτροπική δράση της MET βασίζεται στην ενεργοποίηση AMPK. Πρόκειται για μια σημαντική κινάση σερίνη-θρεονίνης με δομή τριών υπομονάδων (α , β , γ), που παίζει κρίσιμο ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό.

Η αύξηση του λόγου μεταξύ της ενδοκυτταρικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) και τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) (AMP/ATP), όπως κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης, υποξίας ή υποσιτισμού, ενεργοποιεί την AMPK μέσω φωσφορυλίωσης μιας θρεονίνης (στο 172° αμινοξύ) της υπομονάδας α. Μετά την ενεργοποίησή της, η AMPK κλείνει τις οδούς κατανάλωσης ATP και οδηγεί σε καταβολικές οδούς παραγωγής ATP μέσω καταρροϊκής σηματοδότησης και ενεργοποίησης των μορίων-στόχων της (Ruderman et al., 2013; Steinberg and Kemp, 2009). Εκφράζεται σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος, του εγκεφάλου και του σκελετικού μυός. Η κυρίως δράση της στα ηπατικά κύτταρα είναι η αύξηση της οξειδώσεως των λιπαρών οξέων και της κετογένεσης, στους σκελετικούς μύες η αύξηση της οξειδώσεως των λιπαρών οξέων και της πρόσληψης της γλυκόζης, στα λιποκύτταρα η αναστολή της λιπογένεσης, της σύνθεσης τριγλυκεριδίων και η ενεργοποίηση της λιπολύσεως. Τέλος, στα παγκρεατικά βήτα κύτταρα η δράση της επικεντρώνεται στην αύξηση της έκκρισης της ινσουλίνης.

1.7.3.1 Η AMPK στις καρδιαγγειακές νόσους

Η AMPK παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην εύρυθμη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος μειώνοντας το οξειδωτικό στρες και ρυθμίζοντας την αυτοφαγία και την απόπτωση στα καρδιομυοκύτταρα.

1.7.3.2 Η AMPK μειώνει το οξειδωτικό στρες στον ενδοθηλιακό ιστό

Η χορήγηση MET *in vivo* αυξάνει τη φωσφορυλίωση της AMPK στην αορτή μυών, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide synthase, eNOS) στο ενδοθήλιο. Η αυξημένη σύνθεση και βιοδιαθεσιμότητα NO έχει προστατευτική δράση στις καρδιαγγειακές νόσους διότι ρυθμίζει τον αγγειακό τόνο (Calvert, 2008). Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι η ενεργοποίηση της AMPK από τη MET αυξάνει τη συσχέτιση μεταξύ της μοριακής συνοδού HSP90 και της eNOS, η οποία μειώνει το προερχόμενο από την ενεργοποίηση της eNOS O_2^- (Davis et al., 2006) βελτιώνοντας τη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων (Isoda et al., 2006; Wan et al., 2013).

Η MET ρυθμίζει επίσης τον ενεργειακό μεταβολισμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, αφού η χορήγησή της αυξάνει την οξείδωση των λιπαρών οξέων και σε αυτόν τον τύπο κυττάρων.

1.7.3.3 Η AMPK ενεργοποιεί την αυτοφαγία στα καρδιομυοκύτταρα

Η αυτοφαγία όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι μια καταβολική διαδικασία σημαντική στην εξισορρόπηση της ενέργειας σε κρίσιμες περιόδους στην ανάπτυξη (Glick et al., 2010). Η μειωμένη δράση της AMPK και η ακόλουθη μείωση της καρδιακής αυτοφαγίας είναι κεντρική στην ανάπτυξη της διαβητικής καρδιομυοπάθειας. Σύμφωνα με τους Xie et al. (2011) η ενεργοποίηση της AMPK από τη χορήγηση MET ενεργοποιεί την αυτοφαγία σε καρδιομυοκύτταρα μέσω ρύθμισης της Beclin1 και του μονοπατιού (tuberous sclerosis complex, TSC) mTOR (mechanistic target of rapamycin) σε OVE26 μύες. Παράλληλα, μελέτη σε μοντέλο ποντικού με απαλοιφή του γονιδίου Pten (Phosphatase and tensin homolog) έδειξε ότι η ενεργοποίηση της σηματοδότησης Pink1-AMPK από τη MET βελτίωσε το προσδόκιμο ζωής των ζώων τα οποία παρουσίαζαν αλλαγές στη μυοκαρδιακή γεωμετρία, λειτουργία και αυτοφαγία (Roe et al., 2015).

1.7.3.4 Η AMPK προστατεύει τα καρδιομυοκύτταρα από την απόπτωση

Η απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων είναι συνηθισμένη στις καρδιαγγειακές νόσους και σε καρδιομυοπάθεια που προκαλείται από το διαβήτη. Πειραματικά στοιχεία υποδηλώνουν ότι η MET μειώνει την παραγωγή προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών και αυξάνει τις αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες, μειώνοντας το ποσοστό των αποπτωτικών καρδιομυοκυττάρων (Yeh et al., 2010). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Yeh et al. η απόπτωση καρδιομυοκυττάρων που προκλήθηκε από υψηλή συγκέντρωση λιπιδίων μειώθηκε μερικώς έπειτα από χορήγηση MET η οποία οδήγησε σε επικείμενη αύξηση της φωσφορυλίωσης της AMPK. Η δοξορουβικίνη, είναι ένα χημειοθεραπευτικό φάρμακο που χρησιμοποιείται στη θεραπεία ορισμένων μορφών καρκίνου, το οποίο μπορεί να προκαλέσει καρδιοτοξικότητα και απόπτωση καρδιομυοκυττάρων. Η χορήγηση MET όπως έχει ήδη αναφερθεί προστάτευσε καρδιομυοκύτταρα ενήλικου μυός (κύτταρα HL-1) από επαγόμενο από τη δοξορουβικίνη οξειδωτικό στρες και απόπτωση μέσω AMPK-μεσολαβούμενης σηματοδότησης (Asensio-Lopez et al., 2011)

2. ΣΚΟΠΟΣ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ

2. ΣΚΟΠΟΣ-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ

2.1 Σκοπός

Η παρούσα ΔΔ αφορά στη μελέτη των μεταβολών της ενεργότητας του πρωτεασώματος σε κύτταρα περιφερικού αίματος κατά τη γήρανση. Στόχος είναι επιπλέον η κατανόηση της μοριακής βάσης και ρύθμισης των λειτουργικών μονάδων πρωτεόστασης (πρωτεάσωμα) σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα μετά από μερική αναστολή του πρωτεασώματος, μέσω χορήγησης θεραπευτικών πρωτεασωμικών αναστολέων. Επίσης μέρος της εργασίας είναι η μελέτη της ρύθμισης του πρωτεασώματος κατά τη γήρανση στον καρδιακό ιστό. Ως μοντέλο επιλέχθηκε η *Drosophila melanogaster*. Στο ίδιο σύστημα μελετήθηκε η επίδραση της μερικής πρωτεασωμικής αναστολής στην καρδιακή λειτουργία καθώς η καρδιοτοξικότητα είναι σημαντική παρενέργεια των θεραπευτικών αναστολέων σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα. Επίσης θεματική περιοχή της παρούσας εργασίας αποτελεί η ανάδειξη θεραπευτικών παρεμβάσεων για τη μείωση της καρδιοτοξικότητας, η οποία σχετίζεται με τη μερική αναστολή της πρωτεασωμικής λειτουργίας στον καρδιακό ιστό.

Για το λόγο αυτό, η πειραματική διαδικασία διαιρέθηκε σε δύο ευδιάκριτα τμήματα όπως αναφέρονται ακολούθως:

1) Αρχικά και σε συνεργασία με την ογκολογική κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Αλεξάνδρα (Δ/ντης Καθηγ. Μ.Α. Δημόπουλος) πραγματοποιήθηκε λήψη αίματος από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα, διαφορετικής ηλικίας και φύλου, σε διάφορα σημεία του κύκλου θεραπείας τους. Οι ασθενείς αυτοί έλαβαν ως θεραπεία BTZ ή CFZ. Κατόπιν, απομονώθηκαν ερυθροκύτταρα (ΕΚ, κύτταρα απύρηνα με μακράς διάρκειας πρωτέωμα) και μονοπύρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (ΜΚΠΑ, κύτταρα με δυνατότητα γενωμικής απόκρισης). Παρόμοια απομονώθηκαν ΕΚ και ΜΚΠΑ από υγιείς δότες επίσης διαφορετικής ηλικίας και φύλου. Ακολούθησε ο αρχικός έλεγχος των βασικών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων στα απομονωμένα κύτταρα του αίματος (φρέσκα δείγματα), με παράλληλη απομόνωση RNA (ΜΚΠΑ) και πρωτεϊνών στα αντίστοιχα σημεία θεραπείας. Στη συνέχεια, εξετάστηκαν η έκφραση (επιπέδων mRNA και πρωτεϊνική) των κεντρικών ρυθμιστών του δικτύου πρωτεόστασης σε κύτταρα αίματος ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα. 2) Σε δεύτερη φάση ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων προκειμένου να μελετηθεί η πρωτεασωμική αναστολή στην καρδιακή λειτουργία εντόμων *Drosophila* τόσο με γενετικό, όσο και με φαρμακολογικό τρόπο. Παράλληλα, εξετάστηκε συνδυαστικά με τη χορήγηση πρωτεασωμικού αναστολέα (BTZ ή CFZ) η πιθανή καρδιοπροστατευτική δράση της MET

(επαγωγέας της αυτοφαγίας), φάρμακο που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη (Efentakis et al., 2019).

2.2 Κυτταρικοί τύποι

Οι δύο τύποι κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι τα ΕΚ και τα ΜΚΠΑ.

2.2.1 Ερυθροκύτταρα, ΕΚ

Τα ΕΚ μεταφέρουν το οξυγόνο στους ιστούς μέσω του αίματος. Παράγονται στο μυελό των οστών, μετά από την επίδραση της ερυθροποιητίνης, ορμόνης που εκκρίνεται στο νεφρό. Το μέσο ΕΚ ζει περίπου 120 ημέρες πριν την απόσυρσή του από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (Blom, 2003). Ο λόγος που επιλέξαμε το συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο είναι η έλλειψη πυρήνα. Το γεγονός αυτό, καθιστά τα ΕΚ, κύτταρα με μακράς διάρκειας πρωτέωμα (σταθερές πρωτεΐνες άρα και πρωτεάσωμα, από τη στιγμή της απόρριψης του πυρήνα έως και τη στιγμή της αποικοδόμησής τους).

2.2.2 Μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος, ΜΚΠΑ

Τα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος αποτελούνται από οποιοδήποτε κύτταρο του αίματος διαθέτει στρογγυλό πυρήνα (αντίθετα από τον πολυλοβωτό). Συγκεκριμένα, πρόκειται για λεμφοκύτταρα ή μονοκύτταρα τα οποία αποτελούν σημαντικά στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος (Miyahira, 2012). Ο πληθυσμός των λεμφοκυττάρων αποτελείται από Τ και Β λεμφοκύτταρα καθώς και από φυσικά φονικά. Χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, αφού συνιστούν κύτταρα του αίματος με δυνατότητα γενωμικής απόκρισης.

2.3 Το έντομο *Drosophila melanogaster*

Το δεύτερο κύριο πειραματικό μοντέλο της παρούσας ΔΔ ήταν το δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster*. Η *Drosophila* αποτελεί ένα από τα πιο χρησιμοποιημένα μοντέλα (Helfland and Rogina, 2003; Occor et al., 2007a) λόγω του μικρού χρόνου ζωής, του μικρού της μεγέθους και του σύντομου βιολογικού κύκλου της, που διαρκεί περίπου 10 ημέρες σε θερμοκρασία 25°C, καθώς και του μεγάλου εύρους των γενετικών χειρισμών που είναι διαθέσιμες. Συγκεκριμένα, είναι δυνατή η υπερέκφραση ή η καταστολή της έκφρασης μιας

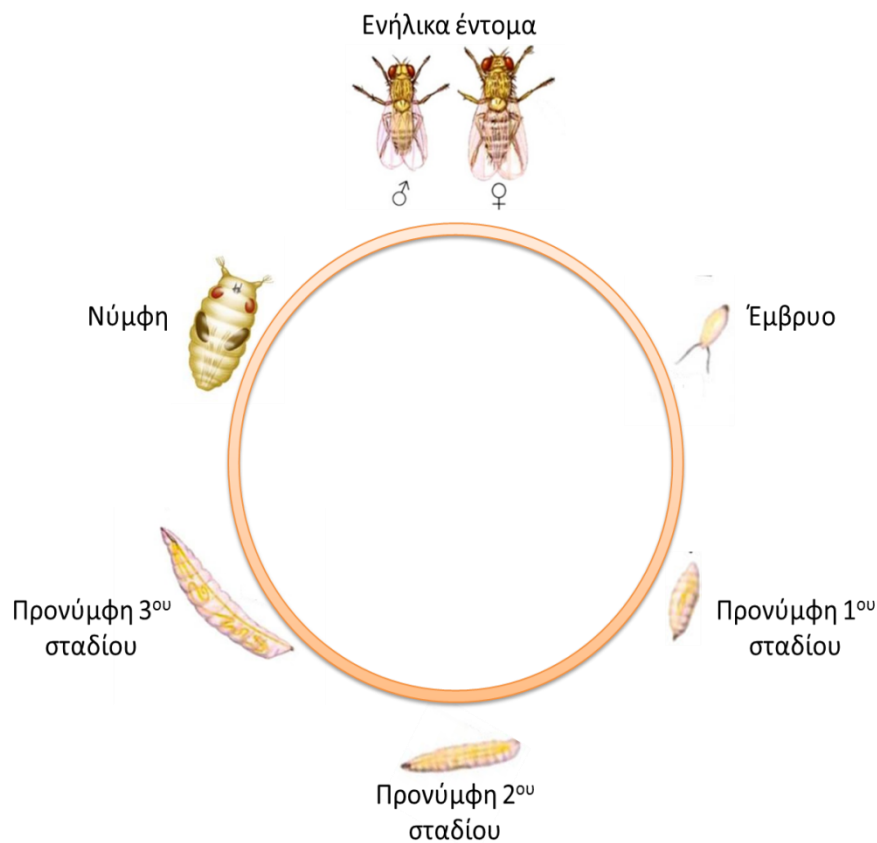
πρωτεΐνης με τη χρήση του συστήματος GAL4/UAS, καθώς και της τεχνικής της παρεμβολής του RNA (RNAi) αντίστοιχα, τα οποία θα αναφερθούν πιο εκτενώς στο κεφάλαιο *Υλικά και Μέθοδοι*. Επίσης, το πειραματικό μοντέλο *Drosophila melanogaster* είναι ιδανικό για τη μελέτη της επίδρασης γονιδίων και φαρμάκων στην καρδιακή λειτουργία καθώς ορισμένα γονίδια που εμπλέκονται σε ασθένειες της καρδιάς στον άνθρωπο υπάρχουν επίσης και στη *Drosophila*, όπου έχουν ρόλο ίδιο ή παρόμοιο στην καρδιακή ανάπτυξη, διατήρηση και φυσιολογία με τα αντίστοιχα στον άνθρωπο (Rotstein and Paululat, 2016).

Πίνακας 2.1. Ταξινόμηση της *Drosophila melanogaster*

Ταξινόμηση	
Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Arthropoda
Κλάση	Insecta
Τάξη	Diptera
Οικογένεια	Drosophilidae
Γένος	<i>Drosophila</i>
Υπογένος	<i>Sophophora</i>
Είδος	<i>melanogaster</i>

2.3.1 Φυσιολογική ανάπτυξη της *Drosophila*

Η *Drosophila* ανήκει σε μία από τις οικογένειες εντόμων (Δίπτερα) που υφίσταται πλήρη μεταμόρφωση. Έτσι, μετά την εκκόλαψη του εμβρύου προκύπτει μια προνύμφη (larva), η οποία διαφέρει δομικά από το ενήλικο άτομο. Η προνύμφη αναπτύσσεται και υφίσταται δύο εκδύσεις πριν φτάσει σε ένα στάδιο ηρεμίας, το οποίο ονομάζεται νύμφη (pupa). Στο στάδιο αυτό, το σώμα αναπλάθεται για να σχηματιστεί το ενήλικο άτομο που κυρίως σχηματίζεται από τους δίσκους ενηλίκου και τους κοιλιακούς ιστοβλάστες (Εικ. 2.1).



Εικόνα 2.1 Φυσιολογική ανάπτυξη της *Drosophila melanogaster*. Μετά την εκκόλαψη του ωοθυλακίου, η προνύμφη περνά από τρία στάδια, μεταξύ των οποίων μεσολαβούν τρεις εκδύσεις. Κατά την περίοδο αυτή, τρέφεται αδιάκοπα και αυξάνεται σημαντικά σε μέγεθος, χωρίς όμως να αλλάζει ιδιαίτερα η μορφολογία της. Η προνύμφη του τρίτου σταδίου γίνεται νύμφη, μια διαδικασία κατά την οποία το μεγαλύτερο τμήμα του σώματος της προνύμφης αφομοιώνεται και αντικαθίσταται από τις δομές του ενήλικου ατόμου που αναπτύσσονται από τους δίσκους ενήλικου.

2.3.1.1 Ωογένεση

Κατά την αρχή της ωογένεσης, το γαμετικό κύτταρο διαιρείται τέσσερις φορές, με αποτέλεσμα το σχηματισμό 16 κυττάρων, από τα οποία το ένα γίνεται ωκύτταρο και τα υπόλοιπα 15 τροφοκύτταρα. Ολόκληρο το σύμπλεγμα ωοκυττάρου-τροφοκυττάρων (γαμετικής προέλευσης) περιβάλλεται από τα θυλακοκύτταρα των ωοθυλακίων (σωματικής προέλευσης) σχηματίζοντας μια δομή που καλείται ωοθυλάκιο (Trougakos and Margaritis, 1998).

2.3.1.2 Εμβρυογένεση

Κατά τη γονιμοποίηση το σπερματοζωάριο εισέρχεται από το εμπρόσθιο άκρο, από μία οπή του κελύφους του ωοθυλακίου που ονομάζεται μικροπύλη. Η αρχική περίοδος αποτελείται από γρήγορες πυρηνικές διαιρέσεις και ονομάζεται αυλάκωση. Κατά το πρώιμο αυτό στάδιο, ολόκληρο το έμβρυο συγκροτεί ένα συγκύτιο, στο οποίο όλοι οι πυρήνες μοιράζονται το κοινό κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, ακολουθεί ο σχηματισμός των πολικών κυττάρων, από τα οποία προκύπτουν τα γαμετικά κύτταρα, έπεται το συγκυτιακό βλαστοδερμα, το οποίο μετά το διαχωρισμό των πυρήνων, θα δώσει το κυτταρικό βλαστοδερμα. Ακολούθως, ξεκινά η γαστριδίωση που οδηγεί στο σχηματισμό των τριών βλαστικών στιβάδων, από τις οποίες θα προκύψουν τα όργανα του εντόμου (Slack, 2006).

2.3.1.3 Στάδια της προνύμφης

Η προνύμφη της *Drosophila* δεν έχει πόδια, το κεφάλι της είναι αναδιπλωμένο στο εσωτερικό και φέρει τρία θωρακικά και οκτώ ορατά κοιλιακά μεταμερή. Στην κοιλιακή πλευρά της προνύμφης, σε καθένα από τα θωρακικά και κοιλιακά μεταμερή υπάρχουν ζώνες οδοντιδίων των οποίων το σχήμα και το μέγεθος είναι διαφορετικό για θωρακικά και κοιλιακά μεταμερή. Το οπίσθιο άκρο της προνύμφης δεν παρουσιάζει μεταμερισμό και ονομάζεται τέλσο, ενώ η δομή της κεφαλής είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη, καθώς παρουσιάζει ένα κεράτινο κεφαλοφαρυγγικό σκελετό που εκκρίνεται από την πεπτική οδό (Slack, 2006).

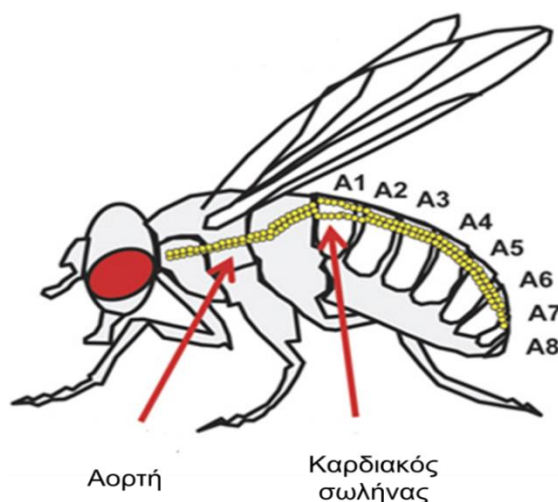
2.3.2 Το ενήλικο άτομο

Τα αγρίου τύπου έντομα (wild type) έχουν κόκκινα μάτια και παρουσιάζουν φυλετικές διαφορές. Τα θηλυκά άτομα είναι περίπου 2,5 χιλιοστά μακρύτερα από τα αρσενικά άτομα και μπορούν να γεννήσουν έως και 800 αυγά. Τα αρσενικά εμφανίζουν σκούρο χρώμα στο άκρο της κοιλιάς τους και διαθέτουν ένα ζευγάρι «γάντζων» (sex combs) στο μπροστινό ζεύγος ποδιών, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σεξουαλική επαφή.

Στην παρούσα εργασία όπως ήδη αναφέρθηκε επικεντρωθήκαμε στη μελέτη των επιπτώσεων που επιφέρει η θεραπεία των πρωτεασωμικών αναστολέων στην καρδιά. Για το λόγο αυτό ακολουθεί η περιγραφή του κυκλοφορικού συστήματος του ενήλικου εντόμου *Drosophila melanogaster* και μία σύντομη σύγκριση με το αντίστοιχο του ανθρώπου.

2.3.2.1 Το κυκλοφορικό σύστημα του εντόμου

Στο ζωικό βασίλειο υπάρχουν δύο τύποι κυκλοφορικού συστήματος τα οποία βρίσκονται σε συμφωνία με τις μεταβολικές απαιτήσεις του κάθε οργανισμού. Τα ανώτερα μετάζωα, όπως ο άνθρωπος διαθέτουν κλειστό κυκλοφορικό σύστημα, διατηρώντας το αίμα περιορισμένο σε ένα δίκτυο αρτηριών, φλεβών και τριχιδίων, διαχωρισμένο από το μεσοκυττάριο υγρό (λέμφο). Εξαιτίας της υψηλής υδροστατικής πίεσης που αναπτύσσει το αίμα μέσα στο διακλαδούμενο αυτό δίκτυο, αποτελεί ένα σύστημα κατάλληλο για ζώα με υψηλές μεταβολικές απαιτήσεις, επιτρέποντάς τους να παραμείνουν δραστήρια. Χαμηλότερης υδροστατικής πίεσης κυκλοφορικά συστήματα διαθέτουν από την άλλη ζώα όπως τα μαλάκια και τα αρθρόποδα, τα οποία παρουσιάζουν χαμηλότερες απαιτήσεις σε ενέργεια για τη συντήρησή τους. Το έντομο *Drosophila melanogaster* διαθέτει τέτοιου τύπου ανοιχτό κυκλοφορικό σύστημα, σχηματίζοντας έναν απλό καρδιακό σωλήνα στη ραχιαία πλευρά της κοιλιακής περιοχής και ο οποίος συσπάται προκαλώντας κίνηση της αιμολέμφου από το οπίσθιο μέρος του σώματος προς το εμπρόσθιο. Επιπρόσθετα, διαθέτει αορτή η οποία ξεκινά από το εμπρόσθιο τμήμα της καρδιάς και εκτείνεται στη ραχιαία πλευρά του θώρακα (Rotstein and Paululat, 2016) (Εικ. 2.2).



Εικόνα 2.2 Η καρδιά του εντόμου *Drosophila melanogaster*. Ο καρδιακός σωλήνας εντοπίζεται στη ραχιαία πλευρά της κοιλιακής περιοχής του εντόμου. Η αορτή ξεκινά από το εμπρόσθιο τμήμα της καρδιάς και εκτείνεται στη ραχιαία πλευρά του θώρακα (προσαρμογή από <https://droso4schools.wordpress.com/organs/>).

2.3.2.2 Η αιμολέμφος

Η αιμολέμφος αποτελεί το διάμεσο υγρό και συχνά καλείται το «αίμα» του εντόμου παρόλο που δε διαθέτει κύτταρα για τη μεταφορά οξυγόνου. Παρέχει άμεσα στα όργανα θρεπτικά στοιχεία, σηματοδοτικά πεπτίδια και διάφορους τύπους μεταβολιτών, ορμονών και μακροφάγων, κυττάρων υπεύθυνων για την επούλωση. Επιπρόσθετα, η αιμολέμφος διαθέτει αιμοκύτταρα που εκκρίνουν εξωκυττάρια μήτρα πρωτεϊνών (Extracellular Matrix, ECM), (Bunt et al., 2010; Wood and Jacinto, 2007) ενώ επίσης συμβάλλει στο ανοσοποιητικό σύστημα των εντόμων. Η ανταλλαγή και μεταφορά αερίων δεν είναι ο σκοπός της αιμολέμφου μιας και για τις διαδικασίες αυτές υπεύθυνο είναι το διακλαδούμενο και σωληνοειδές σύστημα των τραχειών (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2. Σύγκριση κυκλοφορικού συστήματος σε έντομα *Drosophila* και άνθρωπο.

Τύποι Κυκλοφορικού Συστήματος	
Χαμηλής Υδροστατικής πίεσης	Υψηλής Υδροστατικής πίεσης
• Κατάλληλο για ζώα με αργή ανακύκλωση θρεπτικών και εξουδετέρωση μεταβολικών παραπροϊόντων. • Αίμα και μεσοκυττάριο υγρό (αιμολέμφος) δε διαχωρίζονται, ενώ δεν είναι υπεύθυνα για την ανταλλαγή αερίων. • Η αιμολέμφος που έρχεται σε άμεση επαφή με τους ιστούς και τα εσωτερικά όργανα ρέει με χαμηλή ταχύτητα. • Δεν αποτελεί ενεργοβόρο σύστημα. • Κατάλληλο για χαμηλές μεταβολικές απαιτήσεις.	• Κατάλληλο για ζώα με πιο γρήγορη και αποτελεσματική ανακύκλωση θρεπτικών και εξουδετέρωση μεταβολικών παραπροϊόντων. • Το αίμα διαχωρίζεται από το μεσοκυττάριο υγρό (λέμφος). Είναι υπεύθυνο για την ανταλλαγή αερίων. • Το αίμα δεν έρχεται σε άμεση επαφή με τους ιστούς και τα εσωτερικά όργανα (εξάίρεση αποτελεί η επιφάνεια του πλακούντα), ενώ ρέει με υψηλή ταχύτητα. • Κατάλληλο για υψηλές μεταβολικές απαιτήσεις και αποτελεσματικό για τη μεταφορά υγρών σε μεγάλες αποστάσεις.

Το ανοιχτό κυκλοφορικό σύστημα είναι κατάλληλο για ζώα με χαμηλές μεταβολικές απαιτήσεις όπως τα έντομα *Drosophila*, ενώ το κλειστό κυκλοφορικό σύστημα υποστηρίζει τις υψηλές ενεργειακές και μεταβολικές απαιτήσεις οργανισμών όπως ο άνθρωπος.

2.3.2.3 Ο καρδιακός ιστός του ενήλικου εντόμου *Drosophila melanogaster*

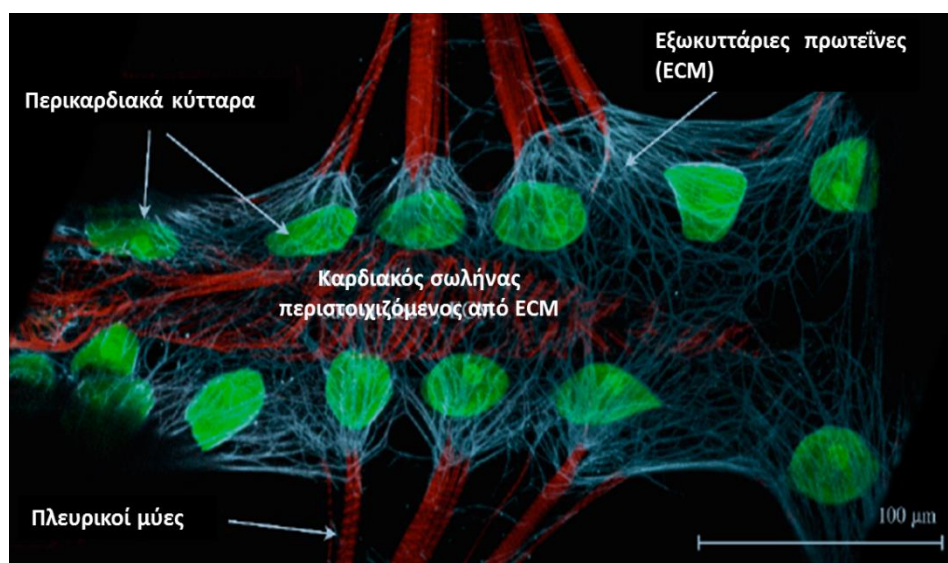
Η καρδιά της *Drosophila*, γνωστή επίσης και ως ραχιαίος σωλήνας (dorsal vessel) λόγω της ραχιαίας θέσης του, σχηματίζεται νωρίς κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης από καρδιομυοκύτταρα τα οποία είναι διευθετημένα σε δύο παράλληλες σειρές έτσι ώστε να σχηματίζουν μεταξύ τους ένα ενδιάμεσο αυλό (Zaffran et al., 1995). Στο τέλος της εμβρυογένεσης η καρδιά αρχίζει να συσπάται. Οι συσπάσεις των καρδιομυοκυττάρων προκαλούν την κίνηση της αιμολέμφου από τον καρδιακό σωλήνα στην αορτή και εν συνεχεία την εξάπλωση της στην ανοιχτή σωματική κοιλότητα. Κατά την ανάπτυξη της προνύμφης το έντομο αυξάνεται δραματικά σε μήκος από 0,5mm (έμβρυο/προνύμφη 1^{ου} σταδίου) σε περίπου 3–4mm (προνύμφη 3^{ου} σταδίου). Την ίδια στιγμή ο καρδιακός σωλήνας επιμηκύνεται μέσω αύξησης του μεγέθους των καρδιομυοκυττάρων και όχι μέσω κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Συμπερασματικά, η καρδιά της προνύμφης διαθέτει τον ίδιο αριθμό κυττάρων εν συγκρίσει με την καρδιά του εμβρύου (Sellin et al., 2006). Παρόλα αυτά, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της προνύμφης πραγματοποιούνται γεγονότα όπως αύξηση της διαμέτρου του καρδιακού αυλού, τα καρδιομυοκύτταρα όπως προαναφέρθηκε αυξάνουν σε μέγεθος, ενώ αρκετά κύτταρα που είναι στενά συνδεδεμένα με την εμβρυονική καρδιά εξαφανίζονται (Das et al., 2007; Sellin et al., 2009; Lehmachner et al., 2012). Η καρδιά του ενήλικου εντόμου διαφέρει από ανατομική και ιστολογική πλευρά από την καρδιά της προνύμφης λόγω της διαφοροποίησης που αυτή υφίσταται κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης (Monier et al., 2005). Η παραπάνω διαδικασία περιλαμβάνει το σχηματισμό των οστίων (οπές στον καρδιακό σωλήνα για την είσοδο της αιμολέμφου) (Molina and Cripps, 2001) τη δημιουργία επιπρόσθετων καρδιακών βαλβίδων (Lehmacher et al., 2012; Sellin et al., 2006), τη διαφοροποίηση των κοιλιακών επιμήκων μυών, οι οποίοι εκτείνονται κάτω από τον καρδιακό σωλήνα, το σχηματισμό του καρδιακού θαλάμου (terminal heart chamber) (Shah et al. 2011) καθώς και τη δημιουργία νευρώσεως (Dulcis and Levine, 2003; Dulcis and Levine, 2005).

2.3.2.4 Οι τύποι κυττάρων που συνιστούν την καρδιά του εντόμου

Η καρδιά αποτελείται από διαφορετικούς τύπους καρδιομυοκυττάρων που σχηματίζουν ένα συνεχή σωληνοειδή αυλό μέσω του οποίου η αιμολέμφος κυκλοφορεί. Επιπρόσθετα η καρδιά της *Drosophila* συνδέεται με τα περικαρδιακά κύτταρα τα οποία αποτελούν σημαντικό μέρος του εκκριτικού συστήματος του εντόμου. Ο καρδιακός

σωλήνας είναι σταθεροποιημένος στη ραχιαία πλευρά της κοιλιάς μέσω πλευρικών μυών (alary muscles) που ενώνουν την καρδιά με την επιδερμίδα. Τα περικαρδιακά κύτταρα τα περιβάλλουν τον καρδιακό σωλήνα.

Στην κοιλιακή πλευρά των ενήλικων εντόμων βρίσκονται οι επιμήκεις μύες διατεταγμένοι παράλληλα στον καρδιακό σωλήνα. Τέλος, ένα σημαντικό στοιχείο του καρδιακού συστήματος είναι ο μη κυτταρικός ιστός των εξωκυττάριων πρωτεϊνών (ECM) που υποστηρίζει την αρχιτεκτονική και τη λειτουργία της καρδιάς (Rotstein and Paululat, 2016) (Εικ. 2.3).



Εικόνα 2.3. Η δομή της καρδιάς σε προνύμφη τρίτου σταδίου εντόμου *Drosophila*. Η καρδιακή εξωκυττάρια μάζα πρωτεϊνών σε προνύμφη τρίτου σταδίου. Με πράσινο απεικονίζονται τα περικαρδιακά κύτταρα (hand-GFP, υποκινητής ειδικός για τα κύτταρα αυτά). Για την απεικόνιση του μυϊκού ιστού έχει γίνει χρώση με φαλλοϊδίνη (F-actin, κόκκινο κανάλι) και της εξωκυττάριας μάζας πρωτεϊνών επώαση με αντίσωμα έναντι της περικαρδίνης (συστατικό του ECM, λευκό κανάλι) (προσαρμογή από Rotstein and Paululat, 2016).

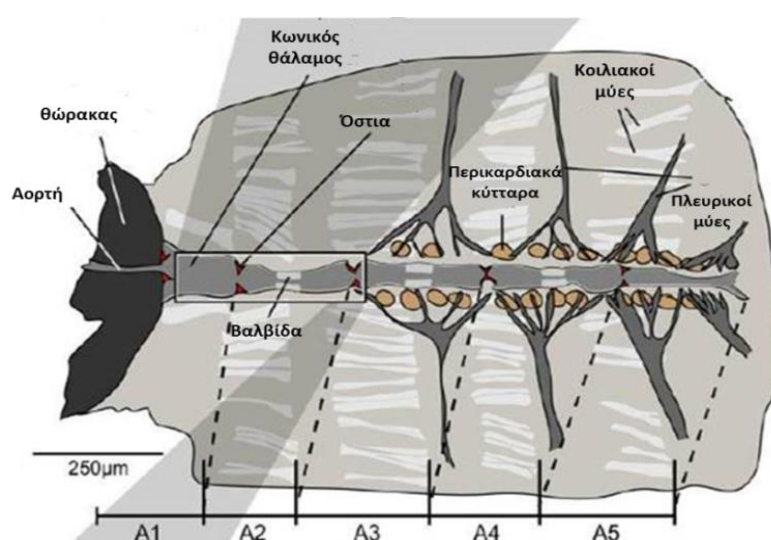
2.3.2.5 Τα καρδιομυοκύτταρα

Τα καρδιομυοκύτταρα είναι κύτταρα με διακρινόμενη λειτουργικότητα, τα οποία όπως προαναφέρθηκε σχηματίζουν τον καρδιακό σωλήνα. Αυτά είναι τα συσπώμενα καρδιομυοκύτταρα, τα όστια και οι ενδοκαρδιακές βαλβίδες. Η διαφοροποίηση σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους επιτυγχάνεται κατά την εμβρυογένεση μέσω της δράσης γονιδίων όπως τα T-box genes (Reim et al., 2005), Ladybird (Jagla et al., 1997) ή Tinman (Zaffran et al., 2006). Από το εμπρόσθιο προς το οπίσθιο τμήμα η καρδιά διαιρείται

σε δύο τμήματα. Η εμπρόσθια αορτή είναι ένας στενός αυλός ο οποίος στο στάδιο εμβρύου και προνύμφης δε διαθέτει ανοίγματα (Lehmacher et al., 2012). Όλα τα καρδιομυοκύτταρα τα οποία διαθέτουν σαρκομερή έχουν την ικανότητα σύσπασης. Αυτά τα καρδιομυοκύτταρα συλλογικά είναι υπεύθυνα για την περισταλτική κίνηση του καρδιακού τοιχώματος, η οποία ωθεί την αιμολέμφο στον καρδιακό αυλό. Στο στάδιο εμβρύου και προνύμφης ο καρδιακός σωλήνας αποτελείται από 104 καρδιομυοκύτταρα, τα οποία κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης μειώνονται σε 84 (ενήλικο έντομο) (Sellin et al., 2006). Τέλος, μία ακόμη δομή που διακρίνεται στον καρδιακό σωλήνα του ενήλικου εντόμου (δημιουργία στο συγκεκριμένο στάδιο) είναι ο κωνικός θάλαμος, του οποίου τα καρδιομυοκύτταρα διαθέτουν μεγαλύτερο μέγεθος, λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης ακτο-μυοσίνης, συγκρινόμενα με εκείνα σε άλλες περιοχές της καρδιάς (Vogler et al., 2009).

2.3.2.6 Τα όστια

Η αιμολέμφος εισέρχεται στον καρδιακό αυλό μέσω των οστίων, τα οποία είναι ανοίγματα που σχηματίζονται από εξειδικευμένα καρδιομυοκύτταρα. Η καρδιά στο στάδιο του εμβρύου και προνύμφης διαθέτει τρία ζευγάρια λειτουργικών οστίων και θεωρείται ότι δρουν παθητικά σα «διπολικές» βαλβίδες. Τα ενήλικα έντομα λόγω δομικών αλλαγών που υφίσταται η καρδιά κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης διαθέτουν πέντε ζευγάρια οστίων με πανομοιότυπο τρόπο λειτουργίας (Lehmacher et al., 2012; Molina et al., 2001; Wasserthal et al., 2007) (Εικ. 2.4.).

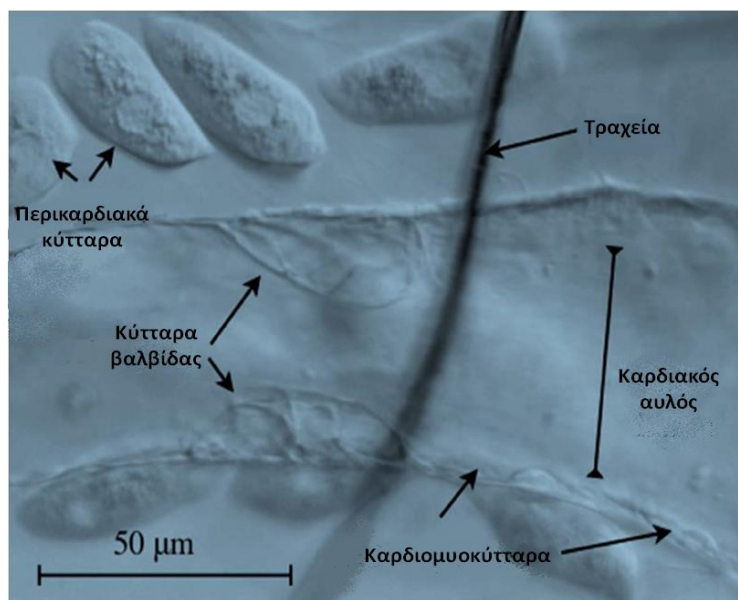


Εικόνα 2.4. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της καρδιάς ενήλικου εντόμου *Drosophila*. Ο καρδιακός σωλήνας του ενήλικου εντόμου *Drosophila* είναι τοποθετημένος στη ραχιαία πλευρά της

κοιλιάς. Μαζί με την καρδιά διακρίνονται εξειδικευμένα κύτταρα και δομές όπως τα 5 ζεύγη οστίων (κόκκινο χρώμα) και τα 3 ζεύγη βαλβίδων. Στο εμπρόσθιο μέρος της καρδιάς εντοπίζεται ο κωνικός θάλαμος, ο οποίος είναι μεγαλύτερος σε μέγεθος. Αρκετά ζεύγη πλευρικών μυών (alary muscles) συνδέουν την καρδιά με την επιδερμίδα διατηρώντας το όργανο στη θέση του. Τα περικαρδιακά κύτταρα με δράση νεφροκυττάρων βρίσκονται πλάι στον καρδιακό σωλήνα έχοντας υποστηρικτική λειτουργία, ενώ οι επιμήκεις κοιλιακοί μύες έχουν προστατευτικό ρόλο (προσαρμογή από Vogler et al., 2009).

2.3.2.7 Οι ενδοκαρδιακές βαλβίδες

Η μονόδρομη κατεύθυνση της ροής του αίματος και της λέμφου στα σπονδυλωτά ρυθμίζεται μέσω της παρουσίας εξειδικευμένων δομών στην καρδιά και τις φλέβες, των βαλβίδων. Στα θηλαστικά, οι βαλβίδες που διαχωρίζουν τις καρδιακές κοιλότητες αποτελούνται κυρίως από κολλαγόνο και ελαστίνη, ενώ οι φλεβικές βαλβίδες είναι κυτταρικά «πτερύγια» τα οποία ανοίγουν προς μία κατεύθυνση κατά την κυκλοφορία του αίματος εμποδίζοντας την παλινδρόμησή του (Armstrong and Bischoff). Η καρδιά στη *Drosophila* διαθέτει 1 (προνύμφη) ή 3 (ενήλικο έντομο) ζεύγη ενδοκαρδιακών βαλβίδων. Οι βαλβίδες αποτελούνται από στρογγυλά κύτταρα τα οποία είναι ικανά να κλείνουν τον καρδιακό αυλό, εμποδίζοντας την παλινδρόμηση της αιμολέμφου (Εικ. 2.5)



Εικόνα 2.5. Μικροσκοπία φωτεινού πεδίου ημι-άθικτης καρδιάς προνύμφης 3^{ου} σταδίου. Η καρδιά του εντόμου στο στάδιο της προνύμφης διαθέτει 1 ζεύγος βαλβίδων (προσαρμογή από Rotstein et al., 2009).

2.3.2.8 Οι πλευρικοί μύες (Alary muscles)

Η περισταλτική κίνηση του ευλύγιστου σώματος της προνύμφης απαιτεί την ύπαρξη μιας εξίσου ευλύγιστης καρδιάς. Αυτό παρέχεται από τους πλευρικούς μύες, οι οποίοι εκτείνονται από την επιδερμίδα του εντόμου προς την καρδιά, διατηρώντας την στην ανατομικά σωστή θέση της (Bataillé et al., 2015; LaBeau et al., 2009). Στο στάδιο της προνύμφης 7 ζεύγη πλευρικών μυών έρχονται σε επαφή με τον καρδιακό σωλήνα έμμεσα μέσω μιας επιφάνειας, η οποία σχηματίζεται από εξωκυττάριο υλικό. Το ενήλικο έντομο διαθέτει μόνο 4 ζεύγη πλευρικών μυών. Οι πλευρικοί μύες σχηματίζονται από μυοβλάστες οι οποίοι συντήκονται σχηματίζοντας εν τέλει πολυπύρηνους (5 ή 6 πυρήνες) συγκυτιακούς μύες.

2.3.2.9 Τα περικαρδιακά κύτταρα

Στα τελευταία στάδια της προνύμφης και στο ενήλικο έντομο τα περικαρδιακά κύτταρα μαζί με τα κύτταρα garland (garland cells) και τα μαλπιγγιανά σωληνάκια (malpighian tubules) σχηματίζουν το εκκριτικό σύστημα του εντόμου. Τα μονοπύρηνια περικαρδιακά καθώς και διπύρηνια κύτταρα garland είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση των γηρασμένων κυττάρων, των παραπροϊόντων του μεταβολισμού και των άχρηστων μακρομορίων (Ivy et al., 2015; Weavers et al., 2008). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα περικαρδιακά κύτταρα αποτελούν νεφροκύτταρα ανάλογης λειτουργίας με το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα των θηλαστικών, φιλτράροντας έτσι την αιμολémie των εντόμων (Ivy et al., 2015; Weavers et al., 2008; Zhang et al., 2013; Zhuang et al., 2009). Επιπρόσθετα και άλλες λειτουργίες αποδίδονται στα περικαρδιακά κύτταρα, π.χ. τα εμβρυονικά περικαρδιακά κύτταρα εκφράζουν και εκκρίνουν εξωκυττάρια πρωτεΐνες συμβάλλοντας έτσι μαζί με τα λιποκύτταρα και τα αιμοκύτταρα (hemocytes) στην παραγωγή μεμβρανικού υλικού (Drechsler et al., 2013). Τέλος, η παρουσία συγκεκριμένων πεπτιδών στην επιφάνεια ορισμένων περικαρδιακών κυττάρων υποδηλώνει την εμπλοκή των κυττάρων αυτών στην ομοιοδυναμική των πεπτιδίων της αιμολεμφικής κυκλοφορίας (Meyer et al., 2009).

2.3.2.10 Οι επιμήκεις κοιλιακοί μύες

Οι επιμήκεις κοιλιακοί μύες αποτελούν ένα ειδικό στρώμα συγκυτιακών μυών, οι οποίοι είναι τοποθετημένοι κάτω από την καρδιά, προφυλάσσοντάς την από τη μηχανική καταπόνηση. Αυτό ο τύπος μυών υπάρχει μόνο στο ενήλικο έντομο (Lehmacher et al., 2012).

2.3.2.11 Συνδετικός ιστός-ECM

Η εξωκυττάρια μήτρα πρωτεϊνών είναι ένα μη κυτταρικό συστατικό του κυκλοφορικού συστήματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι από τα κύρια χαρακτηριστικά του είναι η περικαρδίνη, μια δομική πρωτεΐνη της οικογένειας του κολλαγόνου τύπου IV, η οποία γίνεται αρκετά ασταθής με την πάροδο του χρόνου. Η αποσταθεροποίηση της περικαρδίνης οδηγεί σε καρδιακή ανεπάρκεια (Drechsler et al., 2013). Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίσθηκαν και από μεταλλάξεις που αφορούν στη Λαμινίνη B1, B2 και Cg25c (Κολλαγόνο τύπου IVa1), στοιχεία που συλλογικά απαιτούνται για το σχηματισμό της καρδιακής μήτρας (Hollfelder et al., 2014). Τα νεφροκύτταρα, βρίσκονται μέσα σε αυτή τη μάζα εξωκυττάρων πρωτεϊνών (κολλαγόνο, περικαρδίνη κ.α.) (Drechsler et al., 2013). Έχει προταθεί ότι μία από τις πιο σημαντικές λειτουργίες του ECM είναι η τοποθέτηση των νεφροκυττάρων κοντά στην κυκλοφορία της αιμολέμφου, ενισχύοντας το φιλτράρισμα της πριν εισέλθει στον καρδιακό αυλό. Επίσης, οι εξωκυττάρια πρωτεΐνες συνδέουν τους πλευρικούς μύες με την καρδιά βελτιστοποιώντας την αρχιτεκτονική του καρδιακού σωλήνα.

2.3.2.12 Επιπρόσθετες καρδιές (Accessory Hearts)

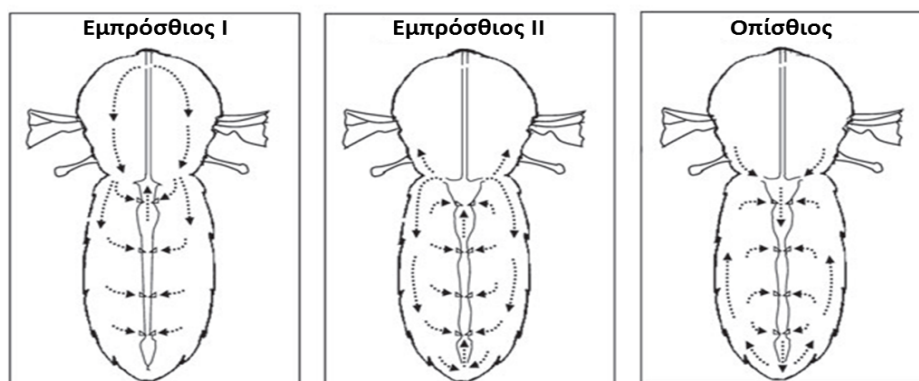
Η κυκλοφορία της αιμολέμφου στη *Drosophila* διευκολύνεται από τη δράση διαφόρων οργάνων και ιστών. Το κύριο όργανο είναι ένας ραχιαίος σωλήνας ο οποίος αντλεί αιμολέμφο κυρίως από το οπίσθιο μέρος προς το εμπρόσθιο. Η αιμολέμφο κυκλοφορεί επιπρόσθετα με τη βοήθεια των μυών του σώματος. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι το κυκλοφορικό σύστημα του εντόμου αποτελείται επίσης από επιπρόσθετα συσπώμενα όργανα («καρδιές») τα οποία συμβάλλουν στην κυκλοφορία της αιμολέμφου. Οι «καρδιές» αυτές βρίσκονται στα πόδια του εντόμου, στα φτερά και στις κεραίες (Pass et

al., 2015; Wirkner et al., 2013) και προέρχονται από τη διαφοροποίηση ενός υποσυνόλου 8 εμβρυονικών περικαρδιακών κυττάρων (Tögel et al., 2008).

2.3.2.13 Ο καρδιακός παλμός στη *Drosophila*

Εν αντιθέσει με τα υπόλοιπα είδη εντόμων όπου υπάρχει περισταλτική τμηματική διάδοση του καρδιακού χτύπου η κυκλοφορία της αιμολέμφου στο ενήλικο έντομο *Drosophila melanogaster* γίνεται μέσω ενός αποτελεσματικού συστήματος συγχρονισμένων καρδιακών συστολών. Ο ρυθμός των συγχρονισμένων καρδιακών παλμών, ο οποίος χαρακτηρίζεται από τη στιγμιαία διάδοση εμπρόσθιων συστολικών συσπάσεων ταυτόχρονα από όλα τα τμήματα της καρδιάς, είναι αρκετά γρήγορος (~ 4 Hz σε θερμοκρασία δωματίου, εν αντιθέσει με 1-1,67 Hz στον άνθρωπο). Αυτός ο παλμός στοχεύει κυρίως στην έντονη άντληση της αιμολέμφου προς το κεφάλι και το θώρακα μέσω του στενού ελαστικού σωλήνα της αορτής (εμπρόσθιος καρδιακός χτύπος I/anterograde I heartbeat). Επιπρόσθετα, αυτός ο συγχρονισμένος καρδιακός παλμός ενισχύει την κυκλοφορία της αιμολέμφου στον κοιλιακό χώρο (εμπρόσθιος καρδιακός χτύπος II/anterograde II heartbeat). Αυτή η εναλλαγή μεταξύ του θωρακικού εμπρόσθιου (anterograde I) και κοιλιακού εμπρόσθιου (anterograde II) χτύπου ρυθμίζεται μέσω της περιοδικής εναλλαγής μεταξύ σύσπασης και χαλάρωσης του κωνικού καρδιακού θαλάμου. Στον κωνικό θάλαμο υπάρχει ένα ζεύγος οστίων, τα οποία συσφίγγονται για κάποια δευτερόλεπτα και η αιμολέμφος προωθείται εμπρόσθια (anterograde I). Αντίθετα, κατά τη διάρκεια της χαλάρωσης των καρδιομυοκυττάρων τα όστια παραμένουν ανοιχτά για κάποια δευτερόλεπτα, με αποτέλεσμα την έξοδο της αιμολέμφου από τον κωνικό θάλαμο στη βάση της κοιλιάς (anterograde II). Ένας τρίτος τύπος, ο οπίσθιος καρδιακός χτύπος ο οποίος έχει καταγραφεί και σε άλλα έντομα, έχει χαμηλότερη συχνότητα (1-2 Hz) και παρατηρείται στη *Drosophila* σποραδικά και συνήθως με τη μορφή μονών ή διπλών συστολικών κορυφών. Αντίθετα, με τη συγχρονισμένη φύση του εμπρόσθιου καρδιακού παλμού I και II, η διάδοση του οπίσθιου καρδιακού παλμού γίνεται με περισταλτική κίνηση. Η εναλλαγή του εμπρόσθιου καρδιακού χτύπου σε οπίσθιο καλείται εναλλαγή ροής (Flow reversal) και στη *Drosophila melanogaster* δεν είναι ακόμα γνωστό εάν έχει ως στόχο την εναλλαγή του όγκου της αιμολέμφου μεταξύ των τμημάτων του σώματος του εντόμου, με στόχο την επίδραση στο σύστημα τραχειών (μεταφορά οξυγόνου), όπως συμβαίνει στις ενήλικες πεταλούδες (Choma et al., 2010; Sláma, 2010; Wasserthal et al., 2007) (Εικ. 2.6).

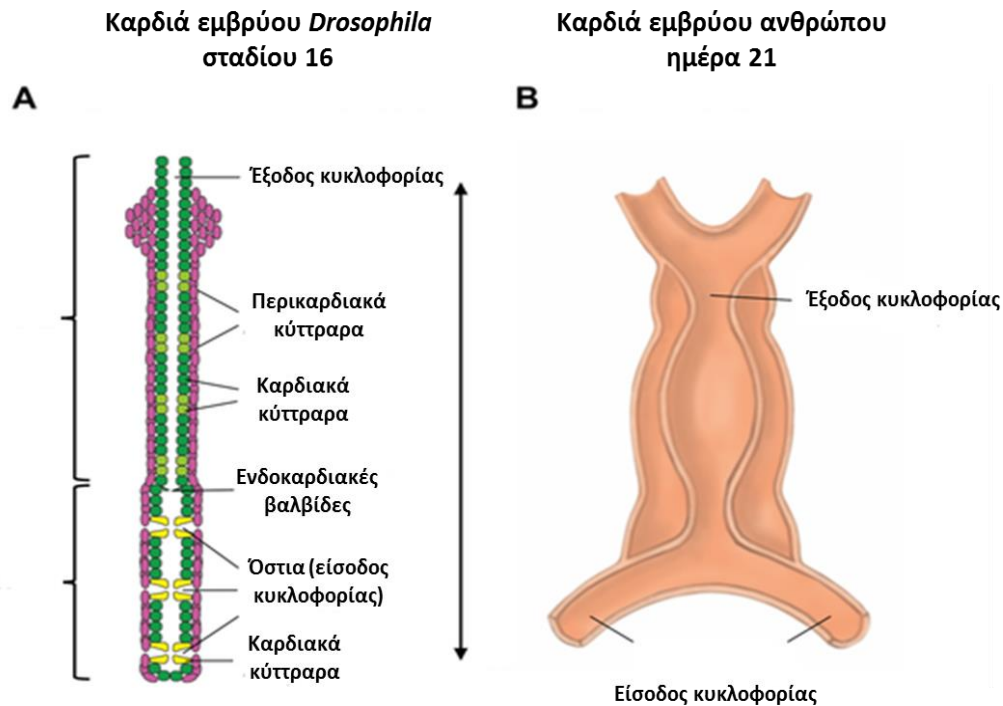
Καρδιακός χτύπος	Μηχανισμός	Συχνότητα	Κυκλοφορία	Κωνικός θάλαμος	Όστια
Εμπρόσθιος I	Συγχρονισμένος	~4 Hz	Θωρακικός	Σε συστολή	Κλειστά
Εμπρόσθιος II	Συγχρονισμένος	~4 Hz	Κουλιακός	Σε διαστολή	Ανοιχτά
Οπίσθιος	Περισταλτικός	~1-2 Hz	Κουλιακός	Σε διαστολή	Ανοιχτά



Εικόνα 2.6. Περιγραφή και σχηματική αναπαράσταση του κυκλοφορικού συστήματος σε ενήλικο έντομο *Drosophila melanogaster* κατά τη διάρκεια εμπρόσθιου I, II και οπίσθιου καρδιακού παλμού (προσαρμογή από Sláma, 2010).

2.3.2.14 Σύγκριση της καρδιάς της *Drosophila* και των χορδωτών

Η καρδιά είναι ένα όργανο αρκετά συντηρημένο δεδομένου ότι πρωτοεμφανίσθηκε στα αμφίπλευρα ζώα πάνω από 500 εκατομμύρια χρόνια πριν (Bishopric, 2005; Ma et al., 2014; Simoes-Costa et al., 2005). Για το λόγο αυτό δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι η καρδιά του δίπτερου εντόμου *Drosophila melanogaster* παρουσιάζει αξιοσημείωτες ομοιότητες σε επίπεδο μορφογενετικής προέλευσης, δομής και μηχανισμών ρύθμισης με την αντίστοιχη των χορδωτών. Τόσο στη *Drosophila* όσο και στα χορδωτά η καρδιά προέρχεται από δύο αμφιπλευρικά συμμετρικές σειρές μεσοδερμικών κυττάρων κατά το στάδιο της γαστριδίωσης, οι οποίες εν τέλει ενώνονται για να σχηματίσουν τον καρδιακό σωλήνα (Bodmer, 1995). Ακολούθως, η αναδίπλωση του καρδιακού σωλήνα στα χορδωτά και ο σχηματισμός διαφράγματος οδηγεί στη δημιουργία καρδιάς πολλαπλών θαλάμων. Αντίθετα η καρδιά στη *Drosophila* παραμένει ένας επιμήκης σωλήνας, ο οποίος παρόλα αυτά διαιρείται μέσω των ενδοκαρδιακών βαλβίδων σε μία πιο στενή εμπρόσθια δομή την αορτή και μία οπίσθια δομή την κυρίως καρδιά (Ahmad et al., 2017; Rotstein and Paululat, 2016; Vogler and Bodmer, 2015) (Εικ. 2.7). Οι δύο αυτές καρδιές σχηματίζουν έναν σωλήνα ο οποίος είναι οργανωμένος σε εμπρόσθιο-οπίσθιο άξονα με σημεία εισόδου-εξόδου της κυκλοφορίας (αιμολέμφος στη *Drosophila*, αίμα στους ανθρώπους), η οποία αντλείται με εμπρόσθια κατεύθυνση.



Εικόνα 2.7. Ομοιότητες της εμβρυϊκής καρδιάς στη *Drosophila* και στους ανθρώπους. A: Η σωληνοειδής καρδιά σταδίου 16 σε έμβρυο *Drosophila* διαιρείται σε μια οπίσθια δομή την καρδιά και μια πιο στενή εμπρόσθια δομή την αορτή. Οι δύο αυτές δομές αποτελούνται από μία εσωτερική σειρά συσπώμενων καρδιομυοκυττάρων περιβαλλόμενης από τα περικαρδιακά νεφροκύτταρα (μωβ). **B:** Η σωληνοειδής καρδιά σε ανθρώπινο έμβρυο ηλικίας 21 ημερών, πριν την αναδίπλωση και διαμερισματοποίηση μέσω διαφράγματος σε 4 κοιλότητες (προσαρμογή από Ahmad et al., 2017).

Υπάρχουν ορισμένες καλά τεκμηριωμένες ενδείξεις ότι η καρδιά του εντόμου έχει ορισμένα κοινά μορφογενετικά χαρακτηριστικά με την ανθρώπινη καρδιά. Σύμφωνα με τους Akasaka et al. (2006), ιδιαίτερου ενδιαφέροντος στις καρδιακές μελέτες είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Tinman (Tin), που είναι από τους πρώτους καρδιακούς μεταγραφικούς παράγοντες που εκφράζονται και είναι απαραίτητος για την αρχική διαφοροποίηση της πρώιμης καρδιάς τόσο στη *Drosophila* όσο και στους ανθρώπους (Bodmer et al., 2005; Occor et al., 2007b; Zeitouni et al., 2007). Οι καρδιές αυτών των δύο φυλογενετικά απομακρυσμένων οργανισμών λειτουργούν αποκλειστικά με βάση μια καθαρά μυογενή, ακούσια αρχή, αφού δεν υπάρχουν χολινεργικές νευροκινητικές συνάψεις στο μυοκάρδιο. Επιπλέον, η καρδιά του εντόμου διαθέτει έναν ρυθμιστικό βρόχο με λειτουργία βηματοδότη στον οπίσθιο θάλαμο, η οποία είναι ανάλογη με τον κολποκοιλιακό κόμβο της ανθρώπινης καρδιάς (Sláma, 2006). Συγκριμένα, λόγω της

ύπαρξης των δύο τύπων καρδιακού χτύπου (εμπρόσθιος και οπίσθιος), έχει προταθεί η ύπαρξη δύο βηματοδοτών στη *Drosophila* τοποθετημένων αντιδιαμετρικά στον καρδιακό σωλήνα. Όπως, προαναφέρθηκε ο ένας βρίσκεται στον οπίσθιο θάλαμο του καρδιακού σωλήνα και είναι υπεύθυνος για τον εμπρόσθιο καρδιακό χτύπο, ενώ ο δεύτερος βρίσκεται στον εμπρόσθιο κωνικό θάλαμο και είναι υπεύθυνος για τον οπίσθιο καρδιακό χτύπο (Johnson et al., 2002).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

3.1.1 Μηχανήματα

Συσκευή	Εταιρεία
Επωαστήρας	ProBlot Labnet
Στερεοσκόπιο με ψηφιακή κάμερα (Breukhoven microscopy systems/3 MB)	BMS, 74958
Ηλεκτρόδιο οξυγόνου τύπου Clark συνδεδεμένο με υπολογιστή (πρόγραμμα Oxygraph)	Hansatech Instruments, Norfolk, UK
Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Confocal Laser Scanning microscope)	Microscope/Nikon, Melville, NY, USA
Συσκευή ηλεκτροφόρησης	Biorad
Συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη	Biorad
Συσκευή για Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου	PikoReal Real-Time (Thermo Scientific)
Συσκευή σύνθεσης cDNA (Minicycler PTC-150)	MJ Research
Φασματοφωτόμετρο	Biorad
Φασματοφωτόμετρο BioSpec-nano	Shimadzu
Φθορισμόμετρο	Biorad
Φυγόκεντρος	Biofuge stratus
Ψυχόμενη φυγόκεντρος	Thermo Fisher Scientific

3.1.2 Χημικά αντιδραστήρια

Χημικά αντιδραστήρια	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
ADP (Adenosine Diphosphate)	Sigma-Aldrich	A2754
APS (Ammonium persulfate)	Research Organics	9530A
ATP (Adenosine Triphosphate)	Sigma-Aldrich	A1852
Biorad protein assay	Biorad	500-0006
Boc-Leu-Arg-Arg-AMC (LRR)	Enzo life sciences	BML-BW8515-0005
Bortezomib	Cayman Chemical	179324-69-7
Carfilzomib	Cayman Chemical	868540-17-4
Clarity™ and Clarity Max™ Western ECL Blotting Substrates	Biorad	Sc-2048
Coomassie brilliant blue R-250	Fluka	27816
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Thermo Fisher Scientific	D1306
Developer D-19	Kodak	146 4593
DMSO	Sigma-Aldrich	270431
DTT	Sigma-Aldrich	248531
EDTA	Research organics	9572E
EGTA	Sigma-Aldrich	03777
EtOH	Merck	1.00983.2511
FCCP	Cayman Chemicals	15218
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco life technologies	10270-106
Fixer Fix-100	Agfa	G382B
Glutamic Acid	Sigma-Aldrich	GO355000
Hepes	Sigma-Aldrich	H-0891
KCl	Sigma-Aldrich	P-9333
KCN	Sigma-Aldrich	11812
Lymphosep, Lymphocyte Separation Medium	Biosera	LM-T1702
LysoTracker™ Red DND-99	Thermo Fisher Scientific	L7528
Malic Acid	Sigma-Aldrich	PHR1273
MgCl ₂	Scharlau	MA00360MA00360

Mowiol 4–88	Sigma-Aldrich	81381-250G
NaCl	Merck	1.06405.1000
NaHCO ₃	Fluka	24610-250G
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	S8282
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich	74385
PBS (Phosphane Buffered Saline)	Sigma-Aldrich	P4417
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)	Sigma-Aldrich	P-1379
Rapamycin (Ραπαμυκίνη)	Cayman Chemical	53123-88-9
RNAzol	Molecular Research Center, Inc	RN190-100
Ros Dye (CM-H ₂ DCFDA)	Thermo Scientific	C6827
SDS	Serva	20765
Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (LLVY)	Enzo life sciences	BML-P802-0005
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Merck	1107320100
Tris	Research Organics	9680T
Triton X-100	BDH	30632
Z-Leu-Leu-Glu-AMC (LLE)	Enzo Life Sciences	BML-ZW9345-0005
Z-RR-AMC (Cathepsin substrate activity)	Enzo Life Sciences	BML-P137-0050
2-μερκαπτοαιθανόλη	Merck	15433
Αιθανόλη	Merck	1.00983.2511
Άγαρ	Fluka	05040
Ακρυλαμίδη	Research Organics	9502A
Βρωμοφαινόλη μπλε	Sigma-Aldrich	B-6896
Γλυκίνη	Serva	23390
Ισοπροπανόλη	Sigma-Aldrich	I9516
Κιτ απομόνωσης RNA (NucleoSpin® RNA)	Macherey Nagel	740955.250
Κιτ σύνθεσης cDNA (cDNA synthesis Kit for RT-qPCR)	Thermo Fisher Scientific	K1641

Κοκτέιλ από αναστολείς πρωτεασών	Sigma-Aldrich	P8340
Μάρτυρας πρωτεΐνης (έτοιμος για χρήση)	Thermo Fisher Scientific	SM0671
Μάρτυρας πρωτεΐνης, μεγάλου εύρους (έτοιμος για χρήση)	Thermo Fisher Scientific	SM1841
Μεθανόλη	Merck	1.06009.2511
Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	Santa Cruz Biotechnology	Sc-3724
Ολιγομυκίνη	Sigma-Aldrich	1404-19-9
Προπιονικό οξύ	Merck	8.00605.1000
Σουκρόζη	Sigma-Aldrich	S0389
Υδροχλωρικό οξύ (HCl) 37%	Merck	K37471017
Υδροχλωρική Μετφορμίνη (850 mg αντιστοιχούν σε 662,9 mg βάσης Μετφορμίνης)	Merck	657-24-9
(Φαλλοϊδίνη) Alexa Fluor™ 488 Phalloidin	Thermo Fisher Scientific	A12379
Φιλμ αυτοραδιογραφίας	Santa Cruz Biotechnology	Sc-201697
Φορμαλδεΰδη 37%	PanReac AppliChem	A0877,0250
Χαρτιά Whatman	Sigma-Aldrich	Z241768

3.1.3 Αντισώματα

Αντισώματα	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
Πρωτογενή αντισώματα ειδικά για τον άνθρωπο		
Anti-ACTIN	Santa Cruz Biotechnology	Sc-1615
Anti-20S proteasome β5 (C-19)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-55009
Anti-NQO1	Santa Cruz Biotechnology	Sc-16464
Anti-Clusterin (C-18)	Santa Cruz Biotechnology	Sc-6419
Πρωτογενή αντισώματα ειδικά για τη <i>Drosophila melanogaster</i> και τον άνθρωπο		
Anti-Ubiquitin	Santa Cruz Biotechnology	Sc-8017
Anti-GAPDH	Sigma-Aldrich	G9545-200UL
Anti-ATP5PF/complex V	abcam	ab14748

ubunit-ATP5F1A		
Anti-GABARAP	Cell Signaling Technology (CST)	13733s
Πρωτογενή αντισώματα ειδικά για τη <i>Drosophila melanogaster</i>		
Anti-ref(2)p	Ευγενική προσφορά του Prof. Gábor Juhász	
Δευτερογενή αντισώματα		
Anti-Go-IgG/HRP	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2020
Anti-Mo-IgG/HRP	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2005
Anti-Rb-IgG/HRP	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2004
Anti-Mouse-IgG/Rhodamine (TRITC) AffiniPure	Jackson ImmunoResearch	715-025-151
Anti-Rabbit-IgG/Rhodamine (TRITC) AffiniPure	Jackson ImmunoResearch	711-025-152
Anti-Mouse-IgG/Alexa Fluor 488	Jackson ImmunoResearch	115-545-003
Anti-Rabbit-IgG/Alexa Fluor 488	Jackson ImmunoResearch	111-545-003
Anti-Mouse IgG/DyLight™ 405 AffiniPure	Jackson ImmunoResearch	715-475-151

3.1.4 Real-Time PCR εκκινητές (Real-Time PCR primers)

Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην πραγματικού χρόνου Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Real-Time PCR) ειδικά για τον άνθρωπο	
Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
<i>BECN1-R</i>	CAGAGCGATGGTAGTTCTGGA
<i>BECN1-F</i>	TTGGACGTCTTAGACCCTTCC
<i>HDAC6-F</i>	GACCATCCAAGTCCATCGCA
<i>HDAC6-R</i>	ACCTAGGTTTGGCTGGTTGG
<i>HSP27/HSPB1-F</i>	CCACCCAAGTTTCCTCCTC
<i>HSP27/HSPB1-R</i>	GACTGGGATGGTGATCTCGT
<i>HSP90/HSP90AA1-F</i>	CTGGGGATCTTCCAGACTGA
<i>HSP90/HSP90AA1-R</i>	GGCAGAGGCTGATAAGAACG

<i>NQO1-F</i> <i>NQO1-R</i>	AGCAGACGCCCGAATTCAAA AGAGGCTGCTTGGAGCAAAA
<i>PSMA7-F</i> <i>PSMA7-R</i>	TACATCACCCGCTACATCGC AGAGCCTAGGAGTGCCATCA
<i>PSMB1-F</i> <i>PSMB1-R</i>	GGATGCAGCGGTTTTTCATGG AATTGCCCCCGTAGTCATGG
<i>PSMB2-F</i> <i>PSMB2-R</i>	CTGCTCCGCCCTCCATTAAAC GCCAAGCATGGAGTAGAACG
<i>PSMB5-F</i> <i>PSMB5-R</i>	TCAAGTTCCGCCATGGAGTC CTTCTTCACCGTCTGGGAGG
<i>RPN11-F</i> <i>RPN11-R</i>	ACGGAAGCCGAAGCAAATA GCAAACCGGCGATGAATCAG
<i>RPN6-F</i> <i>RPN6-R</i>	TCAAACCTCTCCAAGGCCGAC CTCCCCCTGGTCCAAAATCC
<i>RPN11/PSMD14-F</i> <i>RPN11/PSMD14-R</i>	ACGGAAGCCGAAGCAAATA GCAAACCGGCGATGAATCAG
<i>RPN6/PSMD11-F</i> <i>RPN6/PSMD11-R</i>	TCAAACCTCTCCAAGGCCGAC CTCCCCCTGGTCCAAAATCC
<i>P62/SQSTM1-F</i> <i>P62/SQSTM1-R</i>	CATCGGAGGATCCGAGTGTG TTCTTTTCCTCCGTGCTCC
<i>TXNRD1-F</i> <i>TXNRD1-R</i>	TTGGAGTGCGCTGGATTTCT TTTGTGGCCATGTCCTGGT
<i>CTSD-F</i> <i>CTSD-R:</i>	ACCTT-ATCGCAGCCAAGTT AGCACGTTGTTGACGGAGAT
<i>CTSL-F</i> <i>CTSL-R</i>	ACAGGGAAGGGAACACAGC TTCACAGGAGTCACGTAGCC
<i>CHOP-F</i> <i>CHOP-R</i>	CGACAGAGCCAAAATCAGAGC TTCAGGTGTGGTGATGTATGAAGA
<i>PEPCK-F</i> <i>PEPCK-R</i>	GAAGTGCTTTGCCCTACGC CCCCCACACACTCCACTTTC
<i>GAPDH-F</i> <i>GAPDH-R</i>	CCACATCGCTCAGACACCAT CCATGGGTGGAATCATATTGGAAC

Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην πραγματικού χρόνου Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Real-Time PCR) ειδικά για τη <i>Drosophila melanogaster</i>	
Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
<i>cncC-F</i>	CACTACCCGGGAGTATTCCAAA
<i>cncC-R</i>	TAAGCTTCGCCCAGATTGTG
<i>Keap1-F</i>	GCGCTCGTCAGCCCATTTT
<i>Keap1-R</i>	GGATGCGCATAATTCCTCTTCTT
<i>Atg6-F</i>	GTTCTGCTGCCCTACAAGA
<i>Atg6-R</i>	TCCACTGCTCCTCCGAGTTA
<i>ATG8a-F</i>	ACGCCTTCGAGAAGCGTCGC
<i>ATG8a-R</i>	CCAAATCACCGATGCGCGCC
<i>Prosalpha7-F</i>	ACCGACGAATTGGTGGAGAG
<i>Prosalpha7-R</i>	ACCCATTTCTGAAGCGGAAGT
<i>Prosbeta1-F</i>	GCGACGCATCTTCTACAACAC
<i>Prosbeta1-R</i>	CGAGGAAATGAAGCTGGGAGT
<i>Rpn6-F</i>	TCTACTGTCCGCCAAAGGTG
<i>Rpn6-R</i>	TTCCACTGACGAGCTGGTTG
<i>Prosbeta5-F</i>	GCCATCTACCATGCCACCTT
<i>Prosbeta5-R</i>	TTACCCAGCCGTCCTCCTTA
<i>Rp49-F</i>	AGCACTTCATCCGCCACC
<i>Rp49-R</i>	ATCTCGCCGCAGTAAACG
<i>ref(2)p-F</i>	GGTCAGCTGGGCGAACTATT
<i>ref(2)p-R</i>	ATCAGTGTGGTAGACGGGGA
<i>Trxr1-F</i>	GACACCAGTGGAACCTACCCG
<i>Trxr1-R</i>	ATTTTGAGTGCATGTCGGCG
<i>Hsp60A-F</i>	AGAAGGATCGCGTCCATGAT
<i>Hsp60A-R</i>	GTTTCTGATCCTCGTTGGTG
<i>Hsp70-F</i>	AAGAACCTCAAGGGTGAGCG
<i>Hsp70-R</i>	CGTCGATGGTCAGGATGGAG
<i>Park-F</i>	ATGAGTTTTATTTTAAATT
<i>Park-R</i>	TTAGCCGAACCAAGTGGGC
<i>PINK1-F</i>	ATGTCTGTGAGACTGCTGACCG

<i>PINK1-R</i>	CTACGCCACCACATTCTGGATC
<i>ATPsynB-F</i> <i>ATPsynB-R</i>	CCC-GTG-GTG-TGC-AGA-AAA-TC AAA-CGC-TGA-ATC-TTG-CGA-GC
<i>PGC-1α-F</i> <i>PGC-1α-R</i>	TGTGAGGTTAAAGCAGACGG GTAACCTTCTGAGCTTCCGTT
<i>HDAC6-F</i> <i>HDAC6-R</i>	TGCTGGAGCGCATTACCTT ATGGTATGGTGACTGGTGCC

Οι εκκινητές PCR σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

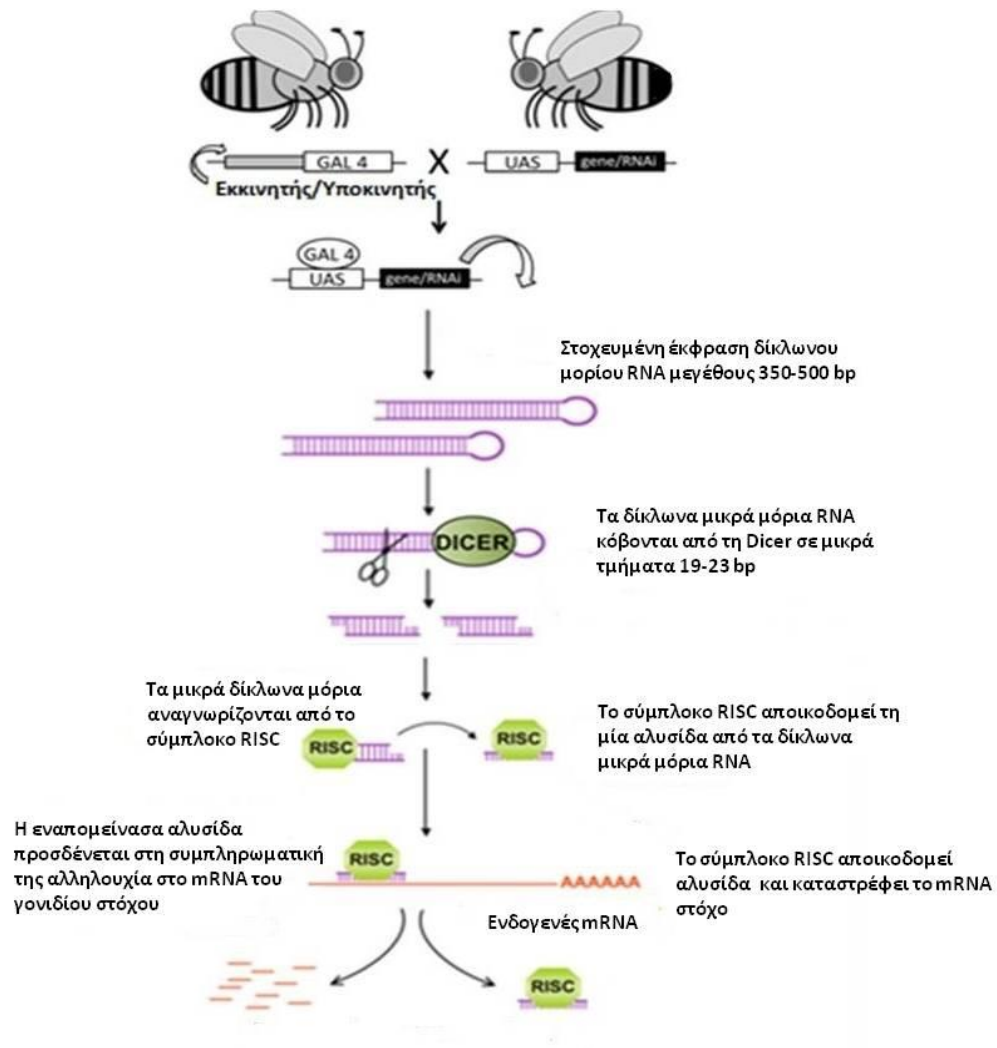
3.1.5 Διαγονιδιακά στελέχη *Drosophila melanogaster*

Τα έντομα *Drosophila melanogaster* που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

- Έντομα W¹¹¹⁸ με φαινότυπο λευκό χρώμα ματιών (Bloomington Stock Center, USA).
- Διαγονιδιακά έντομα με επαγόμενη μείωση της έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων β1, β5, μέσω RNAi (Bloomington Stock Center, USA).
- Διαγονιδιακά έντομα που υπερεκφράζουν την κωδική αλληλουχία της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a, η οποία είναι ορθόλογη της πρωτεΐνης LC3 στον άνθρωπο (Bloomington Stock Center, USA).
- Διπλά διαγονιδιακά έντομα τα οποία παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση της β5 πρωτεασωμικής υπομονάδας (μέσω RNAi αποσιώπησης) και υπερέκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a (**παρούσα ΔΔ**).
- Διαγονιδιακά έντομα που υπερεκφράζουν την κωδική αλληλουχία της λυσοσωμικής πρωτεΐνης Lamp1 συνδεδεμένη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green fluorescence protein, GFP), ευγενική προσφορά του Prof. Gabor Juhasz (Eötvös Loránd University, Budapest Hungary)
- Διπλά διαγονιδιακά έντομα αναφοράς Gal4^{MEF2}, Mito^{GFP}, τα οποία εκφράζουν αλληλουχία εισόδου στα μιτοχόνδρια συνδεδεμένη με τη GFP φθορίζουσα πρωτεΐνη στοχευμένα στο μυϊκό ιστό.
- Διαγονιδιακά έντομα Gal4^{TinC}, ως «οδηγοί» (drivers), οι οποίοι υπερεκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα Gal4 στον καρδιακό ιστό του εντόμου από την εμβρυϊκή

ηλικία. Το στέλεχος «οδηγός» της καρδιακής στόχευσης είναι προσφορά του καθηγητή Manfred Frasch, University of Erlangen-Nürnberg, Germany.

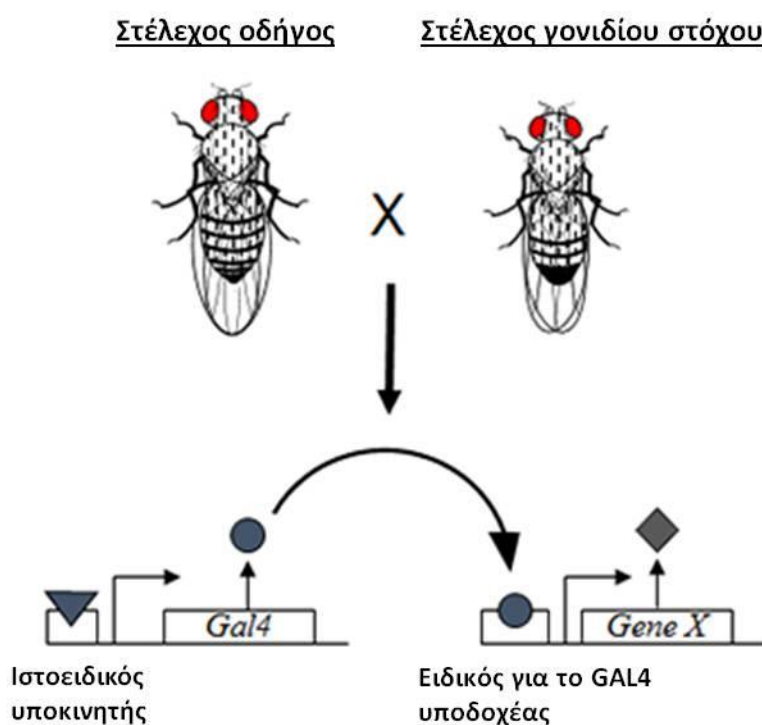
Στις **Εικ. 3.1** και **Εικ. 3.2** περιγράφεται ο μηχανισμός αποσιώπησης της έκφρασης του γονιδίου στόχου μέσω RNAi και ο μηχανισμός υπερέκφρασης γονιδίου στόχου αντίστοιχα:



3.1 Εικόνα. Ο μηχανισμός αποσιώπησης της έκφρασης του γονιδίου στόχου μέσω της παρεμβολής του RNA (RNA interference-RNAi). Στέλεχος που υπερεκφράζει το μεταγραφικό παράγοντα GAL4 διασταυρώνεται με στέλεχος που φέρει τμήμα του γονιδίου στόχου (RNAi). Όταν το τμήμα του γονιδίου στόχου υπερεκφρασθεί στους απογόνους της παραπάνω διασταύρωσης, υπό τον έλεγχο της αλληλουχίας UAS (Upstream Activating Sequence), σχηματίζει δομή φουρκέτας (δίκλινη μορφή RNA) μεγέθους συνήθως 350-500 bp. Τα δίκλινα τμήματα RNA αναγνωρίζονται από την πρωτεΐνη Dicer, η οποία τα κόβει σε μικρότερα τμήματα μεγέθους 19-23 bp. Τα μικρά δίκλινα μόρια αναγνωρίζονται από το σύμπλοκο RISC, που αποικοδομεί τη μία αλυσίδα από τα δίκλινα μικρά μόρια RNA. Η εναπομείνασα αλυσίδα προσδένεται στη συμπληρωματική της αλληλουχία στο

mRNA του γονιδίου στόχου και το σύμπλοκο RISC αποικοδομεί και καταστρέφει το mRNA, επιτυγχάνοντας έτσι την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου στόχου (προσαρμογή από Tijsterman and Plasterk, 2004).

UAS-GAL4 Γονιδιακή υπερέκφραση



Οι απόγονοι (υπερ) εκφράζουν το γονίδιο στόχο

Εικόνα 3.2. Ο μηχανισμός υπερέκφρασης του γονιδίου στόχου. Στέλεχος που υπερεκφράζει το μεταγραφικό παράγοντα GAL4 υπό τον έλεγχο ιστοειδικού υποκινητή διασταυρώνεται με στέλεχος που φέρει τμήμα του γονιδίου στόχου υπό τον έλεγχο της αλληλουχίας UAS (Upstream Activating Sequence). Οι απόγονοι της παραπάνω διασταύρωσης υπερεκφράζουν το γονίδιο στόχο στον επιθυμητό ιστό (προσαρμογή από <https://smallscienceworks.com/tag/uas-gal4/>).

Η καλλιέργεια των εντόμων πραγματοποιείται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 23-25°C, με υγρασία 60% και με δωδεκάωρη εναλλαγή φωτισμού. Για τη μελέτη μας χρησιμοποιούνται οι πρωτεασωμικοί αναστολείς BTZ, CFZ σε συγκεντρώσεις 1, 5μM και 50, 75μM αντίστοιχα, ο αναστολέας της κινάσης TOR, Ραπαμυκίνη (RAP) σε συγκέντρωση 100 μM και ο επαγωγέας της κινάσης AMPK, MET σε συγκέντρωση 1 και 5 mM. Οι παραπάνω ουσίες προστέθηκαν κατευθείαν στη τροφή των εντόμων. Ως τροφή μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε τροφή με τη προσθήκη του διαλύτη κάθε ουσίας.

3.1.6 Η τροφή των εντόμων

Η κανονική τροφή (standard medium) των εντόμων είναι η εξής (για μία δόση, ~65 σωλήνες καλλιέργειας):

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

Ογκομετρούμε 450ml H₂O. Σε μικρή ποσότητα νερού από τα 450ml διαλύουμε τη μαγιά και τον τοματοπολτό. Έπειτα, βράζουμε το υπόλοιπο H₂O και προσθέτουμε το άγαρ, τη διαλυμένη μαγιά και τη ζάχαρη. Αφήνουμε να πάρει άλλη μία βράση, προσθέτουμε τον τοματοπολτό. Κατόπιν ρίχνουμε σταδιακά το ριζάλευρο ανακατεύοντας, προσθέτουμε την αιθανόλη και το προπιονικό οξύ. Τέλος, μετά τη στερεοποίηση της τροφής σε σωληνάκια καλλιέργειας σε θερμοκρασία δωματίου, σε κάθε σωλήνα προστίθεται μία σταγόνα αιθανόλης (EtOH) και μία σταγόνα προπιονικού οξέος. Οι τροφές αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι 24 ώρες και στη συνέχεια αποθηκεύονται στους 4°C.

3.1.7 Διαλύματα

Διάλυμα τεχνητής αιμολέμφου	108mM Na ⁺ , 5mM K ⁺ , 2mM Ca ²⁺ , 8mM MgCl ₂ , 1mM NaH ₂ PO ₄ , 4mM NaHCO ₃ , 10mM σακχαρόζη, 5mM τρεχαλόζη, 5mM HEPES, pH 7,1 σε dH ₂ O
------------------------------------	---

Διάλυμα λύσης NP-40	15mM NaCl 1% NP-40 (v/v) 50mM Tris pH 8,0 σε dH ₂ O
Διάλυμα 1X TBS	20mM Tris 137mM NaCl pH 7,6 σε dH ₂ O
Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x LRB	25mM Tris 192mM γλυκίνη 0,1% (w/v) SDS pH 8,3 σε dH ₂ O
Διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών	39mM γλυκίνη 43,6mM Tris 15% (v/v) μεθανόλη σε dH ₂ O
Διάλυμα stripping	62,5mM Tris 2 % (w/v) SDS 7 % (v /v) 2- μερκαπτοαιθανόλη pH 6,8 σε dH ₂ O
Διάλυμα λύσης 26S	0,2 % NP-40 (v/v) 5mM ATP 10% γλυκερόλη (v/v) 20mM KCl 1mM EDTA 1mM DDT 20mM Tris pH 7,6 σε dH ₂ O

Διάλυμα μέτρησης μιτοχονδριακής αναπνοής	120mM KCl 5mM KH_2PO_4 3mM Hepes 1mM EGTA 1mM MgCl_2 0,2% BSA pH 7,2 σε dH_2O
Διάλυμα απομόνωσης μιτοχονδρίων	0,32M σουκρόζη 10mM EDTA 10mM Tris/HCl 2% BSA (w/v) pH 7,3 σε dH_2O
Διάλυμα αντίδρασης για τη μέτρηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας	100mM Hepes pH 7, 4 σε dH_2O
Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης για τη μέτρηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας	30mM CH_3COONa 70mM CH_3COOH 100mM $\text{ClCH}_2\text{COONa}$ pH 5,3 σε dH_2O
Διάλυμα απομόνωσης μιτοχονδρίων	0,32M σουκρόζη 10mM EDTA 10mM Tris/HCl 2% BSA (w/v) pH 7,3 σε dH_2O

Διάλυμα αντίδρασης για τη μέτρηση της ενεργότητας των καθεψινών B και L	50mM οξικό νάτριο 8mM υδροχλωρική κυστεΐνη 1mM EDTA pH 5,0 σε dH₂O
---	--

3.2 Μέθοδοι

Στην πρώτη φάση της παρούσας εργασίας που αφορά στο χαρακτηρισμό της ρύθμισης του πρωτεασώματος σε ασθενείς με Πολλαπλούν Μυέλωμα, ΕΚ και ΜΚΠΑ συλλέχθηκαν από περιφερικό αίμα τόσο υγιών δοτών όσο και ασθενών που έλαβαν ως θεραπεία ΒΤΖ ή CFZ. Συγκεκριμένα, όλοι οι συμμετέχοντες που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη έδωσαν την συγκατάθεση τους κατόπιν ενημέρωσης. Η μελέτη διεξήχθη σύμφωνα με τα πρότυπα δεοντολογίας της θεσμικής και εθνικής επιτροπής έρευνας και τη Διακήρυξη του Ελσίνκι του 1964, με τις μεταγενέστερες τροποποιήσεις της. Έχει ληφθεί, επίσης, έγκριση από την επιστημονική επιτροπή του Γενικού Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» για τη συλλογή των δειγμάτων αίματος. Η μέση ηλικία ανά φύλο και ο αριθμός των υγιών δοτών υποδεικνύεται στο διάγραμμα 4.1. Όσον αφορά στους υπό εξέταση ασθενείς, πρόκειται για 26 διαγνωσθέντες με συμπτωματικό πολλαπλούν μυέλωμα. Οι ασθενείς δέχτηκαν θεραπεία με CFZ ή με ΒΤΖ στην ογκολογική θεραπευτική κλινική του Γενικού Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα». Η μέση ηλικία των αρρένων ασθενών είναι τα 67 έτη $\pm$ 13,95 (εύρος 37-84) ενώ η μέση ηλικία των θηλέων ασθενών είναι τα 74 έτη $\pm$ 6,67 (εύρος 65-87). Οι υγιείς δότες αλλά και οι ασθενείς παρείχαν μόνο αίμα.

Στη δεύτερη φάση που αφορά στη μελέτη της επίδρασης της πρωτεασωμικής δυσλειτουργίας στην καρδιά εντόμων *Drosophila*, καρδιακός ιστός από αρσενικά και θηλυκά άτομα συλλέχθηκε και εξετάστηκε.

Τα πειράματα που αφορούν στη μελέτη της μερικής αναστολής του πρωτεασώματος με γενετικό και φαρμακολογικό τρόπο στην καρδιά πραγματοποιήθηκαν σε νεαρά έντομα ηλικίας 15-18 ημερών. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της χορήγησης αναστολέων (ή και ΜΕΤ/ΡΑΡ), τα έντομα παρέμειναν στην τροφή για 14 ημέρες (η μεταφορά των εντόμων σε φρέσκια τροφή πραγματοποιήθηκε κάθε 2-3 μέρες).

3.2.1 Διαχωρισμός κυττάρων του αίματος

Ο διαχωρισμός των κυττάρων από το ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος Lymphosep (Lymphocyte Separation Medium, Biosera), πυκνότητας $1,077 \pm 0,001\text{g/ml}$. Αρχικά, το αίμα συλλέχθηκε σε ηπαρινισμένα σωληνάρια και έπειτα, αραιώθηκε με PBS (1:2 του όγκου του δείγματος) σε πλαστικούς σωλήνες των 50ml. Εν συνεχεία, τοποθετήθηκαν 5ml Lymphosep σε πλαστικούς σωλήνες των 15ml και ακολούθησε σταδιακή και προσεχτική προσθήκη του αραιωμένου αίματος (10ml) υπό κλίση. Οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν (400g) σε θερμοκρασία δωματίου για 30'. Στο σημείο αυτό, συλλέχθηκε ο δακτύλιος των ΜΚΠΑ καθώς και η φάση των ΕΚ [απομάκρυνση μέσω απόχυσης της ανωτέρας φάσης (κοκκιοκύτταρα)], τα οποία ξεπλύθηκαν με PBS.

3.2.2 Ανατομία καρδιακού ιστού σε έντομα *Drosophila melanogaster*

Έντομα συλλέχθηκαν και αναισθητοποιήθηκαν σε ειδικό σύστημα νάρκωσης με CO_2 . Η ανατομία του καρδιακού ιστού πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ειδικών λαβίδων και ψαλιδιού ανατομίας (Vannas Spring Scissors, straight/2,5mm) σε διάλυμα PBS. Να σημειωθεί ότι πρόκειται για εμπλουτισμένα σε καρδιακό ιστό δείγματα και όχι για καθαρό καρδιακό ιστό.

3.2.3 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του RNA από τα εμπύρρινα ΜΚΠΑ πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού kit (NucleoSpin® RNA, Macherey Nagel), ενώ για τον καρδιακό ιστό των εντόμων με τη χρήση RNAzol (Molecular Research Center, Inc). Επόμενο βήμα, πριν προχωρήσουμε στη διεξαγωγή των πειραμάτων, ήταν η εκτίμηση της ποιότητας και της καθαρότητας του απομονωμένου υλικού και ο υπολογισμός της συγκέντρωσής του ($\text{ng}/\mu\text{L}$). Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο BioSpec-nano (Shimadzu). Εν συνεχεία συντέθηκε cDNA, χρησιμοποιώντας το kit σύνθεσης cDNA (cDNA for RT-qPCR, Thermo Fisher Scientific).

3.2.4 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, Q-RT PCR)

Προχωρήσαμε σε Q-RT PCR προκειμένου να ελέγξουμε τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων τόσο στα ΜΚΠΑ όσο και στους καρδιακούς ιστούς των εντόμων. Η αντίδραση Q-RT PCR πραγματοποιείται στον θερμοκυκλοποιητή PikoReal Real-Time (Thermo Fisher Scientific), σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix της Thermo Scientific. Οι καμπύλες τήξης (Melting curves) εξετάζονται μετά το στάδιο του πολλαπλασιασμού του προϊόντος της PCR για την επιβεβαίωση μοναδικών ειδικών προϊόντων. Επίσης, για κάθε ζεύγος εκκινητών (primers) πραγματοποιείται πρότυπη καμπύλη για να βρεθεί η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσής τους.

Το πρόγραμμα που ακολουθείται είναι το εξής:

-95°C για 10'	
-95°C για 15''	} Χ40 κύκλοι
-60°C για 30''	
-72°C για 30''	

Το στάδιο για τη δημιουργία των καμπύλων τήξης πραγματοποιείται στους 58-95°C.

3.2.5 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα εκχυλίσματα προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη δέσμευση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue στα βασικά κυρίως αμινοξέα των πρωτεϊνών. Η δέσμευση είναι ανάλογη της ποσότητας της πρωτεΐνης και μετατοπίζει το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης της χρωστικής από τα 470nm στα 595nm. Το χρώμα του συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερό για μια ώρα περίπου και έχει υψηλό μοριακό συντελεστή απορρόφησης που συνεπάγεται υψηλή ευαισθησία στις ποσοτικές μετρήσεις πρωτεϊνικών δειγμάτων. Με τη βοήθεια διαλυμάτων BSA γνωστών συγκεντρώσεων, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη, από την οποία υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνη. Η οπτική πυκνότητα στα 595nm μετράται σε φωτόμετρο.

3.2.6 Απομόνωση πρωτεασωμάτων και καταγραφή των τριών ενζυμικών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων

Οι ιστοί ή τα κύτταρα συλλέγονται στο διάλυμα λύσης 26S με προσθήκη ATP τελικής συγκέντρωσης 5mM, προκειμένου να απομονωθούν ενεργά πρωτεασώματα. Το ATP διατηρεί ενεργό το πρωτεάσωμα και είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του. Ακολούθησε ομογενοποίηση των δειγμάτων και η τοποθέτησή τους στη ρόδα στους 4°C για 30'. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10' στους 4°C και σε 19.000g και συλλέχθηκε το υπερκείμενο που περιέχει τις πρωτεΐνες των κυττάρων. Έπειτα, με τη μέθοδο Bradford έγινε η ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου και υπολογίστηκε ο όγκος του δείγματος ώστε να ληφθούν 30μgr πρωτεΐνης από τα ΜΚΠΑ, 90μgr πρωτεΐνης από τα ΕΚ ή 15μgr πρωτεΐνης για τον καρδιακό ιστό. Οι πρωτεΐνες τοποθετήθηκαν εις διπλούν (duplicated) σε διάλυμα αντίδρασης (Hepes, 100mM, pH 7,4) το οποίο είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που διατηρεί σταθερή την ενεργότητα του πρωτεασώματος, καθώς προσομοιάζει το περιβάλλον του κυττάρου. Ξεχωριστά τοποθετήθηκαν κάθε ένα από τα τρία φθοροπεπτίδια για την ανίχνευση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης/CT-L (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, LLVY), κασπάσης/C-L (Z-Leu-Leu-Glu-AMC, LLE) και θρυψίνης/T-L (Boc-Leu-Arg-Arg-AMC, LRR), τα οποία είναι ειδικά για κάθε μια πρωτεασωμική υπομονάδα, β5, β1 και β2, αντίστοιχα. Κατά τη διαδικασία της επώασης, το κάθε φθοροπεπτίδιο αναγνωρίζεται από την αντίστοιχη ενζυμική ενεργότητα του πρωτεασώματος (το φθοροπεπτίδιο LLVY από την ενεργότητα χυμοθρυψίνης που εδράζεται στην υπομονάδα β5, το LLE από την ενεργότητα κασπάσης που εδράζεται στην υπομονάδα β1 και το LRR από την ενεργότητα θρυψίνης που εδράζεται στην υπομονάδα β2. Το φθοροπεπτίδιο αποικοδομείται και παράγεται φθορισμός. Μετά την επώαση προστίθεται διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης και ο παραγόμενος φθορισμός καταγράφεται στο φθορισμόμετρο (φίλτρο διέγερσης, 350nm/φίλτρο εκπομπής, 440nm; VersaFluor™ Fluorometer System, Biorad). Η συγκέντρωσή τους στο εκχύλισμα υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford.

3.2.7 SDS-PAGE-Ανοσοσύπωμα Western

Προκειμένου να ποσοτικοποιήσουμε την πρωτεϊνική έκφραση των ΜΚΠΑ και των ΕΚ αλλά και των καρδιακών ιστών προχωρήσαμε σε απομόνωση των πρωτεϊνών προσθέτοντας στα δείγματα διάλυμα λύσης NP-40 που περιέχει αναστολείς πρωτεασών. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10' στους 4°C, σε 19.000g και συλλέχθηκε το υπερκείμενο

που περιέχει τις πρωτεΐνες των κυττάρων. Έπειτα, με τη μέθοδο Bradford υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους στο εκχύλισμα. Ακολούθησε η ανάλυση των πρωτεϊνών σε ομοιογενές πήκτωμα 12% ακρυλαμίδης, μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια, η μεμβράνη επώασθηκε για 50' με διάλυμα κάλυψης των μη ειδικών θέσεων [5% γάλα με χαμηλά λιπαρά διαλυμένο σε 1XTBS παρουσία 0,1% Tween-20] σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα που φέρει την υπεροξειδάση του ραπανακιού (Horseradish peroxidase-HRP) (διαλυμένα στο διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων) επώασθηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιήθηκαν 3 πλυσίματα μετά τις επώσεις με τα αντισώματα με διάλυμα 1XTBS, 0,1% Tween-20. Η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου (υπό μελέτη πρωτεΐνη) -αντισώματος έγινε με τη μέθοδο ECL (Santa Cruz Biotechnology) και τη χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (υπόστρωμα για το ένζυμο υπεροξειδάση) και λουμινόλης ως ενισχυτή χημειοφωταύγειας. Η χημειοφωταύγεια αποτυπώνεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας και η εμφάνιση του φιλμ πραγματοποιείται με τη μεταφορά του σε διάλυμα εμφάνισης (developer) για περίπου 1' έως 5'. Ακολουθεί ξέπλυμα σε H₂O βρύσης και μονιμοποίηση σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) για ~5'. Τέλος, το φιλμ ξεπλένεται πολύ καλά με H₂O βρύσης. Οι μεμβράνες χρησιμοποιήθηκαν ξανά, αφού αφαιρέθηκαν τα αντισώματα μετά από επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα stripping στους 60°C για 45' και αφού ακολούθησαν 3 πλυσίματα της μεμβράνης με διάλυμα 1XTBS, 0,1% Tween-20.

3.2.8 Ανίχνευση οξειδωμένων πρωτεϊνών (OxyBlot)

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

3.2.9 Έλεγχος της κινητικότητας των εντόμων (νευρομυϊκή δραστηριότητα)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε για τον έλεγχο της κινητικότητας των εντόμων είναι σύμφωνα με τους Vernace και συν (2007). Ειδικότερα, 30 έντομα (15 θηλυκά και 15 αρσενικά) που πρόκειται να εξετασθούν αναισθητοποιούνται με αιθέρα ή CO₂ και τοποθετούνται μέσα σε ένα ογκομετρικό κύλινδρο των 100ml κλεισμένο ελαφρώς με ένα βαμβάκι. Αφήνουμε τα έντομα να αποκτήσουν πλήρως τις αισθήσεις τους (περίπου 20') και έπειτα, με ένα ελαφρύ χτύπημα κατεβάζουμε τα έντομα στον πάτο του κυλίνδρου και μετράμε πόσα άτομα θα περάσουν το όριο των 55,5ml σε χρόνο 20''. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία για 3 φορές και καταγράφουμε τα αποτελέσματα.

3.2.10 Έλεγχος της βιωσιμότητας των εντόμων

Για τον έλεγχο του προσδόκιμου ζωής των εντόμων, ίσος αριθμός θηλυκών και αρσενικών εντόμων συλλέγονται (τουλάχιστον 60 θηλυκά και 60 αρσενικά έντομα) και καλλιεργούνται σε σωλήνες καλλιέργειας. Τα έντομα μεταφέρονται σε φρέσκια τροφή κάθε 3-4 μέρες με καθημερινή καταγραφή της θνησιμότητας. Για τη δημιουργία των καμπυλών βιωσιμότητας χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Kaplan-Meier, καθώς και η στατιστική ανάλυση log-Rank (Mantel-Cox).

3.2.11 Μέτρηση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS assay)

Οι καρδιακοί ιστοί συλλέγονται σε 200μl PBS (εις διπλούν το κάθε δείγμα). Στη συνέχεια, προστίθεται η χρωστική DCF-DA (Invitrogen) διαλυμένη σε PBS (200μl) σε συγκέντρωση 10μM. Ακολουθεί vortex για κάθε δείγμα και επώαση (30') στους 25°C (για τους ιστούς) στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, αφαιρείται η χρωστική και ακολουθεί επώαση για 20' με 200μl φρέσκο PBS πάλι στους 25°C και στο σκοτάδι. Τα δείγματα ξεπλένονται δύο φορές με φρέσκο PBS και ομογενοποιούνται με διάλυμα λύσης NP-40. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10' στις 19.000g (4°C), συλλέγεται το υπερκείμενο και ακολουθεί η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τέλος, στο υπερκείμενο προστίθεται dH₂O μέχρι το 1ml και με τη χρήση του φθορισμόμετρου (VersaFluor TM Fluorometer System, Biorad) και των φίλτρων μήκους κύματος διέγερσης (Excitation) 490nm και μήκους κύματος εκπομπής (Emission) 520nm, καταγράφεται ο εκπεμπόμενος

φθορισμός. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται δείγμα που περιέχει τη χρωστική, αλλά δεν έχει πρωτεΐνη. Η κανονικοποίηση πραγματοποιείται ως προς την ποσότητα της πρωτεΐνης.

3.2.12 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των καθεψινών B και L

Η ενεργότητα των καθεψινών B και L εξετάσθηκε σύμφωνα με τους Grimm et al. (2012) με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, οι καρδιακοί ιστοί ομογενοποιούνται σε διάλυμα 1mM dithiothreitol και Tris/HCl 1M pH 5,0, ακολουθώντας φυγοκέντρηση για 15' σε 19.000g (4°C). Ακολουθεί ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και στη συνέχεια, 7-10μg πρωτεΐνης προστίθενται στο διάλυμα της αντίδρασης. Το μίγμα επωάζεται παρουσία του φθοροπεπτιδίου Z-RR-AMC (Enzo Life Sciences) για 30' στους 37°C. Μετά το τέλος της επώασης, καταγράφεται ο παραγόμενος φθορισμός (φθορισμόμετρο–VersaFluor™ Fluorometer System, Biorad) με φίλτρα μήκους κύματος διέγερσης 350nm και μήκους κύματος εκπομπής 440 nm.

3.2.13 Απομόνωση μιτοχονδρίων από σωματικούς ιστούς των εντόμων

Τα μιτοχόνδρια απομονώνονται σύμφωνα με τη μέθοδο των Ferguson et al. (2005) με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, οι σωματικοί ιστοί [χωρίς το αναπαραγωγικό σύστημα (Tsakiri et al., 2013a) από ~20-30 έντομα ομογενοποιούνται σε 300-350μl κρύο διάλυμα απομόνωσης που περιέχει 2% (w/v) BSA. Το ομογενοποίημα φιλτράρεται σε ένα στρώμα γάζας και το φίλτρο γάζας ξεπλένεται με διάλυμα απομόνωσης μέχρι να έχουμε τελικό όγκο 1,5ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10' σε 2.200xg (4°C). Το ίζημα ξεπλένεται με διάλυμα απομόνωσης χωρίς BSA και επαναδιαλύεται σε 300μl του ίδιου διαλύματος και ακολουθεί μέτρηση της μιτοχονδριακής αναπνοής.

3.2.14 Μέτρηση της μιτοχονδριακής αναπνοής

Η μέτρηση της μιτοχονδριακής αναπνοής ή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης επιτυγχάνεται με τη χρήση του ηλεκτροδίου οξυγόνου τύπου Clark, το οποίο συνδέεται με τη μονάδα καταγραφής των επιπέδων οξυγόνου Oxygraph (Oxygraph control unit- Hansatech Instruments, Norfolk, UK), όπως έχει περιγραφεί από τους Cogliati et al., 2013. Εν συντομία, σε ειδικό διάλυμα μέτρησης της μιτοχονδριακής αναπνοής προστίθενται 5mM

γλουταμικό 2,5mM μηλικό και καταγράφονται τα βασικά επίπεδα κατανάλωσης οξυγόνου. Εν συνεχεία προστίθενται στο διάλυμα 150μg άθικτων μιτοχονδρίων (φάση II). Έπειτα, ανά διαστήματα 5-7 λεπτών προστίθενται υποστρώματα που επηρεάζουν τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα, αρχικά προστίθενται 500μM ADP (φάση III), κατόπιν 6μM ολιγομυκίνης (αναστολέας της συνθετάσης του ATP) (φάση IV) και τέλος 100 nM FCCP (carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone), το οποίο προκαλεί διαταραχή της σύνθεσης του ATP καθώς δημιουργείται μεταφορά πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης (φάση V). Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή στους 25°C. Ο μέγιστος όγκος των αντιδράσεων δε ξεπερνά τα 300μl. Ο ρυθμός της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (ρυθμός αναπνευστικού ελέγχου-respiratory control ratio-RCR) εκτιμάται από το λόγο φάση III/φάση IV.

3.2.15 Απομόνωση ημι-άθικτου καρδιακού ιστού και οπτικοποίηση καρδιακού παλμού σε ενήλικα έντομα.

Για την οπτικοποίηση του καρδιακού χτύπου ενήλικου εντόμου πραγματοποιήθηκε ανατομία σε νεαρές μύγες σύμφωνα με τους Vogler και Ocorr (Vogler και Ocorr, 2009) με μικρές τροποποιήσεις. Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε ένα οξυγονωμένο, τεχνητό διάλυμα αιμολέμφου σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συντομία, οι μύγες αναισθητοποιήθηκαν μετά από σύντομη έκθεση στο κρύο (η έκθεση σε αιθέρα ή CO₂ επηρεάζει τον καρδιακό χτύπο). Τα έντομα τοποθετήθηκαν στη συνέχεια (ραχιαία πλευρά προς τα κάτω) σε τρυβλίο Petri επικαλυμμένο με λεπτό στρώμα βαζελίνης για να αποφευχθεί οποιαδήποτε κίνηση. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε η ανατομία χρησιμοποιώντας ειδικό ψαλίδι ανατομίας (Vannas Spring Scissors, straight, 2,5mm). Με τη χρήση λαβίδων και κατάλληλων τριχοειδών (διάμετρος μικρότερη από 40μm) απομακρύνθηκε η κοιλιακή επιδερμίδα και όλα τα εσωτερικά όργανα για να αποκαλυφθεί ο καρδιακός σωλήνας. Η καταγραφή της καρδιακής δραστηριότητας ολοκληρώθηκε με τη χρήση ψηφιακής κάμερας μικροσκοπίου BMS τοποθετημένης σε στερεοσκόπιο BMS. Όλες οι καταγραφές διήρκησαν (~) 30'' ανά δείγμα.

3.2.16 Χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης (Confocal Laser Scanning Microscopy-CLSM)

Πραγματοποιήθηκε ανατομία σε νεαρά έντομα *Drosophila melanogaster*. Εν συνεχεία οι καρδιακοί ιστοί απομονώθηκαν σε τεχνητό διάλυμα αιμολέμφου και μονιμοποιήθηκαν με φορμαλδεΰδη 4% σε διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) για 15', ενώ πραγματοποιήθηκε διαφορική χρώση με διάλυμα DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, Molecular Probes) ή και φαλλοϊδίνη. Ακολούθως, επισημαίνονται με αντίσωμα έναντι της υπό μελέτη πρωτεΐνης και παρατηρούνται σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Confocal Laser Scanning Microscopy) έπειτα από οπτική επανασύσταση 26 σειριακών τομών πάχους 1μm.

3.2.17 Μελέτη των πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων του εντόμου

Για να μελετηθούν τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, από την απόθεση του εμβρύου μέχρι και την εκκόλαψη του ενήλικου εντόμου, νεαρά γονιμοποιημένα θηλυκά έντομα τοποθετούνται για 1 ημέρα σε τρυβλία Petri που περιέχουν 1,5% άγαρ σε χυμό βύσσινου. Τα γονιμοποιημένα ωοθυλάκια (30 ανά πείραμα) καλλιεργούνται στη συνέχεια σε κανονική τροφή. Ο αριθμός των νυμφών και των ενήλικων εντόμων που εκκολάπτονται καταγράφονται.

3.2.18 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η ηλικία, το φύλο, ο τύπος θεραπείας, η ημέρα πρώτης απόκρισης στη θεραπεία, η ημέρα καλύτερης απόκρισης, το επίπεδο απόκρισης, ο τύπος του πολλαπλού μυελώματος, η σταδιοποίηση κατά ISS (International Staging System) συνεκτιμήθηκαν για όλους τους ασθενείς. Το κλινικό αποτέλεσμα και η απόκριση στη θεραπεία σύμφωνα με τα κριτήρια IMWG (International Myeloma Working Group) καταγράφηκε. Η ελεύθερη νόσου επιβίωση (Progression Free Survival, PFS) καθώς και η ολική επιβίωση (overall survival) μετρήθηκαν από την πρώτη ημέρα της θεραπείας μέχρι την εξέλιξη της νόσου ή το θάνατο από οποιοδήποτε αίτιο. Οι συντελεστές συσχέτισης Spearman και Pearson εφαρμόστηκαν προκειμένου να ελεγχθούν οι σχέσεις μεταξύ διαφόρων παραμέτρων και κλινικών δεδομένων. Οι παραπάνω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του SPSS 23 software (IBM SPSS statistics for Windows, Version 23.0, IBM Corp, Armonk, NY, USA). Όλες

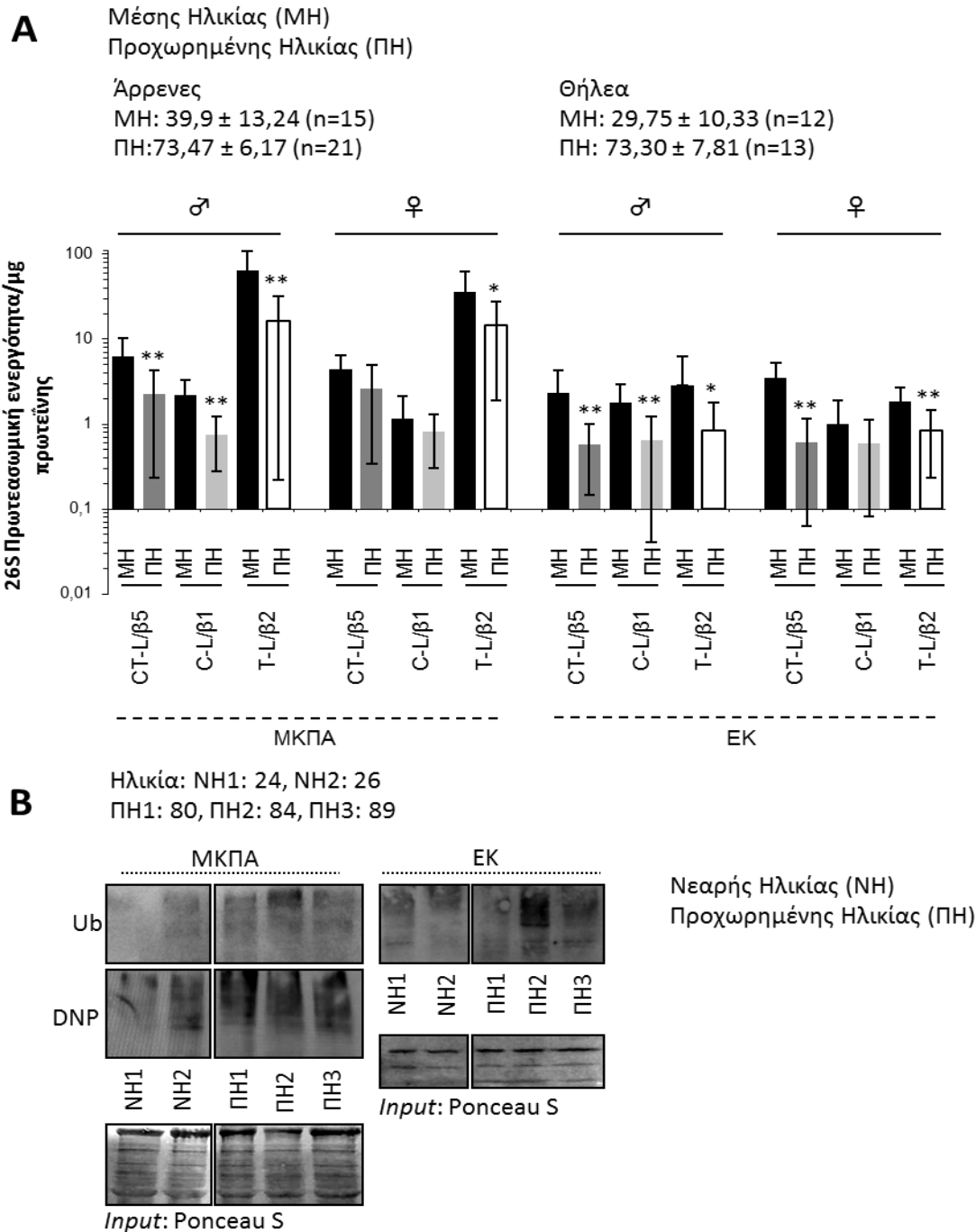
οι δοκιμές διενεργήθηκαν, τουλάχιστον, εις διπλούν. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα excel. Η στατιστική σημαντικότητα εκτιμήθηκε εφαρμόζοντας τον έλεγχο T (t-test). Οι γραμμές σφάλματος στα διαγράμματα υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση και η στατιστική σημαντικότητα υποδεικνύεται με έναν ή δύο αστερίσκους όταν η τιμή σημαντικότητας (p-value) είναι $P < 0,05$ ή $P < 0,01$, αντίστοιχα.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

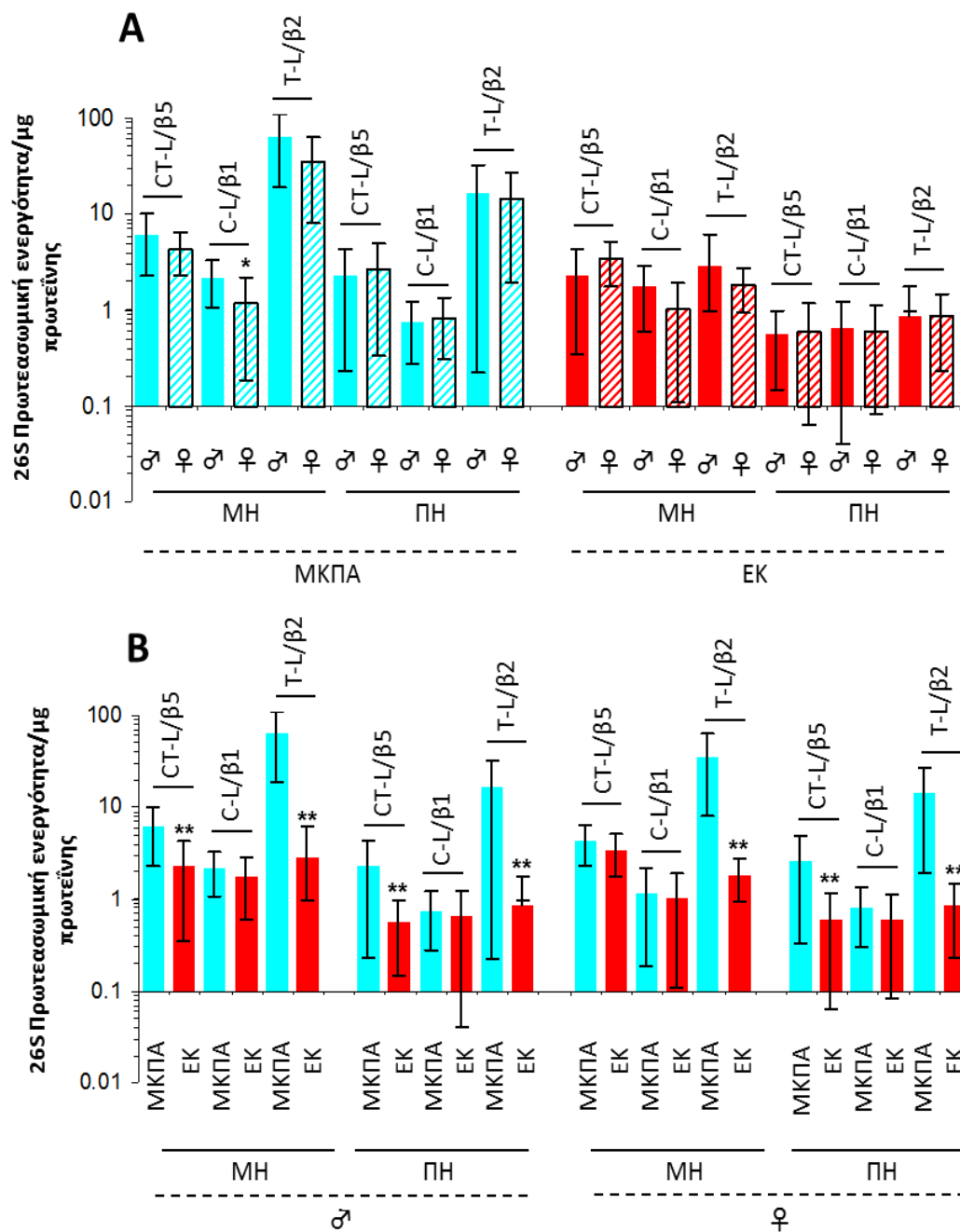
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Οι βασικές ενεργότητες πρωτεασώματος σε ΜΚΠΑ και ΕΚ από υγιείς δότες χαρακτηρίζονται από σημαντική μεταβλητότητα και μείωση κατά τη διάρκεια της γήρανσης

Προκειμένου να μελετηθούν οι πιθανές μεταβολές στην πρωτεασωμική λειτουργία κατά τη γήρανση σε κύτταρα περιφερικού αίματος πραγματοποιήθηκε απομόνωση ΜΚΠΑ και ΕΚ από υγιείς δότες. Συγκρίνοντας άτομα μέσης (ΜΗ) και προχωρημένης (ΠΗ) ηλικίας παρατηρήθηκε μείωση των τριών ενζυμικών ενεργοτήτων με την αύξηση της ηλικίας (ανεξαρτήτως φύλου) τόσο στα ΜΚΠΑ όσο και στα ΕΚ (Εικ. 4.1Α). Σε συμφωνία με τα παραπάνω δεδομένα, αναλύσεις σε κύτταρα αίματος από υγιείς δότες νεαρής (ΝΗ) και προχωρημένης ηλικίας έδειξαν αυξημένη ουβικιτινίωση και καρβονυλίωση πρωτεώματος κατά τη διάρκεια της γήρανσης (Εικ. 4.1Β) υποδεικνύοντας δυσλειτουργία του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Επιπρόσθετα, παρά την τάση για υψηλότερες βασικές πρωτεασωμικές ενεργότητες σε κύτταρα που απομονώθηκαν από υγιείς άρρενες δότες έναντι θηλέων δοτών, αυτές οι διαφορές δεν ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις στατιστικά σημαντικές (Εικ. 4.2Α). Αρκετά ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα ΜΚΠΑ εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα πρωτεασωμικών ενεργοτήτων, σε σύγκριση με τα ΕΚ, τόσο σε άρρενες όσο και σε θήλειες δότες παρόμοιας ηλικίας (Εικ. 4.2Β). Συμπερασματικά, παρά τη μεταβλητότητα που παρουσιάζεται ανά δότη, οι βασικές πρωτεασωμικές ενεργότητες στα κύτταρα του περιφερικού αίματος εξαρτώνται από τον κυτταρικό τύπο και την ηλικία του ατόμου.

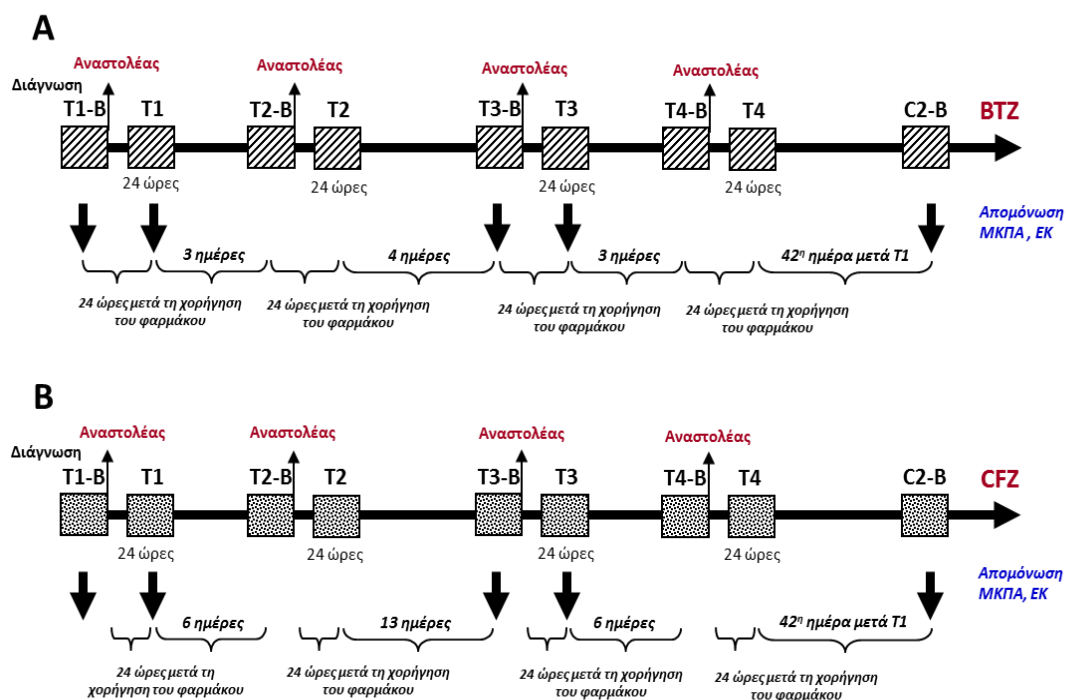


Εικόνα 4.1 Οι ενδογενείς ενεργότητες πρωτεασώματος τόσο στα ΜΚΠΑ όσο και στα ΕΚ μειώνονται κατά τη διάρκεια της γήρανσης. (Α) Ενεργότητες πρωτεασώματος χυμοθρυψίνης CT-L (β5), κασπάσης C-L (β1) και θρυψίνης T-L (β2) σε ΜΚΠΑ και ΕΚ από υγιείς δότες μέσης (ΜΗ) ή προχωρημένης (ΠΗ) ηλικίας. Αναγράφεται η μέση ηλικία και ο αριθμός των δοτών ανά ομάδα. (Β) Αντιπροσωπευτικό ανοσοσύτρωμα ουβικιτινωμένων (Ub) ή καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών (DNP) σε ΜΚΠΑ και ΕΚ απομονωμένα από νεαρούς (ΝΗ) ή ηλικιωμένους (ΠΗ) υγιείς δότες. Η χρώση μεμβρανών νιτροκυτταρίνης με Ponceau S χρησιμοποιήθηκε ως αναφορά για την ίδια ανά δείγμα ολική ποσότητα πρωτεΐνης. Οι ηλικίες των δοτών στο (Β): ΝΗ1: 24, ΝΗ2: 26, ΠΗ1: 80, ΠΗ2: 84, ΠΗ3: 89. Μπάρες σφάλματος: ± SD. * P < 0,05; ** P < 0,01.



Εικόνα 4.2 Τα ΜΚΠΑ εκφράζουν υψηλότερες ενδογενείς πρωτεασωμικές ενεργότητες σε σύγκριση με τα ΕΚ τόσο σε άρρενες όσο και σε θήλεις δότες. Ενεργότητες πρωτεασώματος σε ΜΚΠΑ και ΕΚ που απομονώνονται από μεσήλικες (ΜΗ) ή ηλικιωμένους (ΠΗ) υγιείς δότες. (Α) Τα ΜΚΠΑ των αρρένων δотών εμφάνισαν υψηλότερες ενζυμικές ενεργότητες κασπάσης (C-L) σε σύγκριση με τα ΜΚΠΑ από θήλεις δότες παρόμοιας ηλικίας. Οι υπόλοιπες διαφορές που εμφανίσθηκαν δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. (Β) Τα ΜΚΠΑ εκφράζουν υψηλότερες ενδογενείς ενεργότητες πρωτεασώματος σε σύγκριση με τα ΕΚ. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας επίσης εξετάσθηκε η πρωτεασωμική ενεργότητα των ΜΚΠΑ και των ΕΚ, καθώς και η γονιδιακή έκφραση σε επίπεδο mRNA και πρωτεϊνών των κεντρικών ρυθμιστών του δικτύου πρωτεόστασης σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα που έλαβαν ως θεραπεία τον πρωτεασωμικό αναστολέα BTZ ή CFZ. Τα χρονικά σημεία της αιμοληψίας και της απομόνωσης των κυττάρων περιγράφονται στο ακόλουθο σχήμα.



Εικόνα 4.3 Σχηματική απεικόνιση του πειραματικού σχεδιασμού και των χρονικών σημείων δειγματοληψίας αίματος κατά τη διάρκεια θεραπευτικής αγωγής ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα με BTZ (A) ή CFZ (B). Οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε θεραπεία με καθορισμένες δόσεις BTZ ή CFZ όπως υποδεικνύεται. Τα βέλη υποδηλώνουν τα πέντε χρονικά σημεία (T1B, T1, T3B, T3 και C2B) όπου συλλέχθηκε αίμα για απομόνωση ΜΚΠΑ και ΕΚ τη διενέργεια των βιοδοκιμασιών. C2: Κύκλος 2 της θεραπείας.

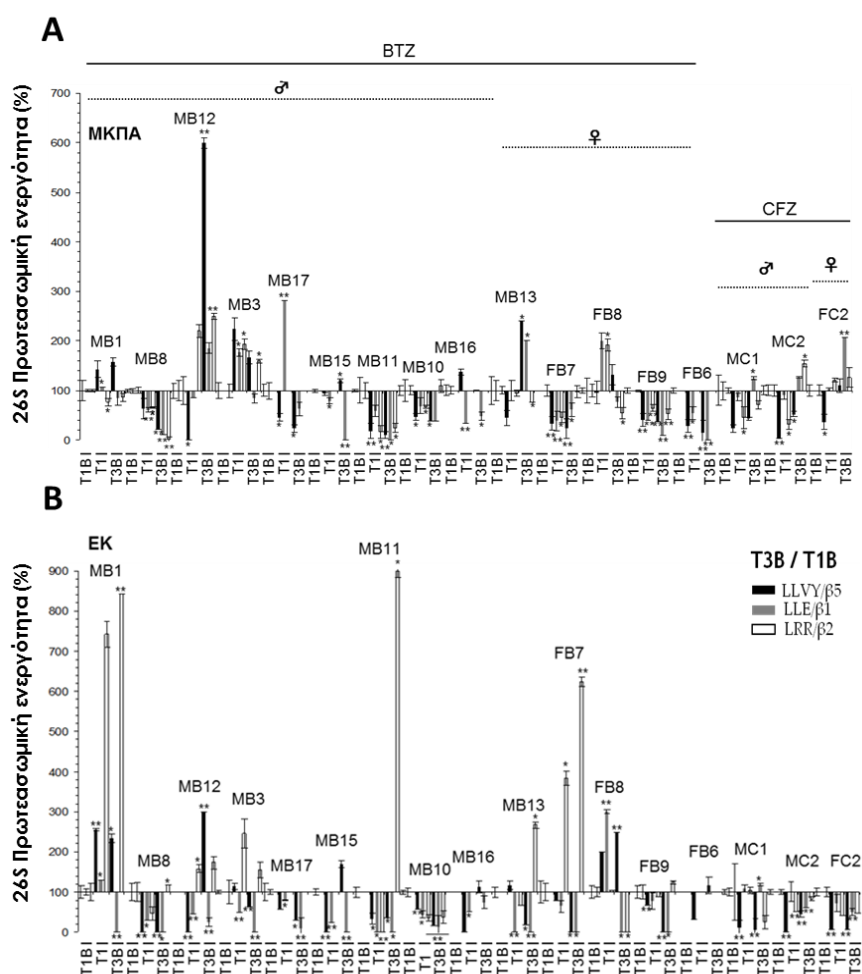
4.2 Η απόκριση στη θεραπεία με Bortezomib ή Carfilzomib παρουσίασε εξάρτηση από τον ασθενή

Προκειμένου να εξετασθούν οι επιδράσεις των πρωτεασωμικών αναστολέων σε μοριακό επίπεδο σε ανθρώπινα περιφερικά κύτταρα αίματος, στη συνέχεια αξιολογήθηκαν οι πρωτεασωμικές ενεργότητες σε διαφορετικά χρονικά σημεία (Εικ. 4.3) κατά τη διάρκεια της θεραπείας των ασθενών. Παρατηρήθηκε ότι στους περισσότερους (αλλά παραδόξως, όχι σε όλους) ασθενείς οι πρωτεασωμικές ενεργότητες (όπως αναμένετο) μειώνονται τόσο

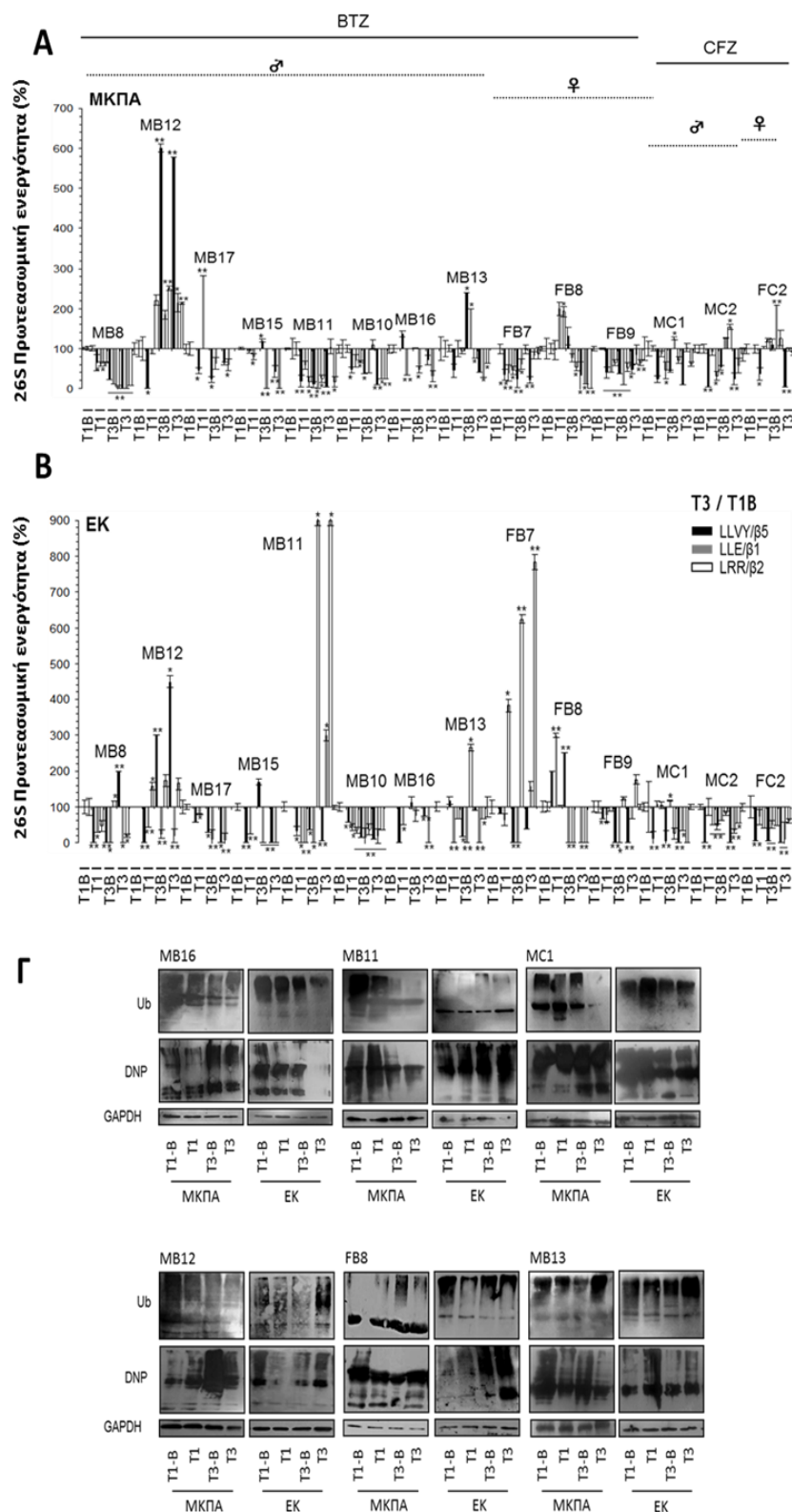
[illegible]

121

ενεργοτήτων σε σύγκριση με τις ενδογενείς ενεργότητες σε ΜΚΠΑ (Α) ή ΕΚ (Β) που απομονώθηκαν πριν από την έναρξη της θεραπείας (Τ1Β). (Γ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοσύτρωμα ουβικιτινωμένων (Ub) ή καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών (DNP) σε ΜΚΠΑ και ΕΚ απομονωμένα από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα. Το GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. MB: Άρρεν ασθενής BTZ; FB: Θήλυ ασθενής BTZ. MC: Άρρεν ασθενής CFZ. FC: Θήλυ ασθενής CFZ. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

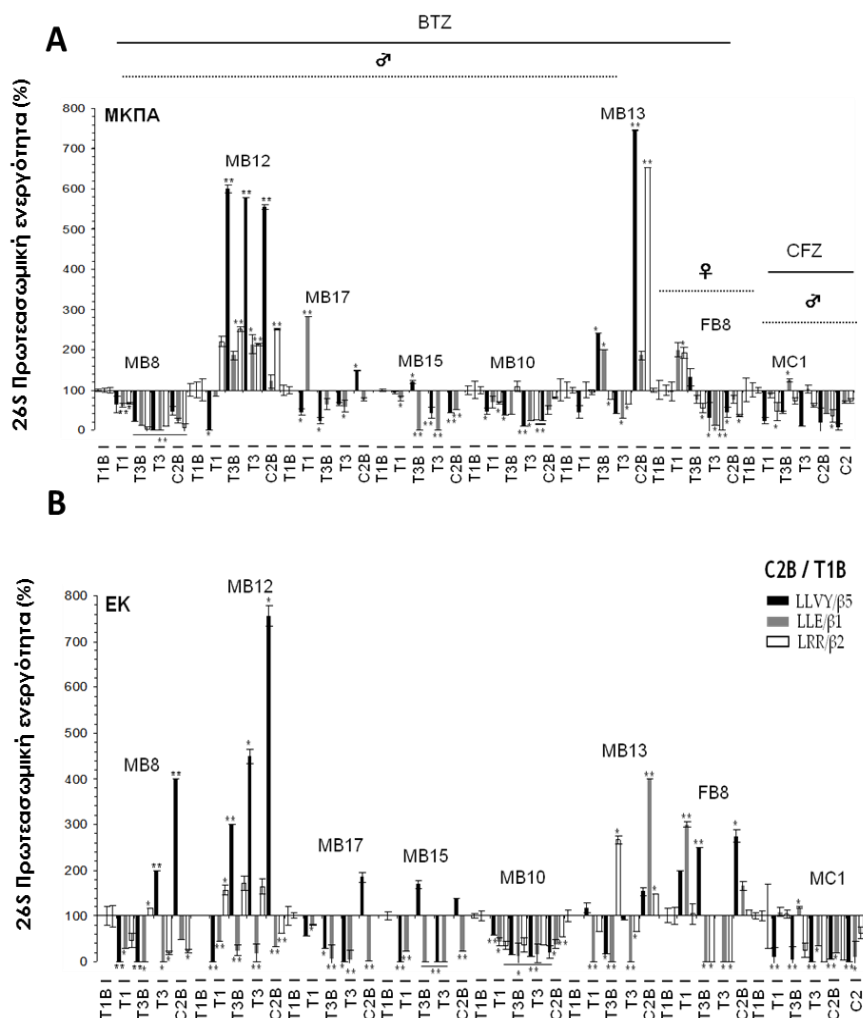


Εικόνα 4.5 Ενεργότητες πρωτεασώματος σε ΜΚΠΑ και ΕΚ που απομονώθηκαν από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα (χρονικό σημείο λήψης θεραπείας Τ3Β). Οι (%) σχετικές ενεργότητες CT-L, C-L και T-L σε χρονικά σημεία Τ1 και Τ3Β (εν συγκρίσει με το χρονικό σημείο Τ1Β) σε ΜΚΠΑ (Α) και ΕΚ (Β) που απομονώθηκαν από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα στους οποίους χορηγήθηκε BTZ ή CFZ. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.



Εικόνα 4.6 Ενεργότητες πρωτεασώματος και επίπεδα ουβικιτινωμένων/καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών σε χρονικό σημείο T3 (εν συγκρίσει με το χρονικό σημείο T1B) σε ΜΚΠΑ και ΕΚ που απομονώθηκαν από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα έπειτα από αγωγή με BTZ ή CFZ. Οι (%) σχετικές ενεργότητες CT-L, C-L και T-L σε χρονικά σημεία T1, T3B και T3 (εν συγκρίσει με το χρονικό σημείο T1B) σε ΜΚΠΑ (Α) και ΕΚ (Β) που απομονώθηκαν από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα έπειτα από θεραπεία με BTZ ή CFZ. Γ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστόψωμα

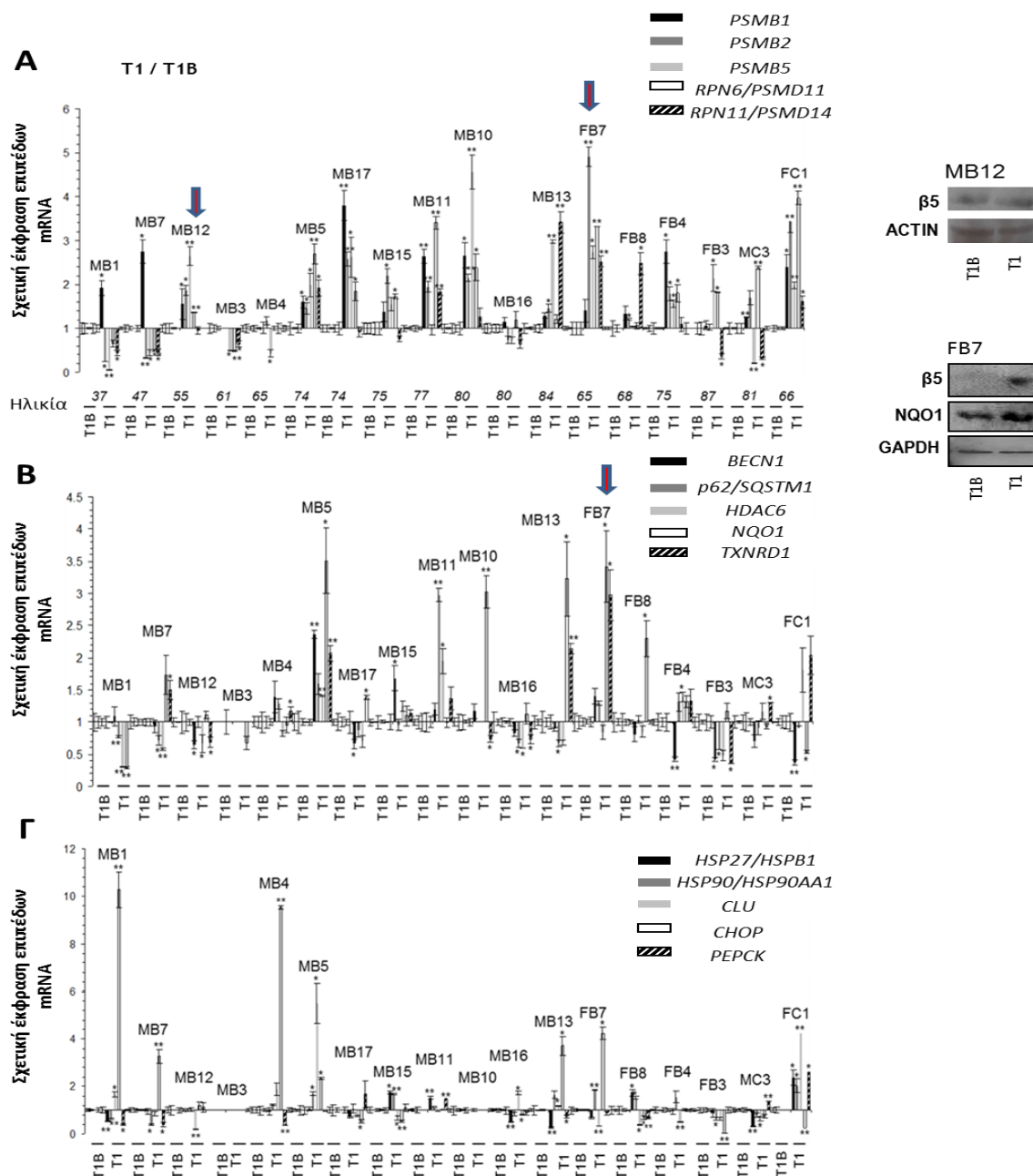
ουβικιτινωμένων (Ub) ή καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών (DNP) σε ΜΚΠΑ και ΕΚ απομονωμένα από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα. Το GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.



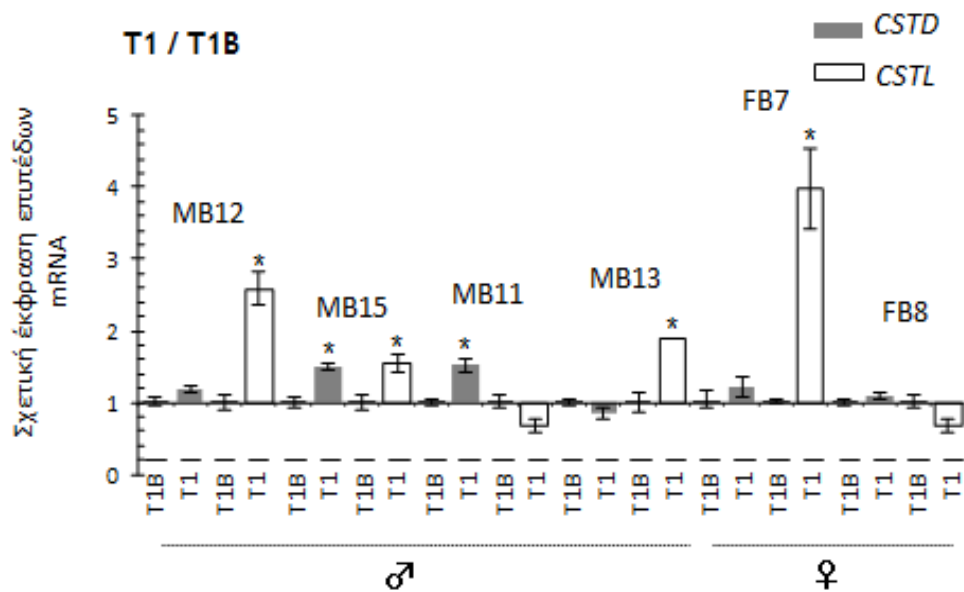
Εικόνα 4.7 Ενεργότητες πρωτεασώματος σε χρονικό σημείο C2B (εν συγκρίσει με το χρονικό σημείο T1B) σε ΜΚΠΑ και ΕΚ που απομονώθηκαν από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα έπειτα από αγωγή με BTZ ή CFZ. Οι (%) σχετικές ενεργότητες CT-L, C-L και T-L σε χρονικά σημεία T1, T3B, T3 και C2B (εν συγκρίσει με το χρονικό σημείο T1B) σε ΜΚΠΑ (A) και ΕΚ (B) που απομονώθηκαν από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα στους οποίους χορηγήθηκε BTZ ή CFZ. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Όπως αναφέρθηκε, ένα απροσδόκητο εύρημα ήταν ότι σε μερικούς ασθενείς, οι πρωτεασωματικές ενεργότητες τόσο σε ΜΚΠΑ όσο και σε ΕΚ αυξήθηκαν παρά τη χορήγηση των θεραπευτικών πρωτεασωματικών αναστολέων. Αυτή η απόκριση εμφανίσθηκε είτε στη χρονική στιγμή T1 (π.χ. ΜΚΠΑ από ασθενείς MB1, MB3 και MB6 ή ΕΚ από ασθενείς MB1 και FB8) είτε σε μεταγενέστερους θεραπευτικούς κύκλους (π.χ. ΜΚΠΑ από ασθενείς MB12, MB3 και MB13 ή ΕΚ από ασθενείς MB8, MB12, MB11, MB13 και FB7) (Εικ. 4.4, 4.5, 4.6, 4.7). Επιπλέον, οι επιδράσεις που προκαλούνται από τη θεραπεία με BTZ ή CFZ στις πρωτεασωματικές ενεργότητες των κυττάρων περιφερικού αίματος έδειξαν ελάχιστη συσχέτιση με τα επίπεδα ουβικιτινίωσης και/ή καρβονυλίωσης των απομονωμένων ΜΚΠΑ ή ΕΚ (π.χ. ασθενείς MB8, FB4 και FB5) (Εικόνα 4.6Γ) υποδεικνύοντας ότι πιθανότατα άλλα λειτουργικά στοιχεία του δικτύου πρωτεόστασης ενεργοποιούνται προκειμένου να μειώσουν το πρωτεοτοξικό στρες και την πρωτεωμική αστάθεια λόγω αναστολής του πρωτεασώματος.

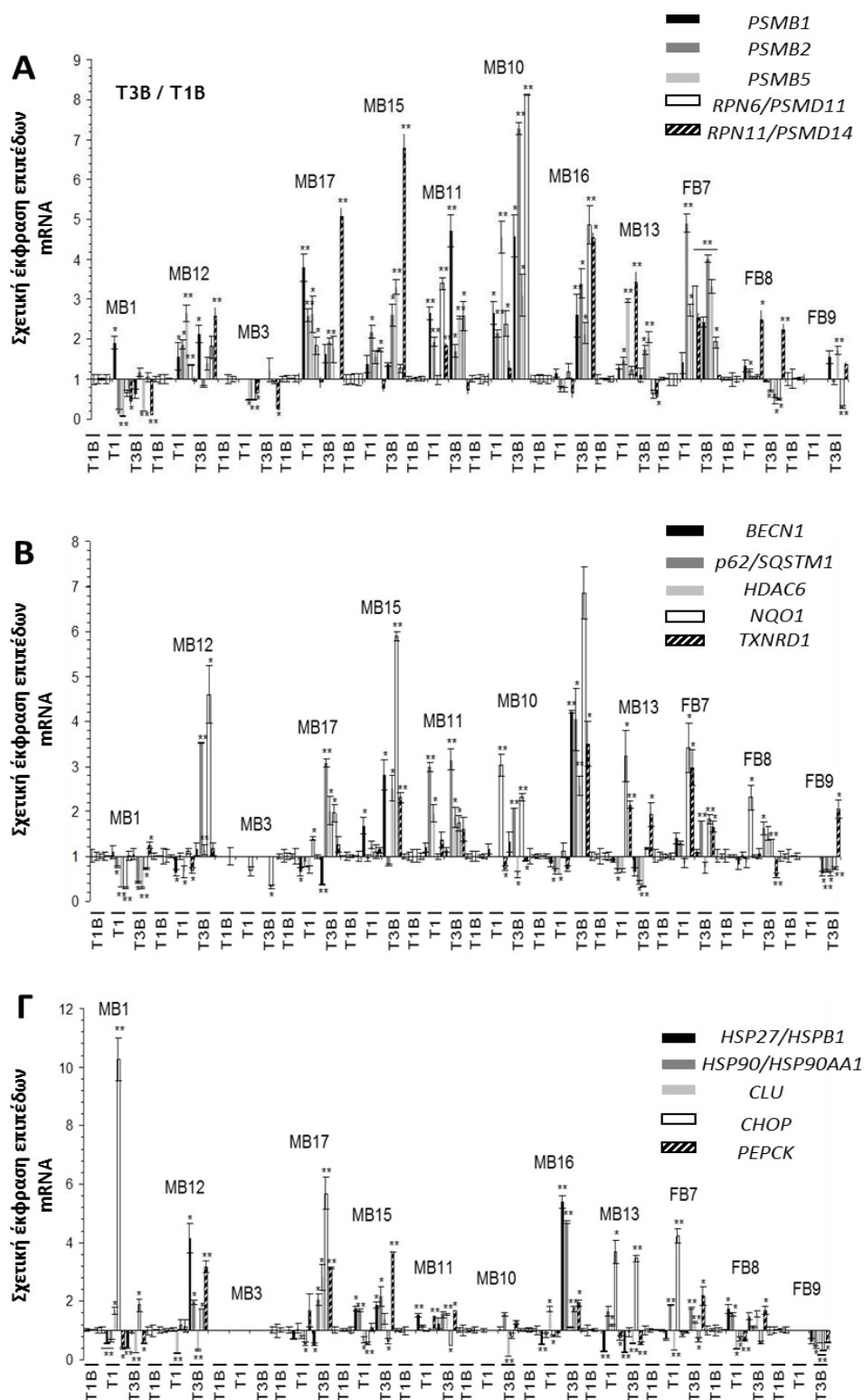
Εν συνέχεια ερευνήθηκε η επίδραση της χορήγησης των πρωτεασωματικών αναστολέων στην έκφραση των πρωτεοστατικών γονιδίων στα ΜΚΠΑ. Όπως φαίνεται στην Εικ. 4.8 (αλλά και στις Εικ. 4.9, 4.10, 4.11, 4.12), η χορήγηση BTZ ή CFZ οδήγησε στους περισσότερους (αλλά και πάλι όχι σε όλους) ασθενείς σε αύξηση της έκφρασης των πρωτεασωματικών γονιδίων (*RPN6*, *RPN11*, *PSMB1*, *PSMB2*, *PSMB5*) υποδεικνύοντας ότι το ρυθμιστικό σύστημα ανατροφοδότησης που λειτουργεί για την αποκατάσταση της φυσιολογικής πρωτεασωματικής λειτουργίας στα έντομα *Drosophila melanogaster* (Tsakiri et al., 2013b) είναι επίσης λειτουργικό και στον άνθρωπο. Επιπρόσθετα, αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης σε ΜΚΠΑ έδειξαν σε αρκετούς ασθενείς αύξηση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην αυτοφαγία και στην απομάκρυνση των συσσωματωμάτων (*BECN1*, *SQSTM1/p62*, *HDAC6*, *CTSL*, *CTSD*), τις αντιοξειδωτικές αποκρίσεις (*NQO1*, *TXNRD1*), το σύστημα απόκρισης σε μη σωστό δίπλωμα πρωτεϊνών (*DDIT3*, επίσης γνωστή ως *CHOP*), το μεταβολικό μονοπάτι (*PCK2*, επίσης γνωστή ως *PEPCK*) καθώς και γονίδια μοριακών συνοδών *HSP27* (επίσης γνωστή ως *HSPB1*), *HSP90* (επίσης γνωστή ως *HSP90AA1*) και *CLU* (Εικ. 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12)



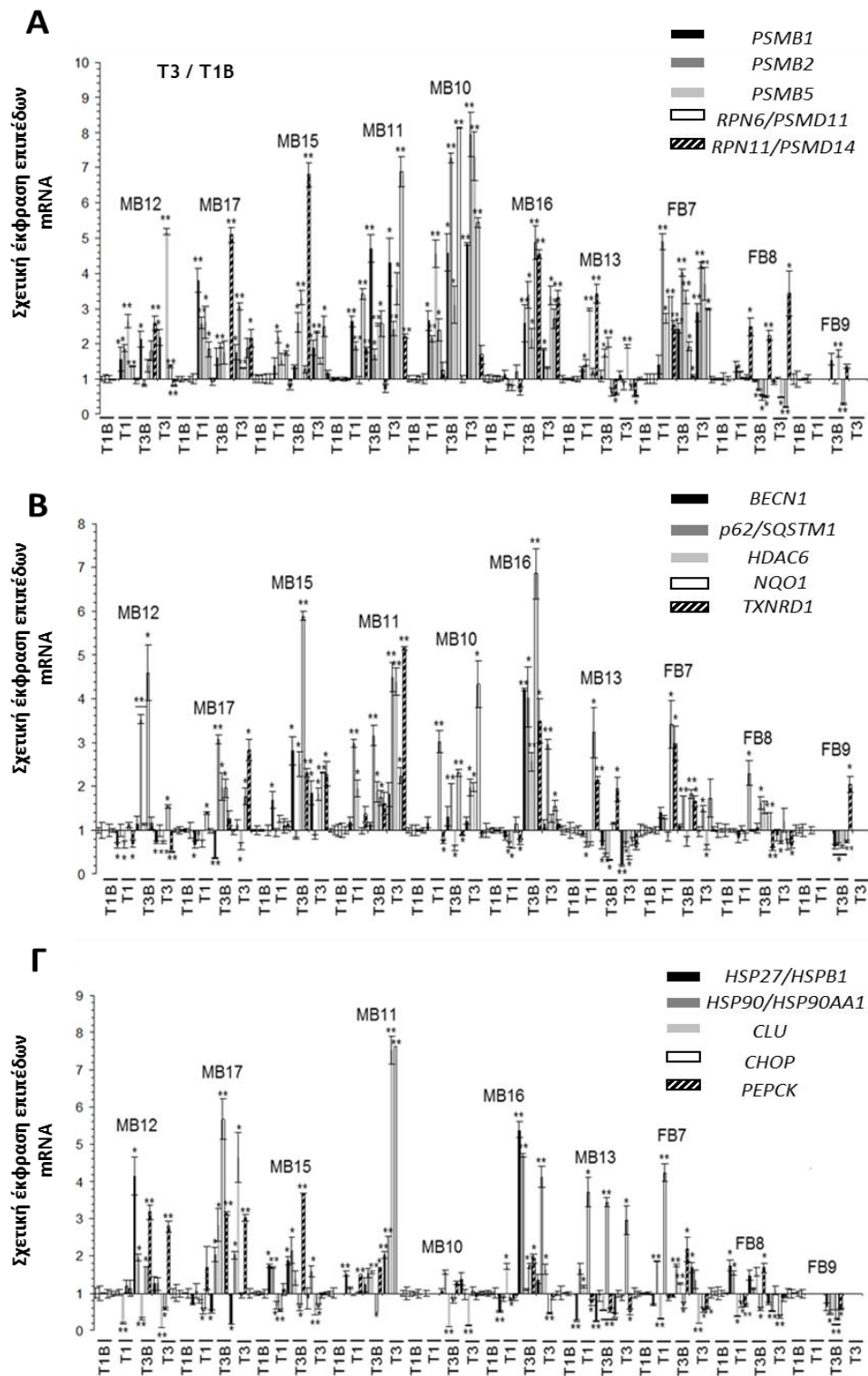
Εικόνα 4.8 Διαφορικές γενωμικές αποκρίσεις σε ΜΚΠΑ ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα 24 ώρες μετά την αγωγή (T1) με BTZ ή CFZ. Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *PSMB1*, *PSMB2*, *PSMB5*, *RPN6*, *RPN11* (πρωτεάσωμα), *BECN1*, *SQSTM1*, *HDAC6* (αυτοφαγία/απομάκρυνση συσσωματωμάτων), *NQO1*, *TXNRD1* (αντιοξειδωτική απόκριση), *HSP27*, *HSP90*, *CLU* (μοριακές συνοδοί) και *PCK2* (μεταβολικό μονοπάτι) σε ΜΚΠΑ που απομονώθηκαν από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα 24 ώρες μετά τη θεραπεία με BTZ ή CFZ (T1, Εικ. 4.3). Παρουσιάζεται επίσης αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα της β5 ή NQO1 πρωτεΐνης σε ΜΚΠΑ στο χρονικό σημείο T1. Το GAPDH και η ACTIN χρησιμοποιήθηκαν ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. MB: Άρρεν ασθενής BTZ; FB: Θήλυ ασθενής BTZ. MC: Άρρεν ασθενής CFZ. FC: Θήλυ ασθενής CFZ. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.



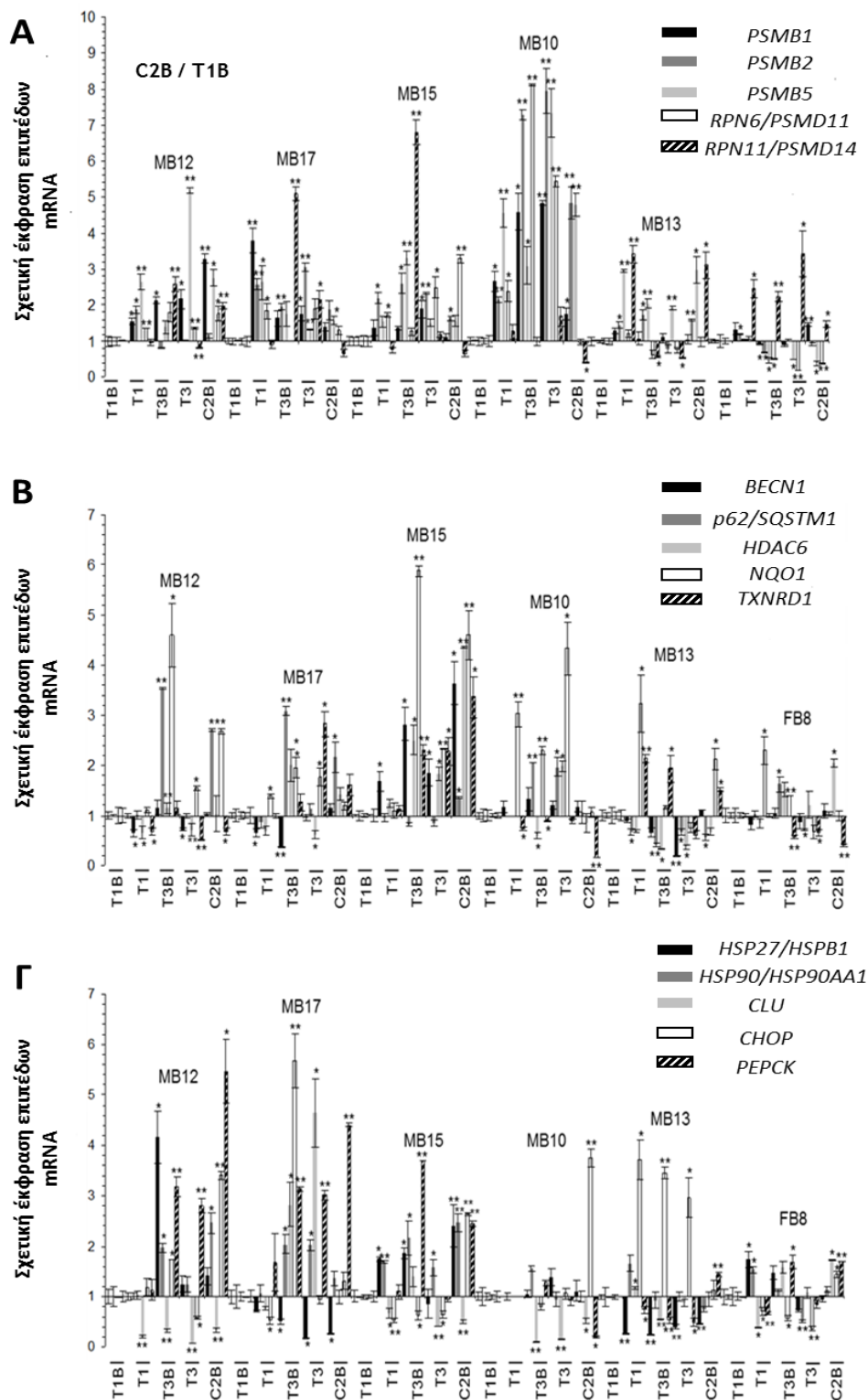
Εικόνα 4.9 Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *CTSL* και *CTSD* σε ΜΚΠΑ 24 ώρες (T1) μετά την αγωγή ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα με BTZ ή CFZ. Η κανονικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης έγινε έναντι των ενδογενών επιπέδων έκφρασης πριν από την έναρξη της θεραπείας (T1B). Το γονίδιο *GAPDH* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. MB: Άρρεν ασθενής BTZ; FB: Θήλυ ασθενής BTZ. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.



Εικόνα 4.10 Διαφορικές γενωμικές αποκρίσεις σε ΜΚΠΑ ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα που έλαβαν θεραπεία με BTZ ή CFZ (χρονικό σημείο T3B έναντι T1B). Η κανονικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης έγινε έναντι των ενδογενών επιπέδων έκφρασης πριν από την έναρξη της θεραπείας (T1B). Το γονίδιο *GAPDH* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.



Εικόνα 4.11 Διαφορικές γενωμικές αποκρίσεις σε ΜΚΠΑ ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα που έλαβαν θεραπεία πρωτεασωμικούς αναστολείς (χρονικό σημείο T3 έναντι T1B). Η κανονικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης έγινε έναντι των ενδογενών επιπέδων έκφρασης πριν από την έναρξη της θεραπείας (T1B). Το γονίδιο *GAPDH* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.



Εικόνα 4.12 Διαφορικές γενωμικές αποκρίσεις σε ΜΚΠΑ ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα που έλαβαν θεραπεία πρωτεασωμικούς αναστολείς (χρονικό σημείο C2B έναντι T1B). Η κανονικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης έγινε έναντι των ενδογενών επιπέδων έκφρασης πριν από την έναρξη της θεραπείας (T1B). Το γονίδιο *GAPDH* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.3 Η ρύθμιση των στοιχείων πρωτεόστασης στα κύτταρα του περιφερικού αίματος έδειξε σημαντικές συσχετίσεις με τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα που έλαβαν Bortezomib ή Carfilzomib

Ακολούθως, μελετήθηκαν πιθανές συσχετίσεις των προαναφερθέντων πρωτεοστατικών στοιχείων (π.χ. πρωτεασωμικές ενεργότητες ή γονιδιακή έκφραση) με την κλινική εικόνα και τη θεραπευτική απόκριση των ασθενών, δηλαδή το βαθμό απόκρισης σύμφωνα με τα κριτήρια IMWG (International Myeloma Working Group). Ειδικότερα αναλύθηκε η ελεύθερη νόσου επιβίωση των ασθενών (PFS) καθώς και η ολική επιβίωση ασθενών (OS) (Πίνακας 4.1). Διαπιστώθηκε ότι οι ενδογενείς ενεργότητες πρωτεασώματος (CT-L, C-L, T-L) σε ΜΚΠΑ συσχετίζονται θετικά μεταξύ τους και με τις ενδογενείς πρωτεασωμικές ενεργότητες σε ΕΚ, υποδεικνύοντας ότι η λειτουργικότητα του πρωτεασώματος πιθανόν να ρυθμίζεται στους ιστούς σε συστημικό επίπεδο. Σε συμφωνία, παρατηρήθηκε επίσης μια θετική συσχέτιση των πρωτεασωμικών ενεργοτήτων σε ΜΚΠΑ και ΕΚ μετά από θεραπεία με πρωτεασωμικούς αναστολείς υποδηλώνοντας πιθανώς κοινές αποκρίσεις στα επίπεδα αιμοποίησης στον μυελό των οστών. Επιπλέον, η έκφραση των γονιδίων *TXNRD1* (αντιοξειδωτική απόκριση), *HSP27* (μοριακή συνοδός) και *HDAC6* (μονοπάτι αυτοφαγίας/απομάκρυνση συσσωματωμάτων) (σε διάφορα χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της θεραπείας) εμφάνισε αρνητική συσχέτιση με το PFS των ασθενών. Επίσης, η έκφραση του γονιδίου *SQSTM1* (μονοπάτι αυτοφαγίας/απομάκρυνση συσσωματωμάτων) εμφάνισε αρνητική συσχέτιση τόσο με το PFS όσο και την ολική επιβίωση των ασθενών. Συμπερασματικά, η αυξημένη γονιδιακή έκφραση των πρωτεοστατικών γονιδίων κατά τη διάρκεια του κύκλου θεραπείας των ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα πιθανώς συσχετίζεται με λιγότερο ευνοϊκά αποτελέσματα μετά τη χορήγηση πρωτεασωμικών αναστολέων.

Πίνακας 4.1. Οι παράμετροι που έδειξαν σημαντική συσχέτιση με τα κριτήρια που σχετίζονται με το IMWG για την απόκριση στη θεραπεία, το PFS και OS χρησιμοποιώντας τόσο το συντελεστή συσχέτισης Pearson (παραμετρικές τιμές) όσο και το Spearman (μη παραμετρικές)

Pearson									
	T-L_BASAL_RBCs	HSP27_1	HDAC6_3	TXNRD1_3	RPN11_C2B	SQSTM1_C2B	NQO1_C2B	IMWG	PFS
IMWG								-0.83*	
PFS	-0.47*	-0.519*	-0.707*	-0.761*	0.989**	-0.917*		-0.801**	
OS						-0.882*		-0.695**	0.767**
Spearman's									
	T-L_BASAL_RBCs	HSP27_1	HDAC6_3	TXNRD1_3	RPN11_C2B	SQSTM1_C2B	NQO1_C2B	IMWG	PFS
IMWG								-0.828*	
PFS	-0.448*	-0.527*	-0.745*	-0.848**	0.949**	-0.959*		-0.815**	
OS						-0.891*		-0.64**	0.767**

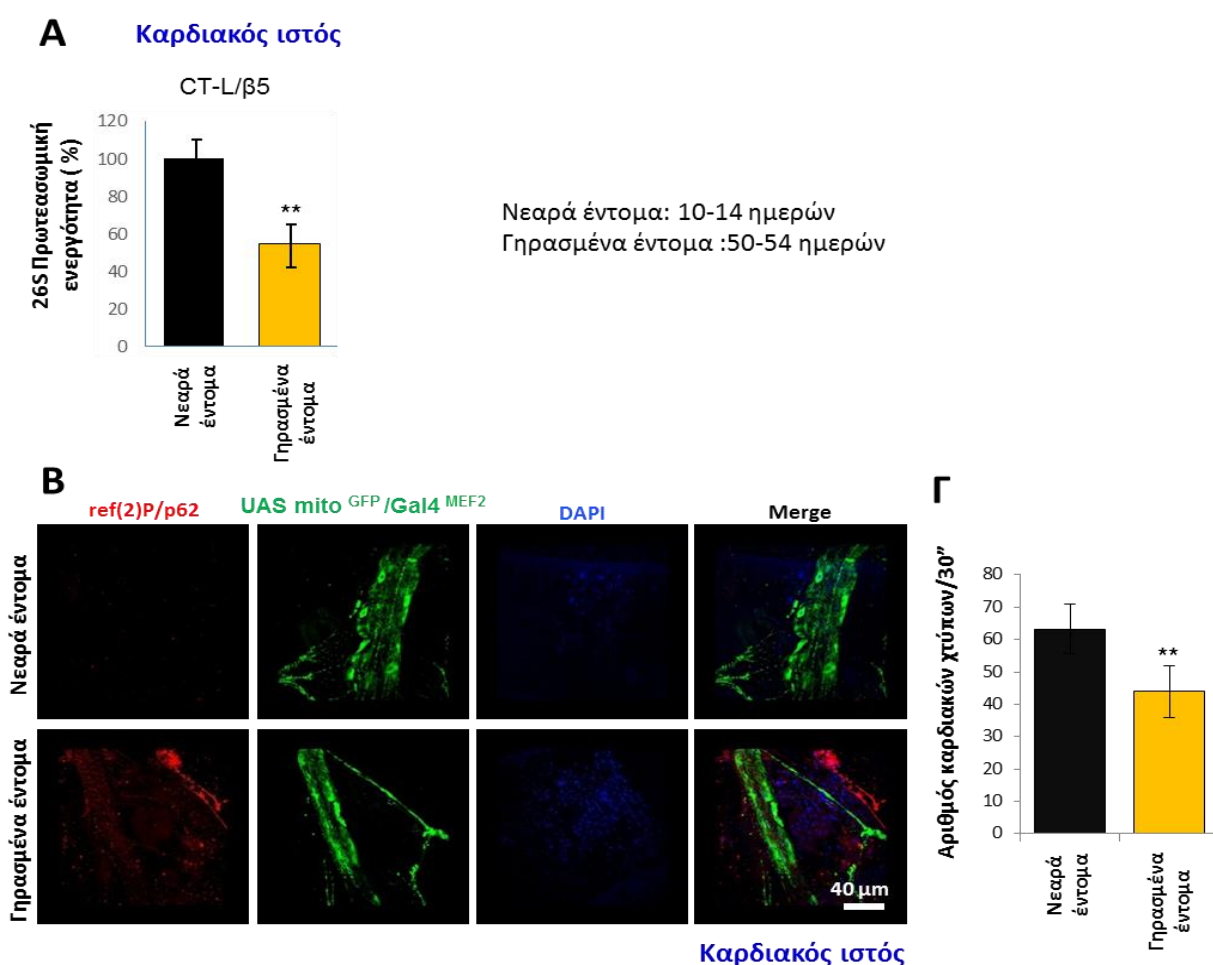
T-L_BASAL_RBCs, Βασική ενεργότητα θρυψίνης σε ερυθροκύτταρα πριν από τη χορήγηση των πρωτεασωμικών αναστολέων; *HSP27_1*, έκφραση γονιδίου στο T1; *HDAC6_3*, γονιδιακή έκφραση στο T3; *TXNRD1_3*, έκφραση γονιδίου στο T3; *RPN11_C2B*, έκφραση γονιδίου στο C2B; *SQSTM1_C2B*, γονιδιακή έκφραση στο C2B; *NQO1_C2B*, έκφραση γονιδίου στο C2B; IMWG, κριτήρια απόκρισης σε θεραπεία σύμφωνα με το International Myeloma Working Group; PFS (progression free survival), ελεύθερη νόσου επιβίωση των ασθενών; OS (overall survival) ολική επιβίωση. * P <0,05; ** P <0,01.

4.4 Η γήρανση οδήγησε σε πρωτεωμική αστάθεια με μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στον καρδιακό ιστό εντόμων *Drosophila melanogaster* και καρδιακή δυσλειτουργία

Όπως ήδη έχει αναφερθεί η καρδιοτοξικότητα φαίνεται να αποτελεί σημαντική παρενέργεια των θεραπευτικών πρωτεασωμικών αναστολέων σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα. Δεδομένου επίσης ότι η αύξηση της ηλικίας οδηγεί σε μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας (Tsakiri and Trougakos, 2015) και σε συνδυασμό με τις παρατηρήσεις μας σε κύτταρα περιφερικού αίματος (Papanaghou et al., 2018), προχωρήσαμε στη μελέτη της ρύθμισης του πρωτεασώματος στον καρδιακό ιστό κατά τη γήρανση.

Ως οργανισμός-μοντέλο χρησιμοποιήθηκε το δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster* διότι η καρδιά της διαθέτει σημαντικές ομοιότητες με την αντίστοιχη των θηλαστικών (υποκεφάλαια 2.3.2.1-2.3.2.14). Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της ηλικίας οδήγησε σε μείωση της κύριας πρωτεασωμικής ενεργότητας CT-L στον καρδιακό ιστό των εντόμων (Εικ. 4.13A). Αυτή η ελάττωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας προκάλεσε

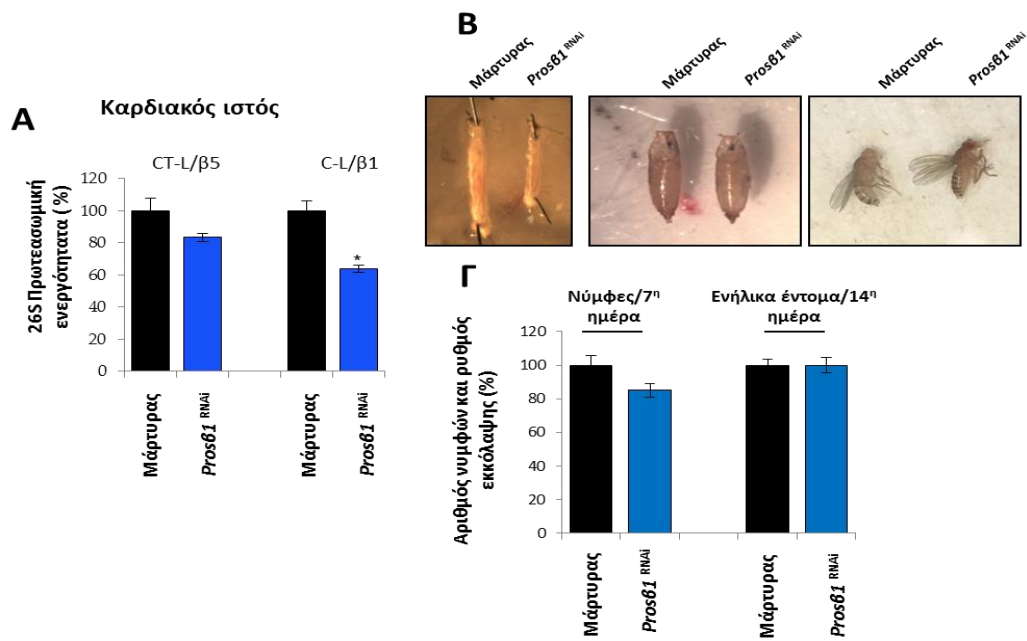
πρωτεοτοξικό στρες στον καρδιακό ιστό όπως αναμενόταν, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από την αύξηση της έκφρασης του δείκτη πρωτεωμικής αστάθειας, ref(2)P (ορθόλογος της πρωτεΐνης p62 στον άνθρωπο), στην καρδιά των γηρασμένων εντόμων (Εικ. 4.13B). Η αυξημένη πρωτεωμική αστάθεια που προκλήθηκε από τη μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στον καρδιακό ιστό οδήγησε επίσης και σε καρδιακή δυσλειτουργία, μειώνοντας τον αριθμό των καρδιακών χτύπων στα γηρασμένα έντομα (ηλικία 50-54 ημερών) εν συγκρίσει με τα νεαρά (10-14 ημερών) (Εικ. 4.13Γ). Παρά την πρωτεασωμική δυσλειτουργία που προκλήθηκε κατά τη γήρανση ο αριθμός και η μορφολογία των μιτοχονδρίων δεν φαίνεται να επηρεάζεται.



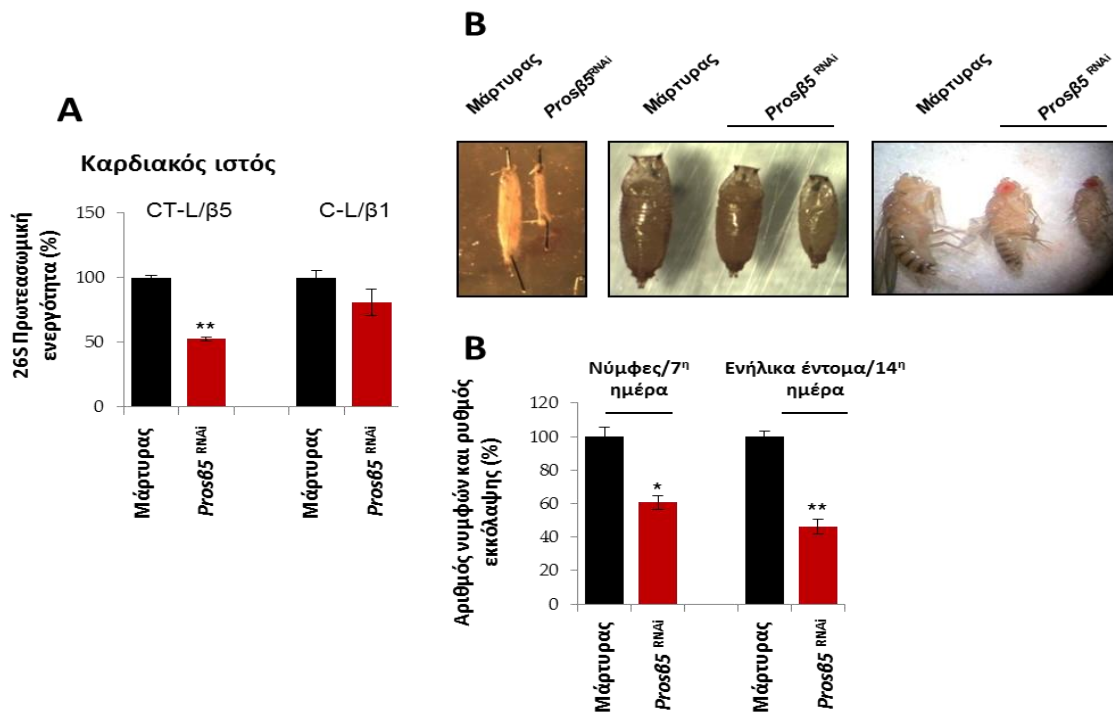
Εικόνα 4.13 Πρωτεασωμική δυσλειτουργία και πρωτεωμική αστάθεια κατά τη γήρανση στον καρδιακό ιστό. (Α) Μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας CT-L στον καρδιακό ιστό γηρασμένων εντόμων. (Β) Αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του δείκτη πρωτεωμικής αστάθειας ref(2)P στο γηρασμένο καρδιακό ιστό. (Γ) Μείωση του καρδιακού χτύπου κατά τη γήρανση. Μπάρες σφαλμάτος: $\pm$ SD. ** $P < 0,01$.

4.5 Η στοχευμένη καταστολή της έκφρασης των υπομονάδων β1 και β5 του 20S πρωτεασώματος στον καρδιακό ιστό, οδήγησε σε μείωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος προκαλώντας διαταραχές στην ανάπτυξη

Δεδομένων των ευρημάτων πρωτεωμικής αστάθειας και πρωτεασωμικής δυσλειτουργίας στην καρδιά γηρασμένων εντόμων (αλλά και στην κλινική έπειτα από θεραπεία με πρωτεασωμικούς αναστολείς–βλέπε παραπάνω) πραγματοποιήθηκε RNAi-διαμεσολαβούμενη αποσιώπηση των κύριων πρωτεασωμικών υπομονάδων β1 (ενεργότητα κασπάσης) και β5 (ενεργότητα χυμοθρυψίνης) στον καρδιακό ιστό εντόμων *Drosophila*. Διαπιστώθηκε ότι η αποσιώπηση των δύο αυτών πρωτεασωμικών υπομονάδων στην καρδιά από το εμβρυικό κιόλας στάδιο με τη χρήση του στελέχους Gal4^{TinC}, οδήγησε σε μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας και στα δύο στελέχη (Εικ. 4.14Α, 4.15Α). Ακόμη, παρουσιάσθηκε διαταραχή της ανάπτυξης των εντόμων κυρίως στο στέλεχος UAS *Prosβ5*^{RNAi}/Gal4^{TinC} (η β5 είναι κύρια καταλυτική υπομονάδα), με τα έντομα να εμφανίζουν εμφανώς μικρότερο σώμα σε σχέση με τα έντομα μάρτυρες (Εικ. 4.14Β, 4.15Β). Η μείωση του μεγέθους του σώματος πιθανώς συνδέεται με τη δυσλειτουργία του κυκλοφορικού συστήματος του εντόμου ήδη από την εμβρυϊκή ηλικία. Η δυσλειτουργία του συστήματος αυτού έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη κυκλοφορία της αιμολέμφου, υγρού που παρέχει θρεπτικά στοιχεία, σηματοδοτικά πεπτίδια και διάφορους τύπους μεταβολιτών και ορμονών στο υπόλοιπο σώμα. Επιπλέον, το πρωτεάσωμα συμμετέχει στην ανακύκλωση πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο (Adams, 2004). Συνεπώς, η αποσιώπηση πρωτεασωμικών υπομονάδων στον καρδιακό ιστό δεν επιτρέπει πέρα από τη σωστή λειτουργία και τη σωστή ανάπτυξή του οργάνου, επιδρώντας κατά αυτόν τον τρόπο σε συστημικό επίπεδο (μείωση μεγέθους σώματος). Τέλος η αποσιώπηση των πρωτεασωμικών υπομονάδων στον καρδιακό ιστό οδήγησε σε μειωμένο (σε σχέση με τα έντομα μάρτυρες) αριθμό νυμφών (κυρίως μετά την αποσιώπηση της β5 υπομονάδας) και εκκολαφθέντων ενήλικων εντόμων (παρατηρήθηκε μόνο μετά την αποσιώπηση της β5 υπομονάδας) (Εικ. 4.14Γ, 4.15Γ).



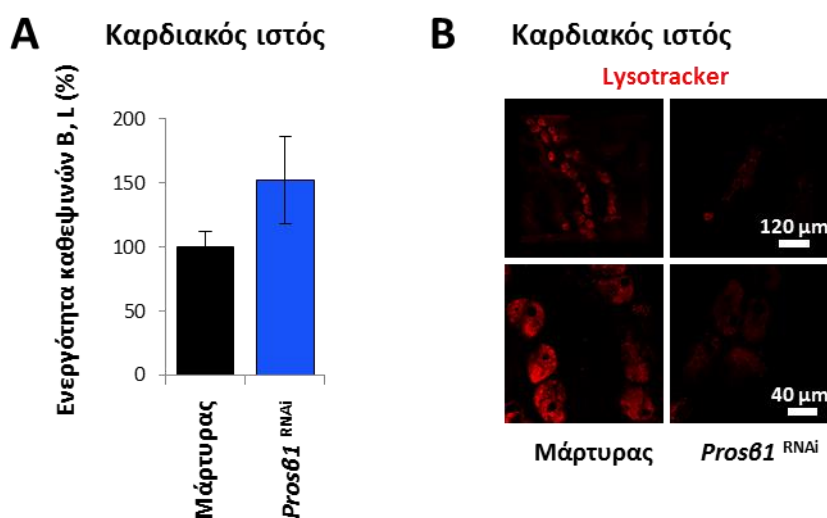
Εικόνα 4.14 Η αποσιώπηση της β1 υπομονάδας στον καρδιακό ιστό προκαλεί διαταραχές στην ανάπτυξη των εντόμων. (Α) Μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στον καρδιακό ιστό έπειτα από αποσιώπηση της β1 υπομονάδας. (Β) Διαταραχή της ανάπτυξης του εντόμου στο στάδιο της προνύμφης. (Γ) Ήπια μείωση του αριθμού των νυμφών. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$.



Εικόνα 4.15 Η αποσιώπηση της β5 υπομονάδας στον καρδιακό ιστό προκαλεί διαταραχές στην ανάπτυξη των εντόμων. (Α) Μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στον καρδιακό ιστό έπειτα από αποσιώπηση της β5 υπομονάδας. (Β) Διαταραχή της ανάπτυξης του εντόμου σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής των εντόμων. (Γ) Μείωση του αριθμού των νυμφών και του ρυθμού εκκόλαψης. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.6 Η μειορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των υπομονάδων β1 και β5, μέσω RNAi στον καρδιακό ιστό, επέδρασε στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος

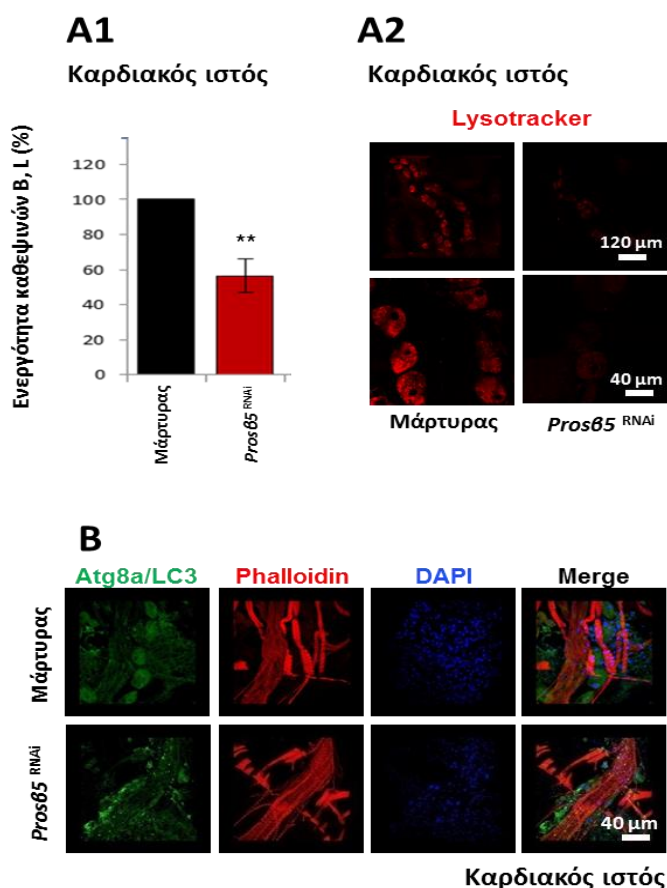
Αφού διαπιστώθηκε η μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στον καρδιακό ιστό στη συνέχεια διερευνήθηκε η επίδραση της στοχευμένης καταστολής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων στον καρδιακό ιστό, στο δεύτερο κύριο πρωτεολυτικό μονοπάτι του κυττάρου, δηλαδή το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος. Βρέθηκε πως η αποσιώπηση της β1 και β5 υπομονάδας στον καρδιακό ιστό οδήγησε σε μείωση του αριθμού των λυσosωμάτων (Εικ. 4.16B, 4.17A2), ενώ επέδρασε με διαφορετικό τρόπο στην ενεργότητα καθεψινών B και L. Συγκεκριμένα, η ενεργότητα των καθεψινών στον καρδιακό ιστό μειώθηκε μετά την αποσιώπηση της β5 υπομονάδας (Εικ. 4.17A1), ενώ παρουσίασε τάση για αύξηση έπειτα από αποσιώπηση της β1 (Εικ. 4.16A). Η διαφορετική επίδραση της μειορρύθμισης των δύο αυτών υπομονάδων στο μονοπάτι της αυτοφαγίας πιθανώς οφείλεται στη διαφορετική ένταση τοξικότητας που επιφέρει η καταστολή τους.



Εικόνα 4.16 Η επίδραση της αποσιώπησης της β1 υπομονάδας στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος. (A) (%) Σχετική ενεργότητα καθεψινών B, L σε καρδιακό ιστό νεαρών εντόμων έπειτα από αποσιώπηση της β1 υπομονάδας. (B) Μείωση του αριθμού των λυσosωμάτων στον καρδιακό ιστό εντόμων UAS *Prosβ1*^{RNAi}/Gal4^{TinC}.

Η μελέτη του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος έπειτα από καταστολή της β5 πρωτεασωμικής υπομονάδας στον καρδιακό ιστό έδειξε επίσης αύξηση της έκφρασης της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a/LC3 στον καρδιακό σωλήνα (Εικ. 4.16B). Στη *Drosophila* η

πρωτεΐνη Atg8a αλληλεπιδρά με ένα σύνολο αυτοφαγικών πρωτεϊνών όπως έχει ήδη αναφερθεί οδηγώντας στην έναρξη της αυτοφαγικής διαδικασίας. Με αυτόν τον τρόπο πιθανώς το δίκτυο πρωτόστασης προσπαθεί να εξισορροπήσει την πρωτεωμική αστάθεια που προκλήθηκε από τη δυσλειτουργία του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Papanaghou et al., 2018).

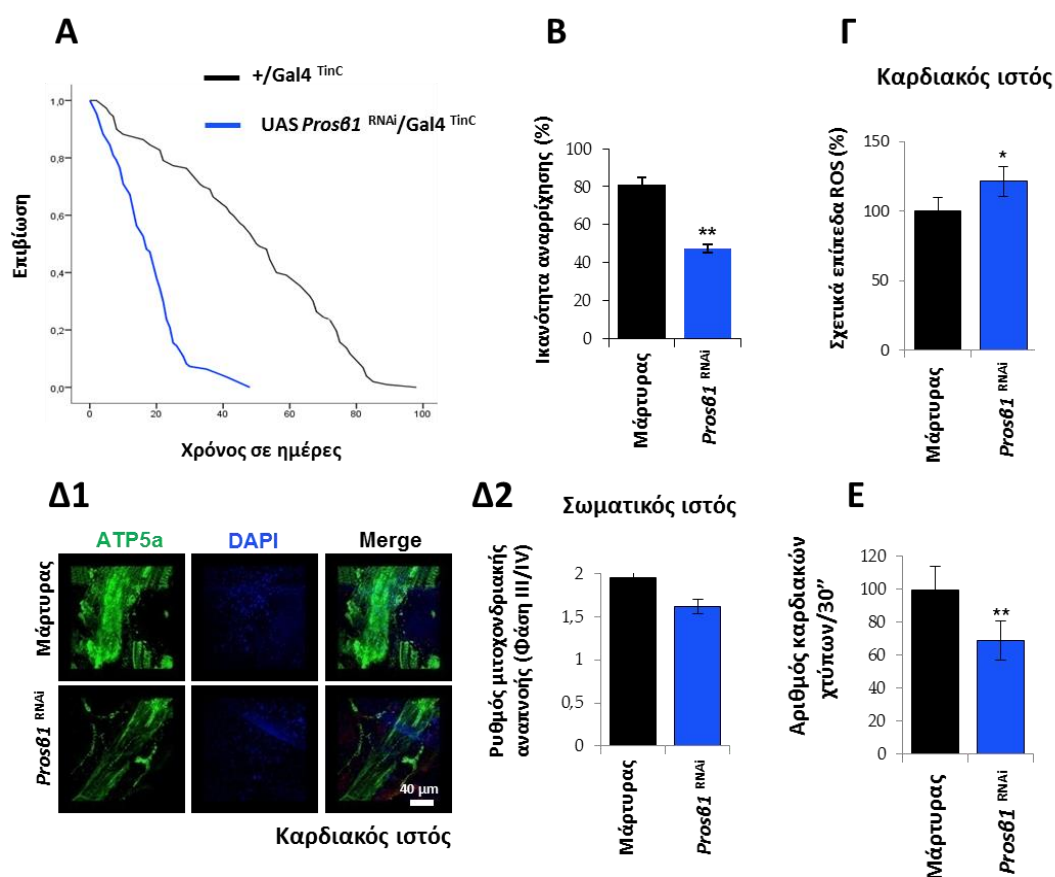


Εικόνα 4.17 Η επίδραση της αποσιώπησης της β5 υπομονάδας στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος. (A1) (%) Σχετική ενεργότητα καθεψινών B, L σε καρδιακό ιστό νεαρών εντόμων έπειτα από αποσιώπηση της β5 υπομονάδας. (A2) Μείωση του αριθμού των λυσοσωμάτων στον καρδιακό ιστό εντόμων UAS *Pros65*^{RNAi}/Gal4^{TinC}. (B) Αύξηση της έκφρασης της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a στον καρδιακό ιστό εντόμων *Drosophila melanogaster*. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. **P < 0,01.

4.7 Η στοχευμένη καταστολή της γονιδιακής έκφρασης των υπομονάδων β1 και β5, στον καρδιακό ιστό, προκάλεσε μιτοχονδριακή και καρδιακή δυσλειτουργία, μειώνοντας το προσδόκιμο ζωής των εντόμων

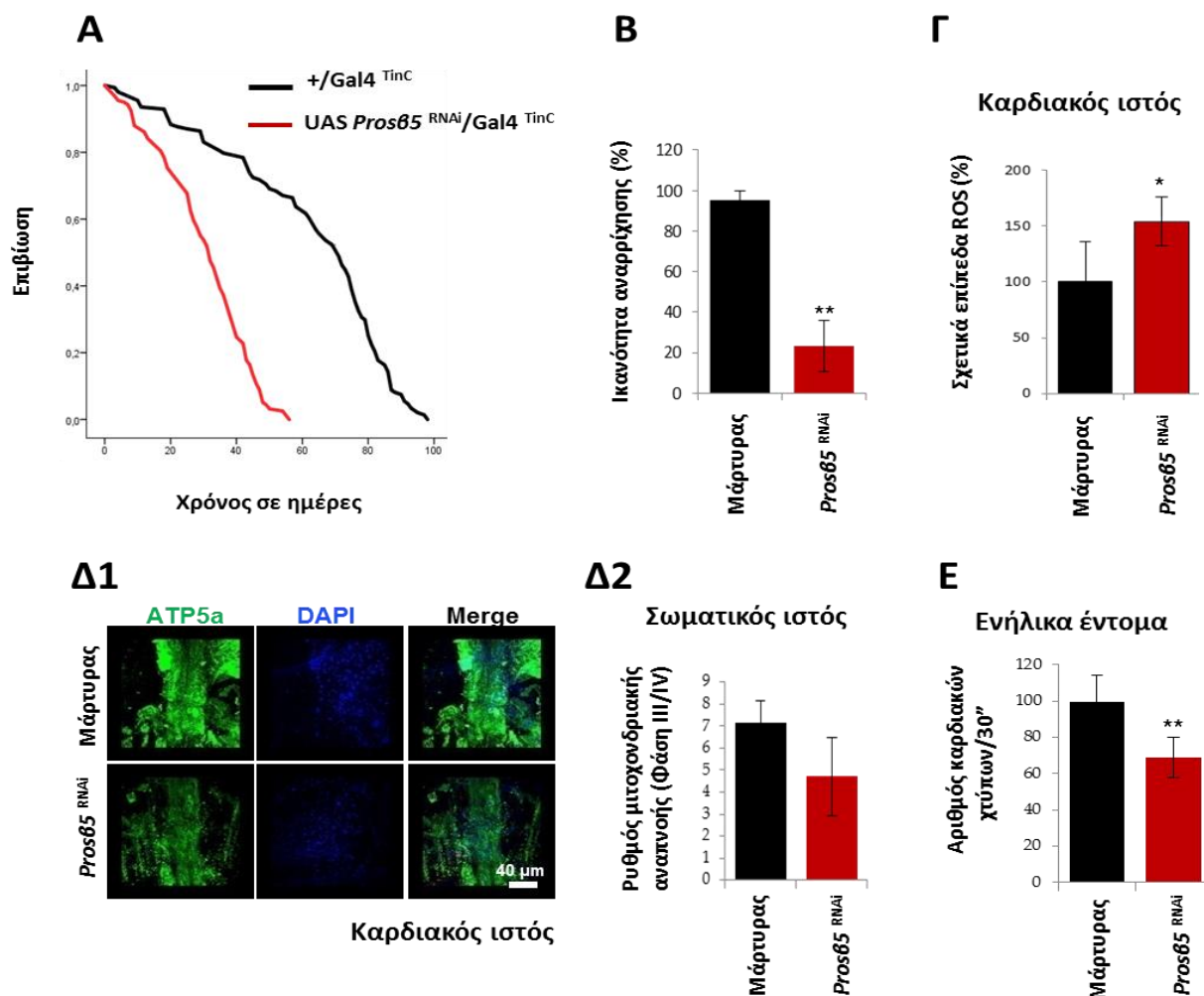
Η συνέχεια των μελετών μας αποκάλυψε ότι η καταστολή των πρωτεασωμικών υπομονάδων στην καρδιά των εντόμων οδήγησε σε μείωση του προσδόκιμου ζωής και της

κινητικής τους ικανότητας (Εικ. 4.18Α, 4.18Β, 4.19Α, 4.19Β). Ταυτόχρονα τα UAS *Pros65*^{RNAi}/Gal4^{TinC} και UAS *Pros61*^{RNAi}/Gal4^{TinC} έντομα εμφάνισαν δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, με αύξηση του αριθμού των επιπέδων ROS στον καρδιακό ιστό (Εικ. 4.18Γ, 4.19Γ), μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων καθώς και της αναπνευστικής μιτοχονδριακής ικανότητας (Εικ. 4.18Δ, 4.19Δ) εν συγκρίσει με τα έντομα μάρτυρες. Δεδομένης της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας (ο καρδιακός ιστός είναι πλούσιος σε μιτοχόνδρια) αλλά και των παρενεργειών που προκαλεί η μερική αναστολή του πρωτεασώματος στην καρδιά ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα προχωρήσαμε και σε έλεγχο της καρδιακής λειτουργίας των εντόμων με κατεσταλμένη έκφραση πρωτεασωμικών υπομονάδων. Διαπιστώθηκε πως η μιτοχονδριακή και πρωτεασωμική δυσλειτουργία προκαλεί καρδιακή δυσλειτουργία με μείωση του αριθμού των καρδιακών χτύπων (Εικ. 4.18Ε, 4.19Ε).



Εικόνα 4.18 Η επίδραση της αποσιώπησης της β1 υπομονάδας στο προσδόκιμο ζωής, τη μιτοχονδριακή και καρδιακή λειτουργία των εντόμων. (Α) Καμπύλες μακροβιότητας εντόμων με μειωμένη έκφραση β1 στον καρδιακό ιστό. (Β) Μείωση της αναρριχητικής ικανότητας των εντόμων UAS *Pros61*^{RNAi}/Gal4^{TinC}. (Γ) (%) Σχετικά επίπεδα ROS εντόμων με κατεσταλμένη έκφραση β1 στον καρδιακό ιστό. (Δ1-Δ2) Μείωση αριθμού μιτοχονδρίων και δυσλειτουργία που προκλήθηκε από τη

μειωμένη έκφραση β1 στον καρδιακό ιστό. (Ε) Καρδιακή δυσλειτουργία με μείωση του αριθμού καρδιακών χτύπων έπειτα από στοχευμένη αποσιώπηση της β1 πρωτεασωμικής υπομονάδας στον καρδιακό ιστό. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

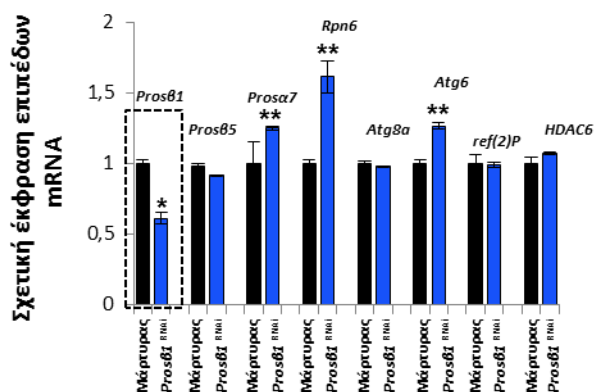


Εικόνα 4.19 Η επίδραση της αποσιώπησης της β5 υπομονάδας στο προσδόκιμο ζωής, τη μιτοχονδριακή και καρδιακή λειτουργία των εντόμων. (Α) Καμπύλες μακροβιότητας εντόμων με μειωμένη έκφραση β5 στον καρδιακό ιστό. (Β) Μείωση της αναρριχητικής ικανότητας των εντόμων UAS *Pros65*^{RNAi}/Gal4^{TinC}. (Γ) (%) Σχετικά επίπεδα ROS εντόμων με κατεσταλμένη έκφραση β5 στον καρδιακό ιστό. (Δ1-Δ2) Μείωση αριθμού μιτοχονδρίων και δυσλειτουργία που προκλήθηκε από τη μειωμένη έκφραση β5 στον καρδιακό ιστό. (Ε) Καρδιακή δυσλειτουργία με μείωση του αριθμού καρδιακών χτύπων έπειτα από στοχευμένη αποσιώπηση της β5 πρωτεασωμικής υπομονάδας στην καρδιά των εντόμων. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.8 Η γονιδιακή έκφραση και τα επίπεδα ουβικιτινωμένων/οξειδωμένων πρωτεϊνών των εντόμων με μειωμένη γονιδιακή έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων β1, β5 στον καρδιακό ιστό

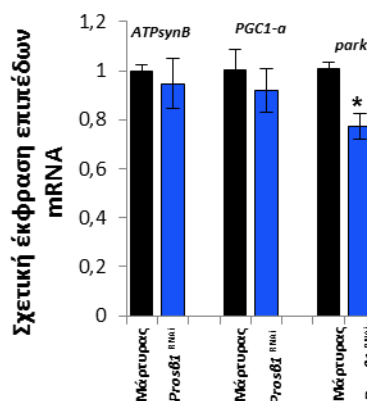
Ακολούθως μελετήθηκε η γονιδιακή έκφραση των υπόλοιπων μονάδων του δικτύου πρωτεόστασης στον καρδιακό ιστό. Βρέθηκε πως η μειωμένη έκφραση των υπομονάδων β1 και β5 οδήγησε σε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των υπολοίπων πρωτεασωμικών γονιδίων και του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα CncC/NRF2, γεγονός που υποδεικνύει τη συμμετοχή αυτού του μεταγραφικού παράγοντα στην επαγωγή της έκφρασης των προαναφερθέντων γονιδίων (Tsakiri et al., 2013b) με στόχο την ελάττωση της πρωτεωμικής αστάθειας (Εικ. 4.20A, 4.21A). Διαπιστώθηκε επίσης διαφορική έκφραση των αυτοφαγικών γονιδίων μεταξύ των $UAS\ Pros\beta5^{RNAi}/Gal4^{TinC}$ και $UAS\ Pros\beta1^{RNAi}/Gal4^{TinC}$ εντόμων καθώς και μείωση της έκφρασης μιτοχονδριακών γονιδίων, όπως του γονιδίου του *PGC1-α*, το οποίο σχετίζεται με τη βιογένεση των μιτοχονδρίων (Εικ. 4.20A, 4.21A). Σε επόμενη φάση και βασιζόμενοι σε δεδομένα ερευνών που υποδεικνύουν ότι η αύξηση των επιπέδων των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών στον καρδιακό ιστό οδηγεί σε καρδιακή διαταραχή (διεσταλμένη καρδιομυοπάθεια) (Weekes et al., 2003) πραγματοποιήθηκε έλεγχος των ουβικιτινωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών στον καρδιακό ιστό. Βρέθηκε ότι η καταστολή της έκφρασης και των δύο πρωτεασωμικών υπομονάδων β1 και β5 στον καρδιακό ιστό οδηγεί σε συσσώρευση ουβικιτινωμένων και καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών σε σύγκριση με τα έντομα μάρτυρες (Εικ. 4.20B, 4.21B).

A1 Καρδιακός ιστός

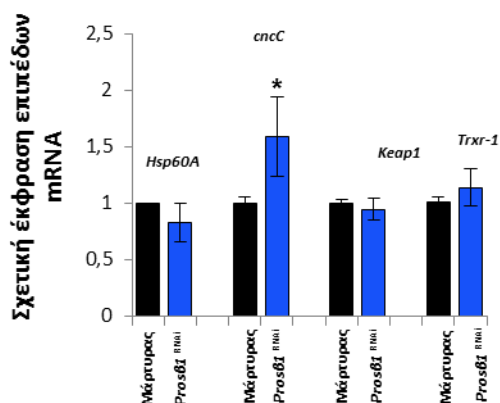


Εικόνα

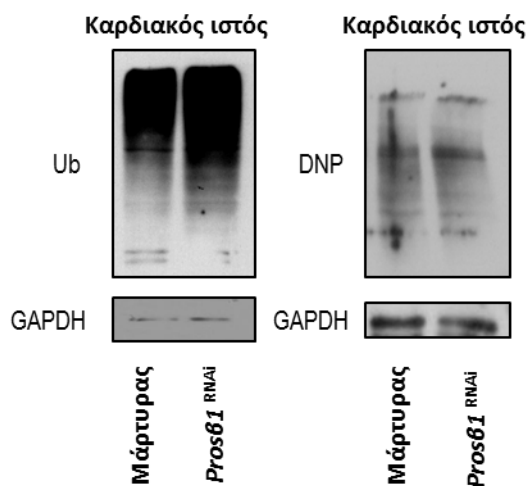
A2 Καρδιακός ιστός



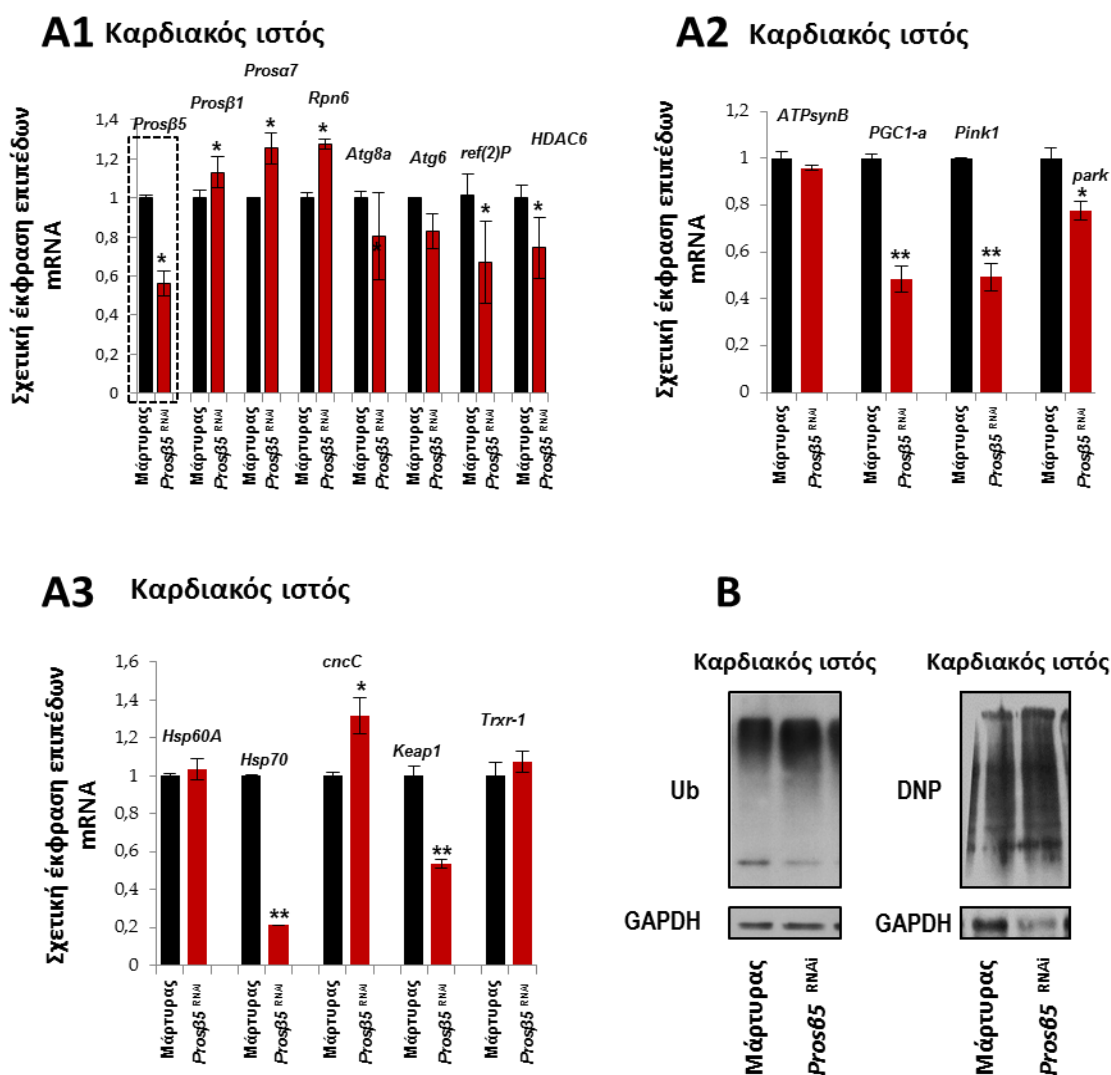
A3 Καρδιακός ιστός



B



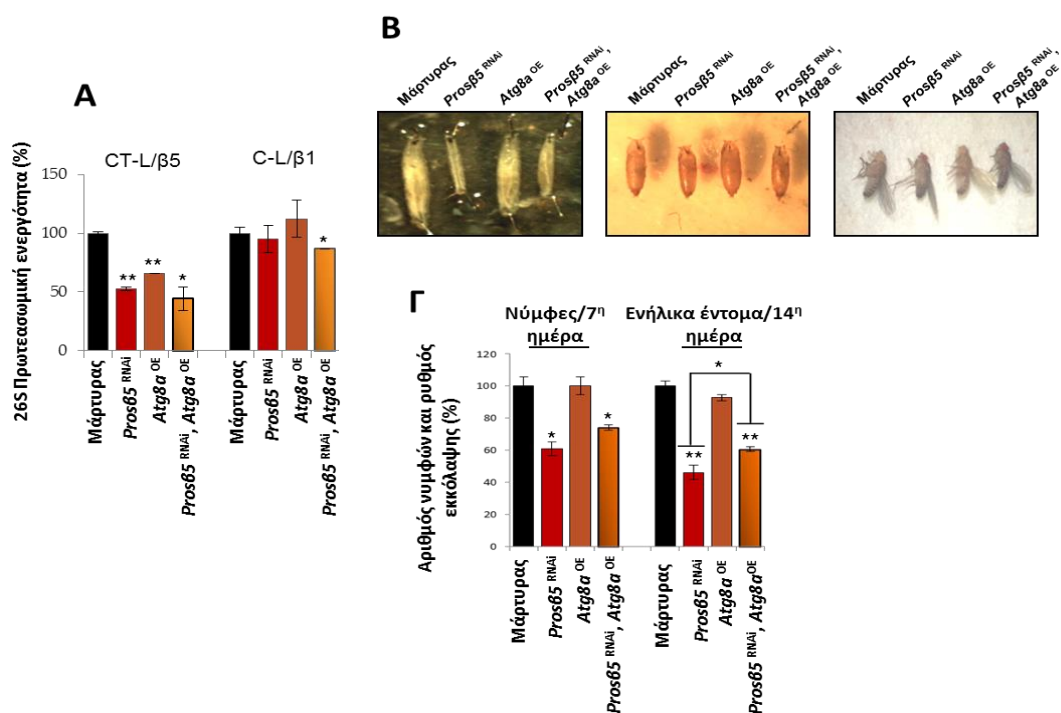
4.20 Η γονιδιακή έκφραση των κύριων ρυθμιστών του δικτύου πρωτεόστασης και τα επίπεδα ουβικιτινωμένων/καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών έπειτα από αποσιώπηση της β1 υπομονάδας στον καρδιακό ιστό. (A1-A3) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των πρωτεοστατικών γονιδίων μετά από αποσιώπηση της β1 υπομονάδας στον καρδιακό ιστό. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς (B) Αντιπροσωπευτικό ανοσοσύτρωμα ουβικιτινωμένων (Ub) ή καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών (DNP) έπειτα από μειορρύθμιση της β1 υπομονάδας στον καρδιακό ιστό. Το GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.



Εικόνα 4.21 Η γονιδιακή έκφραση των κύριων ρυθμιστών του δικτύου πρωτεόστασης και τα επίπεδα ουβικιτινωμένων/καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών έπειτα από αποσιώπηση της β5 υπομονάδας στον καρδιακό ιστό. (A1-A3) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των πρωτεοστατικών γονιδίων μετά από αποσιώπηση της β5 υπομονάδας στον καρδιακό ιστό. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς (B) Αντιπροσωπευτικό ανοσοσύτρωμα ουβικιτινωμένων (Ub) ή καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών (DNP) έπειτα από μειορρύθμιση της β5 υπομονάδας στον καρδιακό ιστό. Το GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.9 Η υπερέκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a/LC3 σε υπόβαθρο *Pros65*^{RNAi} στοχευμένα στον καρδιακό ιστό βελτίωσε την ανάπτυξη και τον ρυθμό εκκόλαψης των εντόμων

Όπως προαναφέρθηκε η χορήγηση πρωτεασωμικών αναστολέων έδειξε πως στα ΜΚΠΑ αυξήθηκε η έκφραση των βασικών ρυθμιστών της αυτοφαγίας (Εικ. 4.8B, 4.9B). Σε συμφωνία, η καταστολή της β5 υπομονάδας στον καρδιακό ιστό προκάλεσε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της πρωτεΐνης Atg8a (Εικ. 4.17). Υποθέσαμε πως η αύξηση αυτή οφείλεται σε ένα λειτουργικό δίκτυο ανάδρασης που στοχεύει στη μείωση της πρωτεωμικής αστάθειας και την αποκατάσταση της πρωτεόστασης/μιτόστασης. Για το λόγο αυτό προχωρήσαμε σε υπερέκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a σε υπόβαθρο *Pros65*^{RNAi} στον καρδιακό ιστό. Στόχος μας ήταν να καταστήσουμε τον έντονο φαινότυπο της καρδιοτοξικότητας λόγω μειωμένης πρωτεασωμικής ενεργότητας, πιο ήπιο. Παρατηρήθηκε, ότι παρόλο που τα διπλά γονιδιακά έντομα εμφάνισαν εξίσου χαμηλή πρωτεασωμική ενεργότητα (Εικ. 4.22A), η ανάπτυξη των εντόμων βελτιώθηκε (Εικ. 4.22B). Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των νυμφών και των εκκολαφθέντων ενήλικων εντόμων σε σχέση με τα UAS *Pros65*^{RNAi}/Gal4^{TinC} έντομα (Εικ. 4.22Γ). Συμπερασματικά, η βελτίωση της ανάπτυξης των εντόμων πιθανότατα σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος (βλέπε παρακάτω).

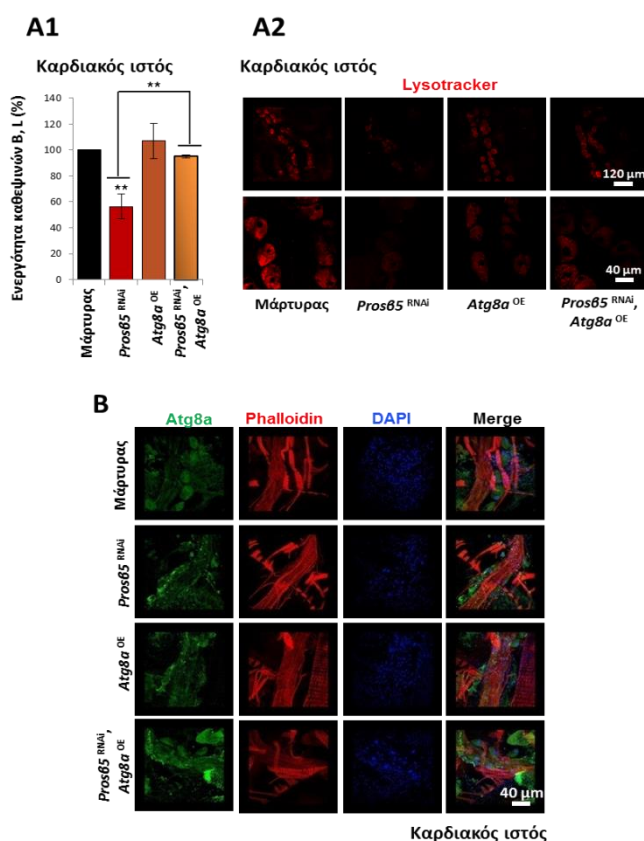


Εικόνα 4.22 Η αύξηση της έκφρασης της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a (*Atg8a*^{OE}) σε υπόβαθρο *Pros65*^{RNAi} στον καρδιακό ιστό (A) (%) 26S πρωτεασωμική ενεργότητα στον καρδιακό

ιστό. (B) Τα διπλά διαγονιδικά έντομα εμφάνισαν βελτιωμένη ανάπτυξη, (Γ) αριθμό νυμφών και ρυθμό εκκόλαψης σε σχέση με τα *Pros65^{RNAi}* έντομα στον καρδιακό ιστό. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.10 Η υπερέκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a σε υπόβαθρο *Pros65^{RNAi}* αύξησε την ενεργότητα των λυσοσωμικών καθεψινών, αυξάνοντας το συνολικό αριθμό των λυσοσωμάτων στον καρδιακό ιστό

Δεδομένης της βελτίωσης λόγω υπερέκφρασης της Atg8a πρωτεΐνης στον καρδιακό ιστό, της ανάπτυξης αλλά και του ρυθμού εκκόλαψης των εντόμων, στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση αυτής της γενετικής παρέμβασης στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος. Διαπιστώθηκε αύξηση της ενεργότητας των καθεψινών B και L, του αριθμού των λυσοσωμάτων καθώς και της πρωτεϊνικής έκφρασης της Atg8a στον καρδιακό ιστό των διπλών διαγονιδικών εντόμων εν συγκρίσει με τα έντομα *Pros65^{RNAi}* (UAS *Pros65^{RNAi}*/Gal4^{TinC}) (Εικ. 4.23).

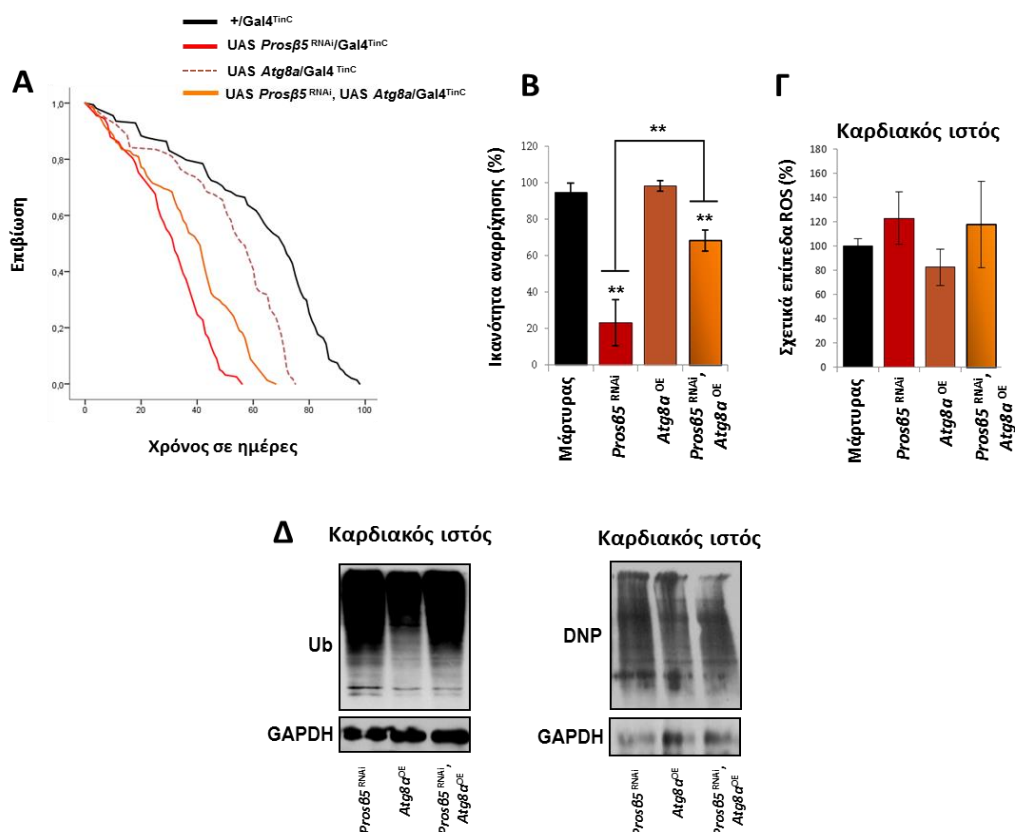


Εικόνα 4.23 Η επίδραση της υπερέκφρασης της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a σε υπόβαθρο *Pros65^{RNAi}* στον καρδιακό ιστό. (A1) (%) Σχετική ενεργότητα καθεψινών B, L σε καρδιακό ιστό νεαρών εντόμων. (A2) Αύξηση του αριθμού των λυσοσωμάτων στον καρδιακό ιστό των διπλά

διαγονιδιακών εντόμων έναντι του *Pros65^{RNAi}* στελέχους. (B) Αύξηση της έκφρασης της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a στον καρδιακό ιστό εντόμων *Drosophila melanogaster* μετά την υπερέκφρασή της. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. ** P < 0,01.

4.11 Η υπερέκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a σε υπόβαθρο *Pros65^{RNAi}* βελτίωσε τον φαινότυπο της καταστολής της β5 στον καρδιακό ιστό

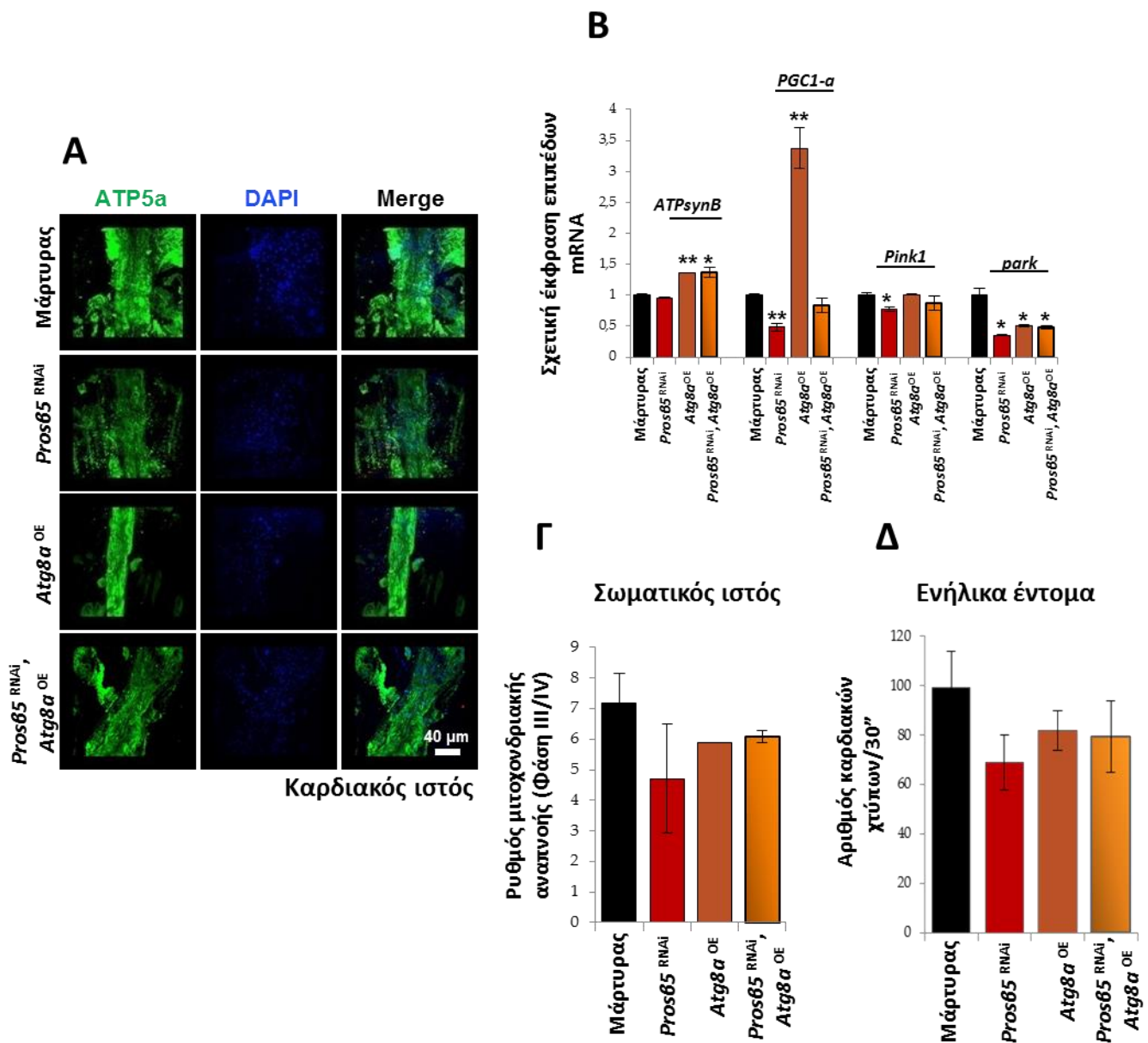
Δεδομένης της αύξησης του αριθμού και της λειτουργίας των λυσοσωμάτων (όπως πιθανολογείται λόγω αύξησης της ενεργότητας καθεψινών) στη συνέχεια ελέγχθηκε εάν η επαγωγή αυτού του μονοπατιού μπορεί να καταστήσει το φαινότυπο από την αποσιώπηση της β5 πρωτεασωμικής υπομονάδας πιο ήπιο. Βρέθηκε ότι τα διπλά διαγονιδιακά έντομα εμφάνισαν βελτιωμένο προσδόκιμο ζωής και κινητική ικανότητα (Εικ. 4.24A, 4.24B) σε σχέση με το *Pros65^{RNAi}* στέλεχος. Επιπλέον, μειώθηκαν τα επίπεδα ουβικιτινωμένων και καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών στον καρδιακό ιστό (Εικ. 4.24Δ), ενώ τα επίπεδα ROS στην καρδιά δε μεταβλήθηκαν (Εικ. 4.24Γ).



Εικόνα 4.24 Η επίδραση της υπερέκφρασης της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a σε υπόβαθρο *Pros65^{RNAi}* βελτίωσε το προσδόκιμο ζωής και την κινητική ικανότητα των εντόμων

μειώνοντας την πρωτεωμική αστάθεια στην καρδιά. (Α-Β) Η υπερέκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a στον καρδιακό ιστό βελτίωσε (Α) το προσδόκιμο ζωής και την (Β) κινητική ικανότητα των *Prosβ5^{RNAi}* εντόμων. (Γ) (%) Σχετικά επίπεδα ROS εντόμων *UAS Prosβ5^{RNAi}/Gal4^{TinC}*. (Δ) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα ουβικιτινωμένων (Ub) ή καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών (DNP). Το GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. ** P <0,01.

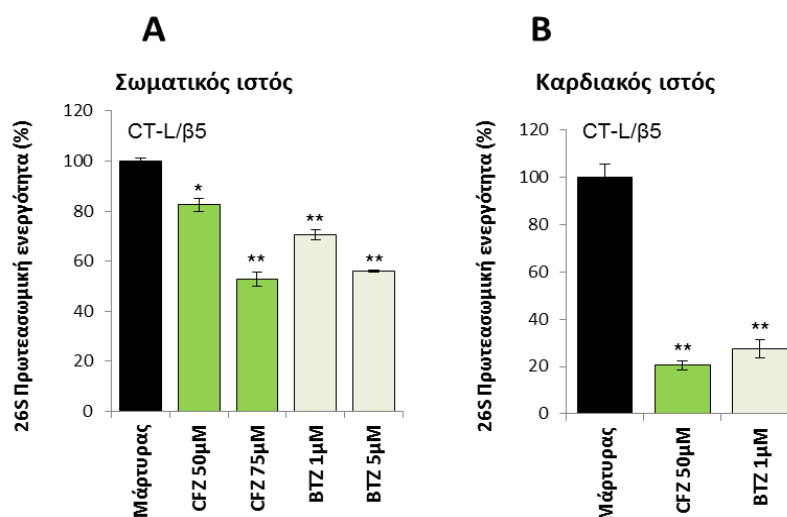
Αφού διαπιστώθηκε βελτίωση της ανάπτυξης, του προσδόκιμου ζωής και της αναρριχητικής ικανότητας των εντόμων, με ταυτόχρονη μείωση της πρωτεωμικής αστάθειας στον καρδιακό ιστό (επίπεδα ουβικιτινωμένων/καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών), ελέγχθηκε η καρδιακή λειτουργία των διπλά διαγονιδιακών εντόμων. Συγκεκριμένα, εξετάσαμε εάν η παρατηρηθείσα βελτίωση της υγείας των εντόμων συνοδεύτηκε με βελτίωση της μιτοχονδριακής και καρδιακής λειτουργίας. Βρέθηκε ότι η στοχευμένη στον καρδιακό ιστό υπερέκφραση της Atg8a αυξάνει τον αριθμό των μιτοχονδρίων (Εικ. 4.25Α) και την έκφραση των μιτοχονδριακών γονιδίων σε σχέση με τα *Prosβ5^{RNAi}* έντομα. Τα γονίδια αυτά περιλαμβάνουν το *PGC1-α* (σχετίζεται με τη βιογένεση των μιτοχονδρίων) καθώς και τα γονίδια *Pink/park* που εμπλέκονται στη μιτοφαγία και κατ'επέκταση στη μιτόσταση (ομοιοστασία των μιτοχονδρίων) του κυττάρου (Εικ. 4.25Β). Μπορούμε να υποθέσουμε λοιπόν ότι ενώ η πρωτεωμική αναστολή είναι επιβλαβής για τη λειτουργία των μιτοχονδρίων και τη μιτόσταση του κυττάρου, η υπερέκφραση της Atg8a φαίνεται αυξάνει τον αριθμό των μιτοχονδρίων επάγοντας το ρυθμό ανακύκλωσης και βιογένεσής τους. Παράλληλα, διαπιστώθηκε πως τα διπλά διαγονιδιακά έντομα εμφάνισαν βελτιωμένη αναπνευστική μιτοχονδριακή ικανότητα (Εικ. 4.25Γ) αλλά και καρδιακή λειτουργία σε σύγκριση με τα έντομα *Prosβ5^{RNAi}* με αύξηση του αριθμού των καρδιακών χτύπων.



Εικόνα 4.25 Η επίδραση της υπερέκφρασης της αυτοφαγικής πρωτεΐνης *Atg8a* σε υπόβαθρο *Pros65*^{RNAi} βελτίωσε τη μιτοχονδριακή και καρδιακή λειτουργία. Η υπερέκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης *Atg8a* στον καρδιακό ιστό οδήγησε (A) σε αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων, (B) επαγωγή της έκφρασης των μιτοχονδριακών γονιδίων και (Γ) βελτίωση της μιτοχονδριακής αναπνοής σε σχέση με τα *Pros65*^{RNAi} έντομα. (Δ) Αριθμός των καρδιακών χτύπων ανά 30". Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για τις μελέτες γονιδιακής έκφρασης. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

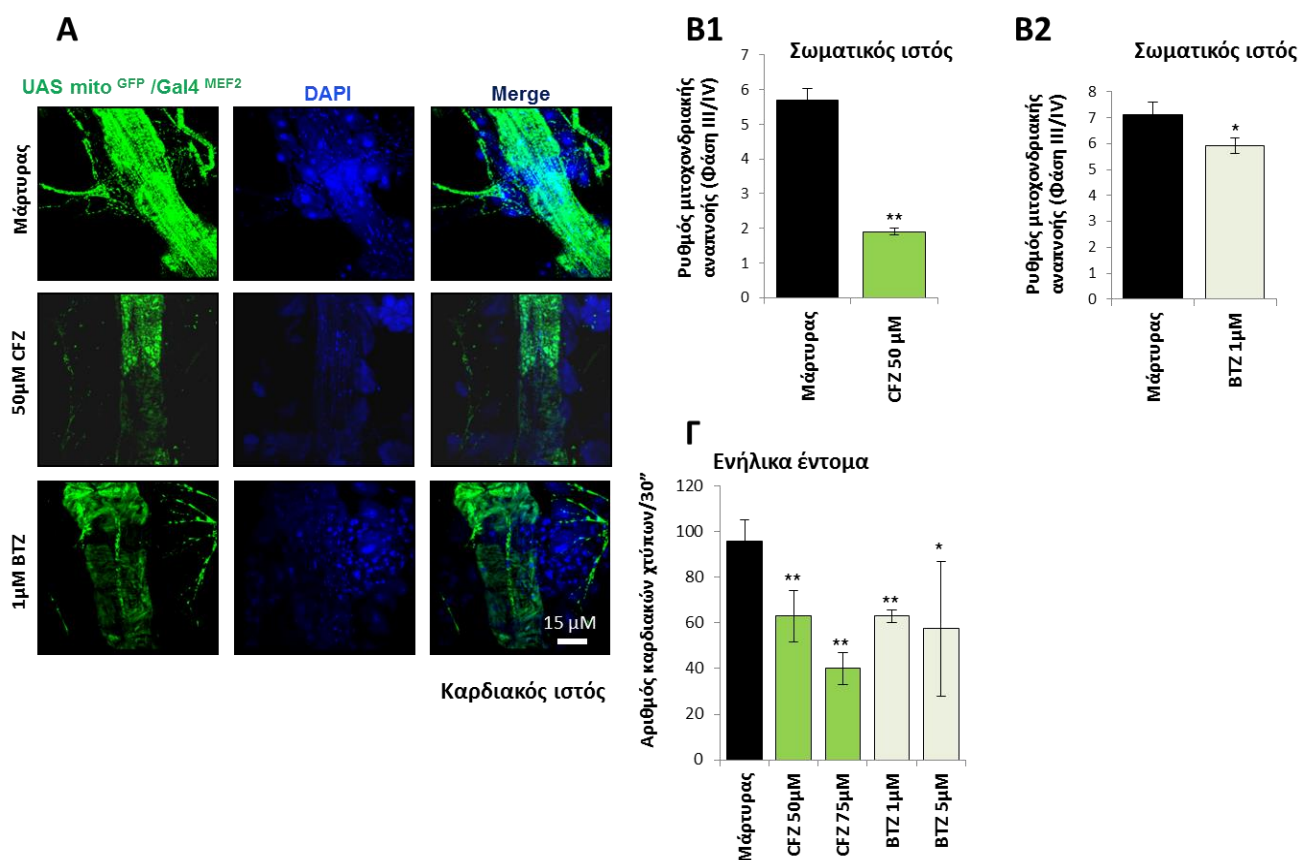
4.12 Η παρατεταμένη έκθεση εντόμων σε πρωτεασωμικούς αναστολείς προκαλεί σοβαρές επιπτώσεις στη φυσιολογική λειτουργία της καρδιάς

Δεδομένης της καρδιοτοξικότητας λόγω αποσιώπησης της έκφρασης των υπομονάδων του 20S πρωτεασώματος στην καρδιά με γενετικό τρόπο, πραγματοποιήθηκε μερική αναστολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας με φαρμακολογικό τρόπο. Συγκεκριμένα, χορηγήθηκαν σε έντομα Mito^{GFP}, Gal4^{MEF2} (ανίχνευση μιτοχονδρίων στο μυϊκό ιστό) οι πρωτεασωμικοί αναστολείς CFZ και BTZ σε συγκεντρώσεις 50μM, 75μM και 1μM, 5μM αντίστοιχα [σε αυτές τις συγκεντρώσεις η ενεργότητα CT-L αναστέλεται σε αντίστοιχο βαθμό (Tsakiri et al., 2017)]. Παρατηρήθηκε πως και οι δύο πρωτεασωμικοί αναστολείς προκαλούν μείωση της ενεργότητας CT-L σε ολόκληρο το σώμα του εντόμου με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο (Εικ. 4.26A). Εστιάζοντας στη δράση τους στον καρδιακό ιστό διαπιστώθηκε πως στις μικρότερες συγκεντρώσεις αναστολέα η κύρια ενεργότητα CT-L μειώθηκε σε ακόμη πιο μεγάλο βαθμό σε αυτόν τον ιστό σε σχέση με ολόκληρο το σώμα. Το γεγονός αυτό αποτελεί σημαντική ένδειξη ότι η καρδιά που είναι ένα όργανο υπεύθυνο για την κυκλοφορία της αιμολέμφου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στους πρωτεασωμικούς αναστολείς (Εικ. 4.26).



Εικόνα 4.26 Η επίδραση της χορήγησης πρωτεασωμικού αναστολέα στην καρδιά εντόμων *Drosophila melanogaster*. (A-B) Η έκθεση εντόμων *Drosophila melanogaster* σε πρωτεασωμικούς αναστολείς οδήγησε σε μεγαλύτερη μείωση ενεργότητας CT-L στον καρδιακό ιστό εν συγκρίσει με ολόκληρο το σώμα. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

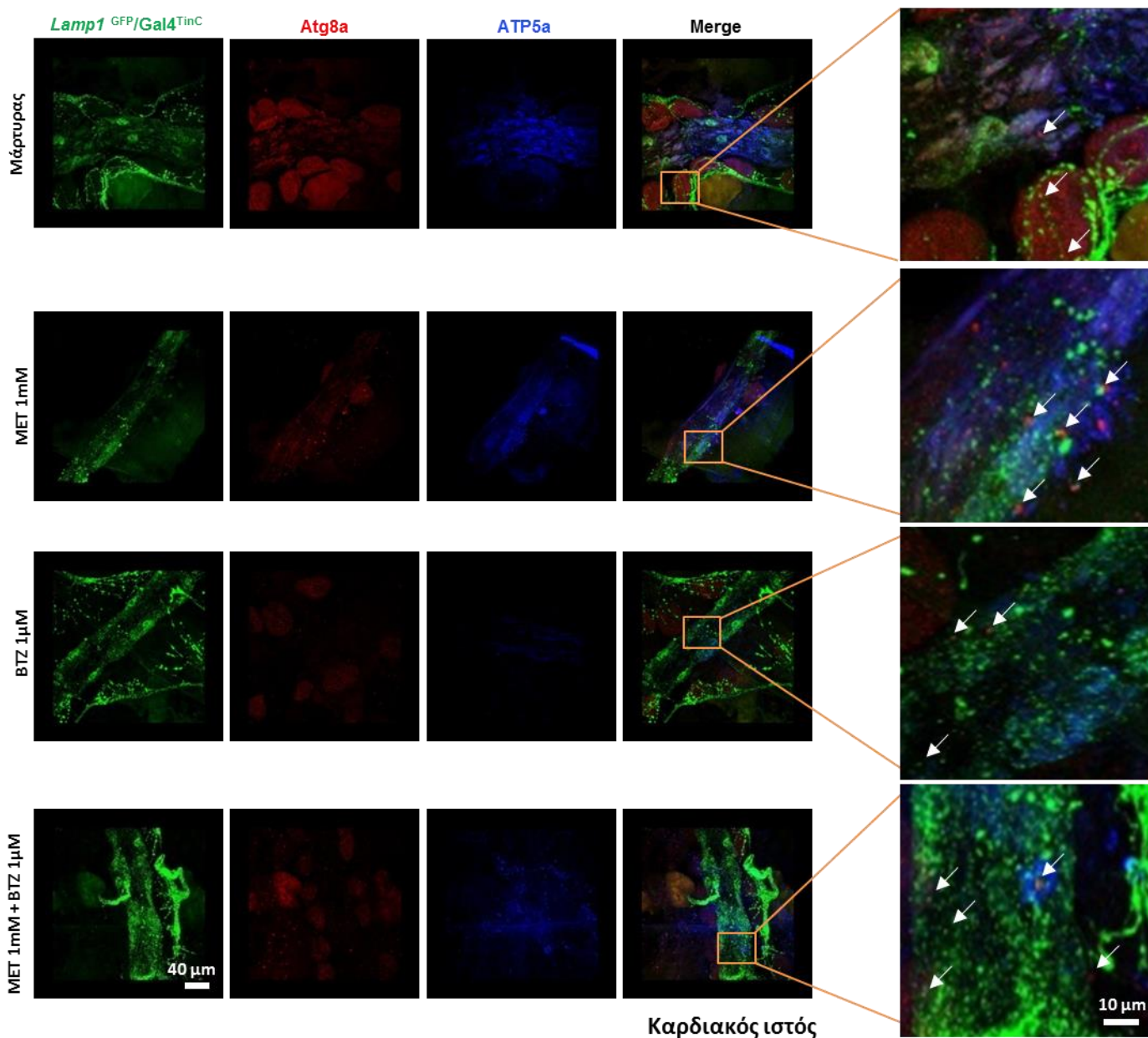
Η πρωτεωμική αστάθεια που προκλήθηκε από τη μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας στον καρδιακό ιστό φαίνεται πως προκαλεί σοβαρές επιπτώσεις και στα μιτοχόνδρια των καρδιομυοκυττάρων. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται και από δεδομένα της ερευνητικής μας ομάδας όπου βρέθηκε πως η δυσλειτουργία του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος οδηγεί σε σημαντική μιτοχονδριακή βλάβη (Gumeni et al., 2019; Tsakiri et al., 2019). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον αριθμό των μιτοχονδρίων των καρδιομυοκυττάρων (Εικ. 4.27Α) και στην αναπνευστική τους ικανότητα (Εικ. 4.27Β), ενώ επιπλέον εντοπίστηκαν σοβαρές επιπτώσεις στη φυσιολογική λειτουργία της καρδιάς με αρρυθμία καθώς και μείωση του αριθμού των καρδιακών χτύπων (Εικ. 4.27Γ).



Εικόνα 4.27 Η επίδραση της χορήγησης πρωτεασωμικού αναστολέα στην καρδιά εντόμων Mito^{GFP}, Gal4^{MEF2}. (Α) Η παρατεταμένη έκθεση εντόμων Mito^{GFP}, Gal4^{MEF2} οδήγησε σε μεγάλη μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων στον καρδιακό ιστό, (Β) ελάττωσε την αναπνευστική ικανότητα των μιτοχονδρίων, ενώ (Γ) προκάλεσε καρδιακή δυσλειτουργία. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

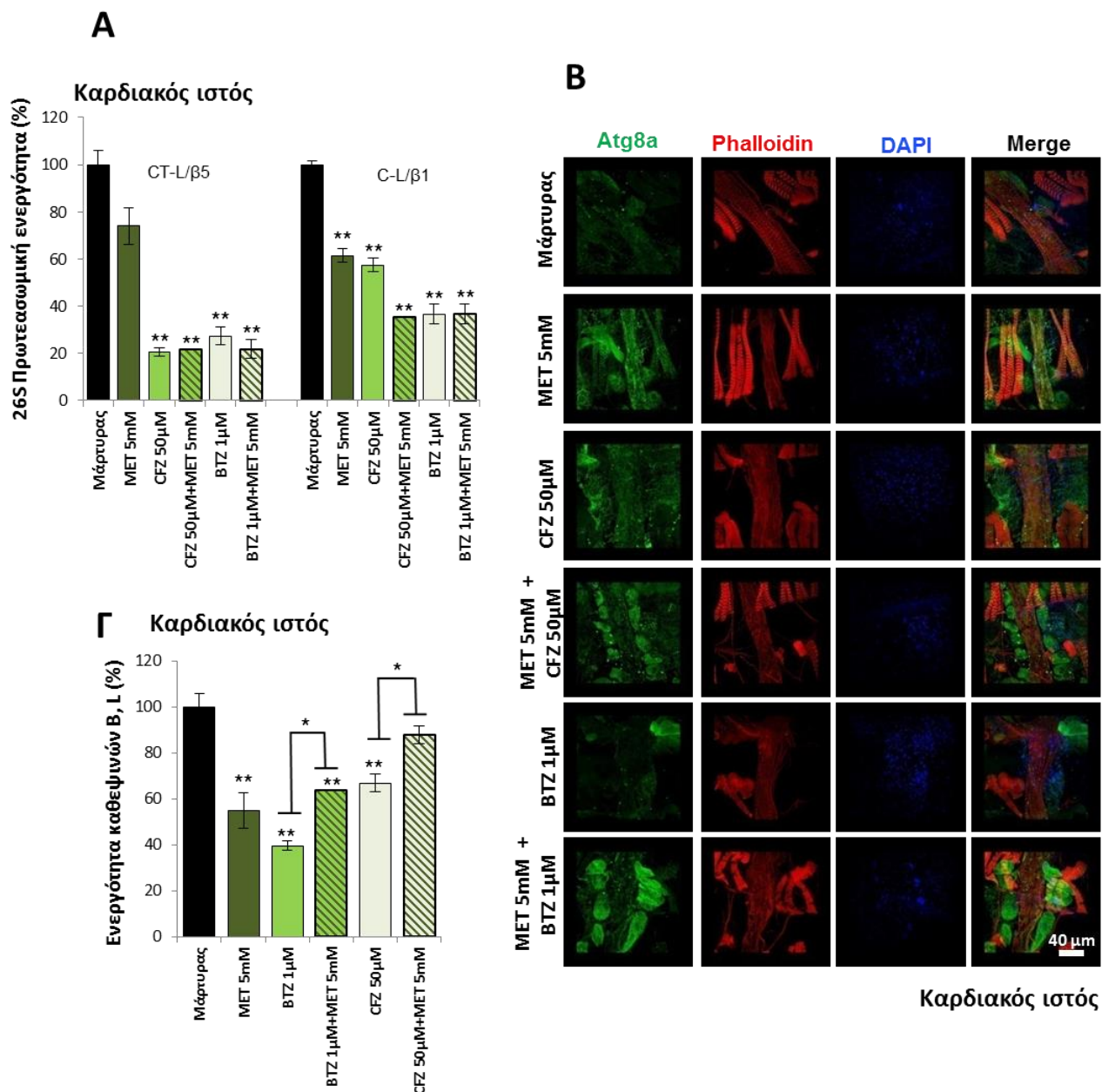
4.13 Η Μετφορμίνη επάγει το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος και αυξάνει την ενεργότητα των λυσοσωμικών καθεψινών

Βασιζόμενοι στα δεδομένα μας από το γενετικό μοντέλο αποσιώπησης των πρωτεασωμικών υπομονάδων αλλά και στα ευρήματα μετά από έκθεση των εντόμων στους πρωτεασωμικούς αναστολείς, επιδιώξαμε να επάγουμε το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος και σε έντομα τα οποία εκτίθενται σε πρωτεασωμικούς αναστολείς προκειμένου να μελετηθεί η πιθανή ευεργετική (όσον αφορά στη λειτουργία της καρδιάς) δράση της αυτοφαγίας. Μιας και η MET είναι ουσία με πιθανή καρδιοπροστατευτική δράση και καθώς θεωρείται επαγωγέας αυτοφαγίας προχωρήσαμε σε συγχορήγηση MET με τον αναστολέα BTZ. Ειδικότερα, χορηγήσαμε σε έντομα *Lamp1^{GFP}/Gal4^{TinC}*, τα οποία εκφράζουν τη λυσοσωμική πρωτεΐνη Lamp1 συνδεδεμένη με GFP στον καρδιακό ιστό (υποκεφάλαιο 3.1.5), τον αναστολέα BTZ με ή χωρίς MET. Στη συνέχεια οι καρδιακοί ιστοί των εντόμων επωάσθηκαν με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης Atg8a και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης. Παρατηρήθηκε ότι σε σχέση με τα έντομα μάρτυρες υπήρξε αύξηση της σύντηξης των λυσοσωμάτων με τα αυτοφαγosώματα [αυξημένος συνεντοπισμός Lamp1^{GFP} και Atg8a (κόκκινο κανάλι)] πιθανολογώντας την επαγωγή της αυτοφαγίας. Επαγωγή της αυτοφαγίας παρατηρήθηκε και μετά από συγχορήγηση MET και BTZ σε σύγκριση με τα έντομα στα οποία είχε χορηγηθεί μόνο BTZ (Εικ. 4.28). Επιπλέον οι καρδιακοί ιστοί επωάσθηκαν και με αντίσωμα έναντι της μιτοχονδριακής πρωτεΐνης ATP5a, η οποία αποτελεί δείκτη μιτοχονδρίων. Όπως και στην περίπτωση των εντόμων Mito^{GFP}, Gal4^{MEF2} παρουσιάσθηκε μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων των καρδιομυοκυττάρων έπειτα από τη χορήγηση πρωτεασωμικού αναστολέα. Η προσθήκη MET στην τροφή των εντόμων φαίνεται να αναστρέφει το φαινότυπο αυτό (Η συγκεκριμένη δράση της MET αναπτύσσεται εκτενέστερα στα παρακάτω υποκεφάλαια).



Εικόνα 4.28 Επαγωγή της αυτοφαγίας και αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων στον καρδιακό ιστό μετά από χορήγηση MET σε έντομα *Lamp1^{GFP}/Gal4^{TinC}*.

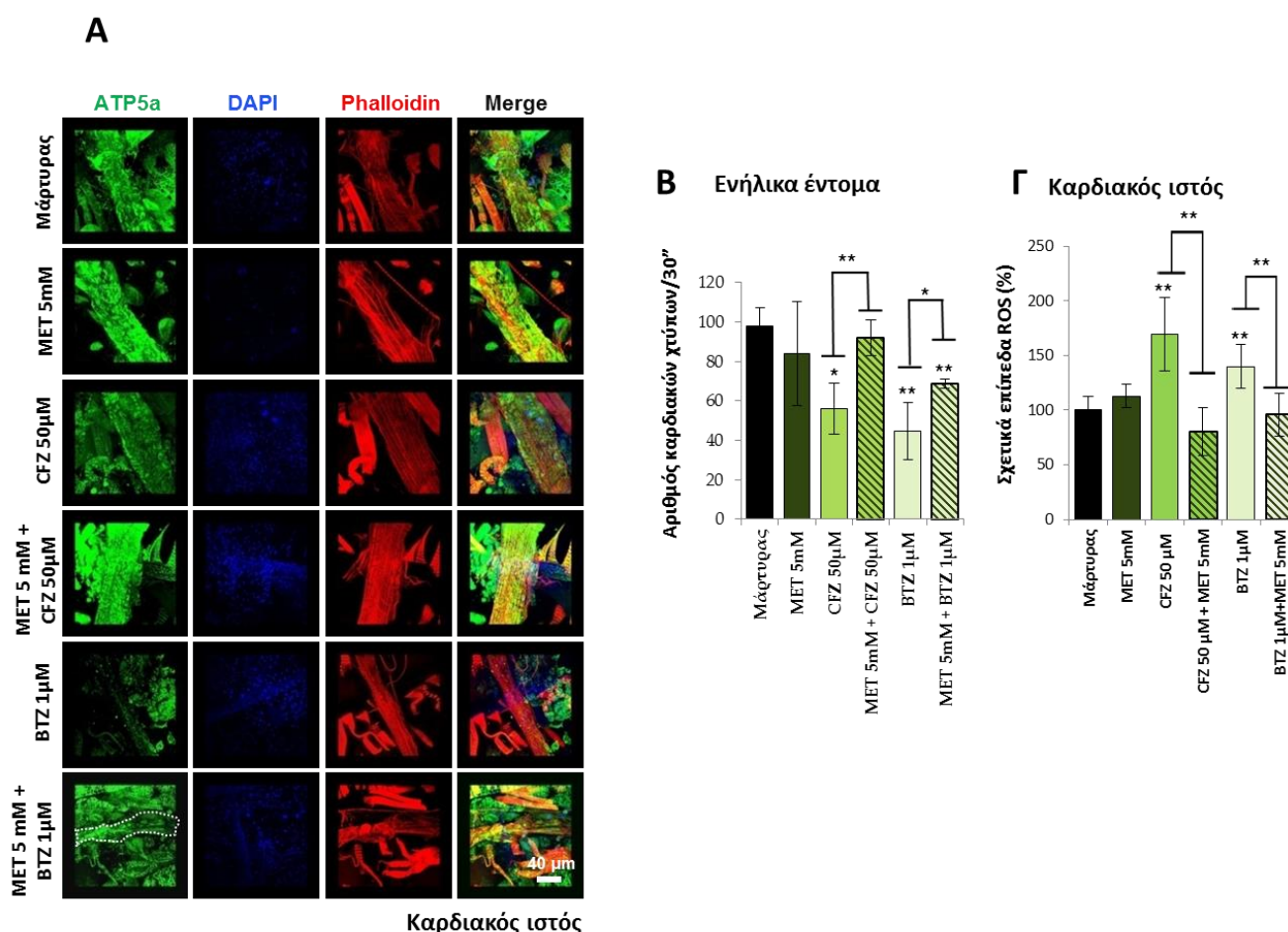
Εν συνεχεία ελέγχθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις του φαρμάκου από τις οποίες επιλέχθηκαν οι συγκεντρώσεις 1mM και 5mM. Αρχικά, εξετάσθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση MET (5mM) και διαπιστώθηκε αύξηση της ενεργότητας των λυσοσωμικών καθεψινών B και L (Εικ. 4.29A) αλλά και της έκφρασης της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a στον καρδιακό ιστό (Εικ. 4.29B) σε σχέση με τα έντομα στα οποία χορηγήθηκε μόνο ο θεραπευτικός αναστολέας. Αξίζει να σημειωθεί πως η χορήγηση MET δεν επηρέασε τη δράση των πρωτεασωμικών αναστολέων όσον αφορά στην καταστολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας (Εικ. 4.29A).



Εικόνα 4.29 Η επίδραση της συγχορήγησης MET (5mM) και πρωτεασωμικού αναστολέα στην καρδιά εντόμων *Drosophila melanogaster*. (A) Η χορήγηση MET δεν επηρεάζει την ανασταλτική δράση των πρωτεασωμικών αναστολέων. (B) Η MET αυξάνει την έκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a (Γ) και την ενεργότητα καθεψινών B και L στον καρδιακό ιστό σε σχέση με τα έντομα που έχει χορηγηθεί μόνο πρωτεασωμικός αναστολέας. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.14 Η Μετφορμίνη βελτιώνει την κινητική ικανότητα και την καρδιακή λειτουργία των εντόμων

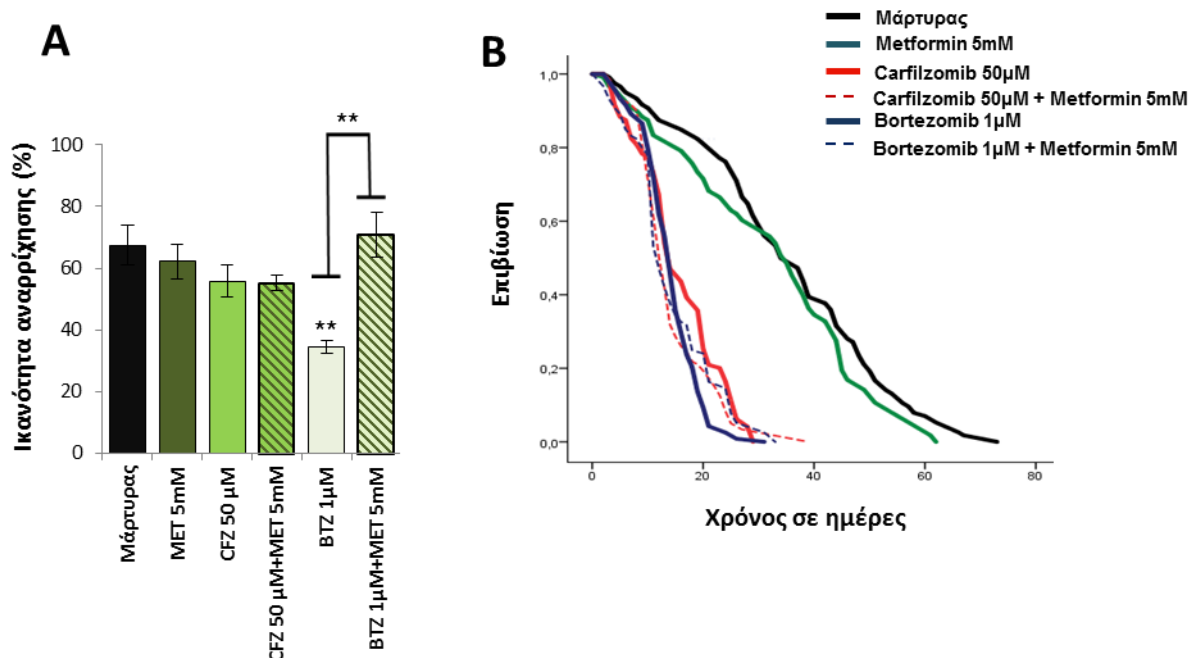
Δεδομένης της επαγωγής του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσσώματος που παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση MET, σε επόμενο στάδιο εξετάστηκε εάν η παρέμβαση αυτή μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της καρδιοτοξικότητας, η οποία σχετίζεται με τη μερική αναστολή της πρωτεασωματικής λειτουργίας στον καρδιακό ιστό. Για το λόγο αυτό, συγχωρηγήθηκαν MET και πρωτεασωμικοί αναστολείς σε έντομα *W¹¹¹⁸* και μετά από επώαση των ιστών με αντίσωμα έναντι της ATP5a βρέθηκε ότι η προσθήκη MET αύξησε τον αριθμό των μιτοχονδρίων (Εικ. 4.30Α). Επιπλέον, αυξήθηκε και ο αριθμός των καρδιακών χτύπων (Εικ. 4.30Β) σε σύγκριση με τα έντομα στα οποία χορηγείται μόνο ο αναστολέας, ενώ ο αριθμός των σχετικών επιπέδων ROS στην καρδιά μειώθηκε (Εικ. 4.30Γ).



Εικόνα 4.30 Η συγχωρήγηση MET και πρωτεασωμικού αναστολέα σε *Drosophila melanogaster* βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία του εντόμου. (Α) Η χορήγηση MET αύξησε τον αριθμό των μιτοχονδρίων στον καρδιακό ιστό. (Β) Η MET βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία και (Γ)

μειώνει τα επίπεδα ROS στον καρδιακό ιστό σε σχέση με τα έντομα που έχει χορηγηθεί μόνο πρωτεασωμικός αναστολέας. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Επιπρόσθετα, στα έντομα στα οποία χορηγείται BTZ και στα οποία είχε μειωθεί περισσότερο η αναρριχητική τους ικανότητα (παρενέργεια αντίστοιχη της περιφερικής νευροπάθειας που εμφανίζει το BTZ στην κλινική) (Tsakiri et al., 2017) η προσθήκη MET άσκησε ευργετική δράση με αύξηση της κινητικότητάς τους (Εικ. 4.31A). Παρόλα αυτά στη συγκεκριμένη συγκέντρωση δεν παρατηρήθηκε βελτίωση του προσδόκιμου ζωής των εντόμων σε σχέση με τα έντομα που αναπτύχθηκαν σε τροφή που περιείχε BTZ ή CFZ (Εικ. 4.31B).

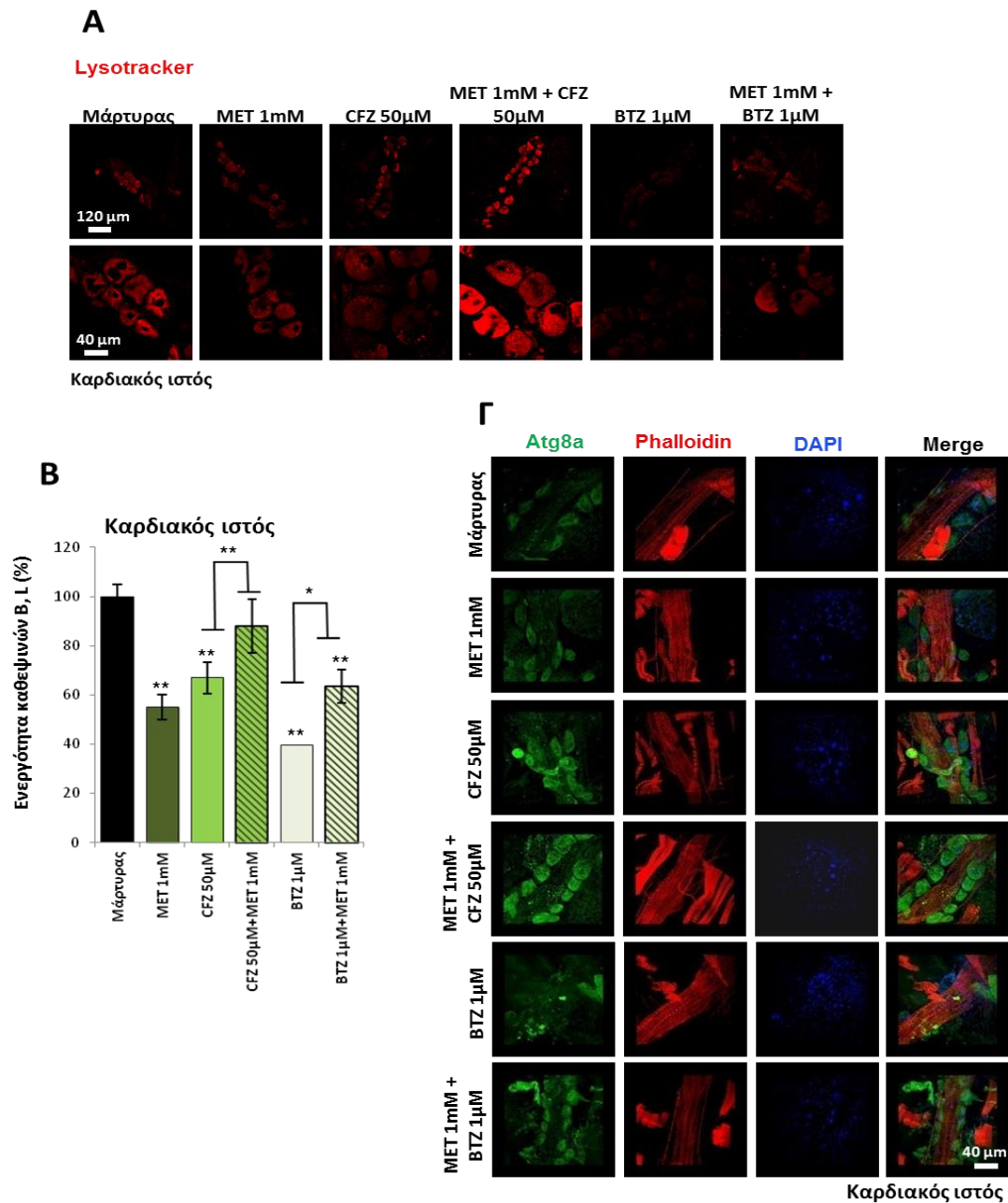


Εικόνα 4.31 Επίδραση MET σε προσδόκιμο ζωής και ικανότητα αναρρίχησης εντόμων *Drosophila melanogaster*. (Α) (%) ικανότητα αναρρίχησης. (Β) Καμπύλη βιωσιμότητας των εντόμων που εκτέθηκαν σε πρωτεασωμικούς αναστολείς ή/και MET. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. ** $P < 0,01$.

4.15 Η μείωση της συγκέντρωσης της Μετφορμίνης δεν επηρέασε τη επίδρασή της στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσσώματος

Ακολούθως εξετάσθηκε η χορήγηση μικρότερης συγκέντρωσης MET (1mM) σε έντομα W^{1118} . Έπειτα από ειδική χρώση για την ανίχνευση των λυσοσωμάτων αποκαλύφθηκε πως η χορήγηση MET αύξησε τον αριθμό των λυσοσωμάτων στον καρδιακό ιστό ιδιαίτερα εν συγκρίσει με τα έντομα στα οποία έχει χορηγηθεί ο αναστολέας CFZ (Εικ.

4.32Α). Παράλληλα, διαπιστώθηκε πως η MET αύξησε τόσο τη λυσοσωμική ενεργότητα (Εικ. 4.32Β) όσο και την έκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης Atg8a (Εικ. 4.32Γ) στον καρδιακό ιστό ωθώντας τα καρδιομυοκύτταρα προς την κατεύθυνση του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσοσώματος.

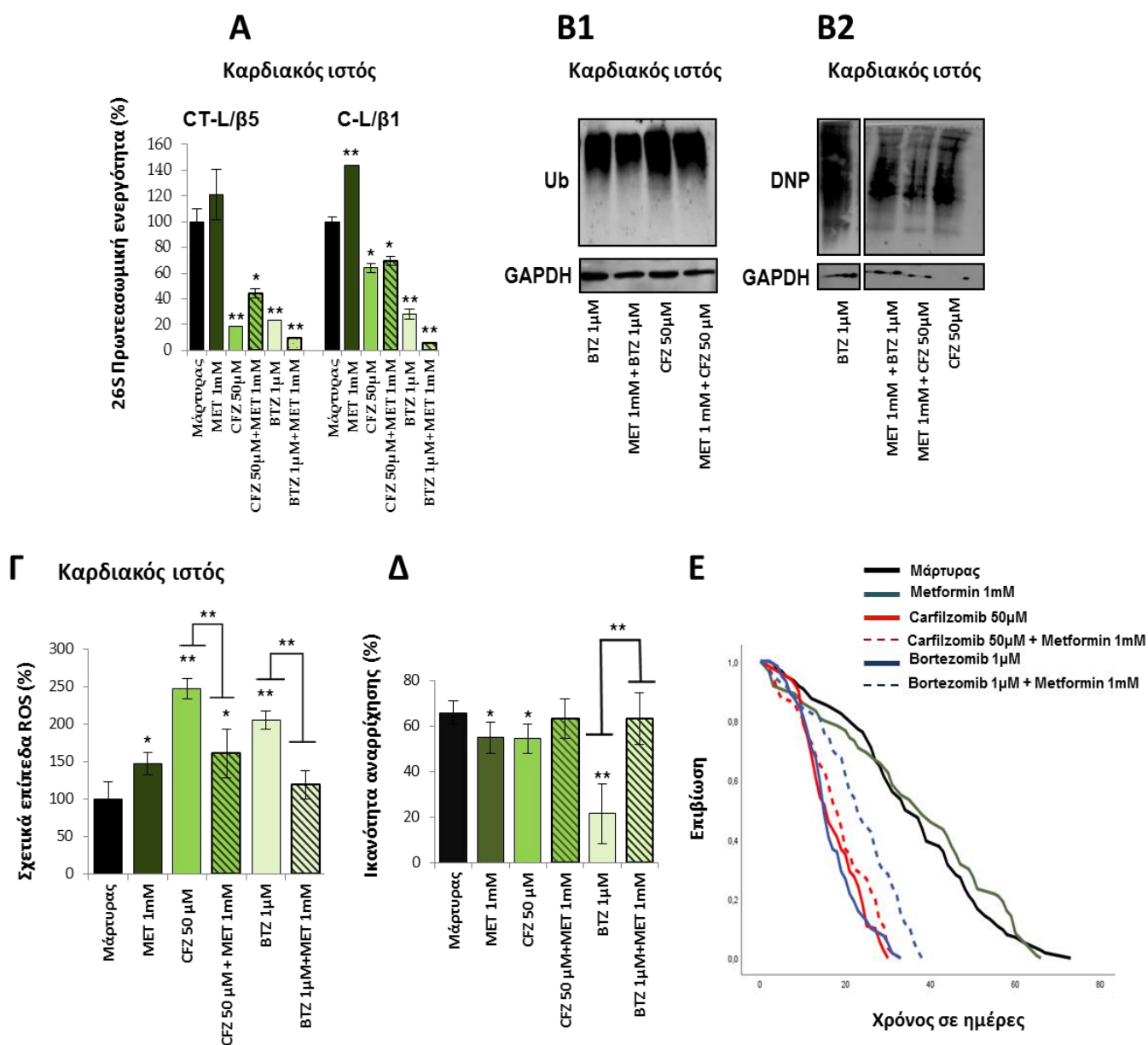


Εικόνα 4.32 Επίδραση MET σε μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος. (Α) Ειδική χρώση ανίχνευσης λυσοσωμάτων σε καρδιακό ιστό εντόμων W^{1118} (Β) (%) Ενεργότητα καθεψινών Β και L στον καρδιακό ιστό των εντόμων. (Γ) Αύξηση των επιπέδων έκφρασης της αυτοφαγικής πρωτεΐνης

Atg8a έπειτα από χορήγηση MET. Καμπύλη βιωσιμότητας των εντόμων που εκτέθηκαν σε πρωτεασωμικούς αναστολείς ή/και MET. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.16 Η επαγωγή του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος μείωσε την πρωτεωμική αστάθεια στον καρδιακό ιστό των εντόμων αυξάνοντας το προσδόκιμο ζωής τους

Δεδομένης της επαγωγής του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος που προκάλεσε η χορήγηση MET στη συνέχεια ελέγχθηκε εάν η πρωτεωμική αστάθεια που προκαλείται από τη μερική αναστολή του πρωτεασώματος στον καρδιακό ιστό μπορεί να εξισορροπηθεί με αυτόν τον τρόπο. Αρχικά, ελέγχθηκε η ενεργότητα πρωτεασώματος στον καρδιακό ιστό έπειτα από τη χορήγηση MET και αφού βρέθηκε ότι η ανασταλτική ικανότητα των πρωτεασωμικών αναστολέων δεν επηρεάζεται, μελετήθηκαν τα επίπεδα ουβικιτινιωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών στον καρδιακό ιστό (Εικ. 4.33Α). Είδαμε πως όπως και στην περίπτωση των *Prosβ5^{RNAi}*, *Atg8a^{OE}* εντόμων η ενεργοποίηση βασικών ρυθμιστών του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος οδηγεί σε μείωση των επιπέδων των ουβικιτινιωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών στον καρδιακό ιστό (Εικ. 4.33Β) σε σχέση με τα έντομα τα οποία είναι εκτεθειμένα μόνο σε πρωτεασωμικούς αναστολείς. Παράλληλα, και τα επίπεδα των ROS στον καρδιακό ιστό μειώθηκαν (Εικ. 4.33Γ), ενώ βελτιώθηκε τόσο η κινητική ικανότητα (Εικ. 4.33Δ) όσο και το προσδόκιμο ζωής των εντόμων στα οποία χορηγείται το BTZ (Εικ. 4.33Ε). Όσον αφορά στον πρωτεασωμικό αναστολέα CFZ, ο οποίος δεν επηρεάζει στον ίδιο βαθμό την κινητική ικανότητα των εντόμων με το BTZ (βλέπε, διαφορική τοξικότητα όσον αφορά στη πρόκληση περιφερικής νευροπάθειας στην κλινική), βρέθηκε μία ήπια βελτίωση της ικανότητας αναρρίχησης των εντόμων μετά τη συγχορήγηση με MET, αλλά όχι στατιστικά σημαντική (Εικ. 4.33Δ). Τέλος παρατηρήθηκε βελτίωση και στην υγεία (healthspan) των εντόμων αυτών (Εικ. 4.33Ε).



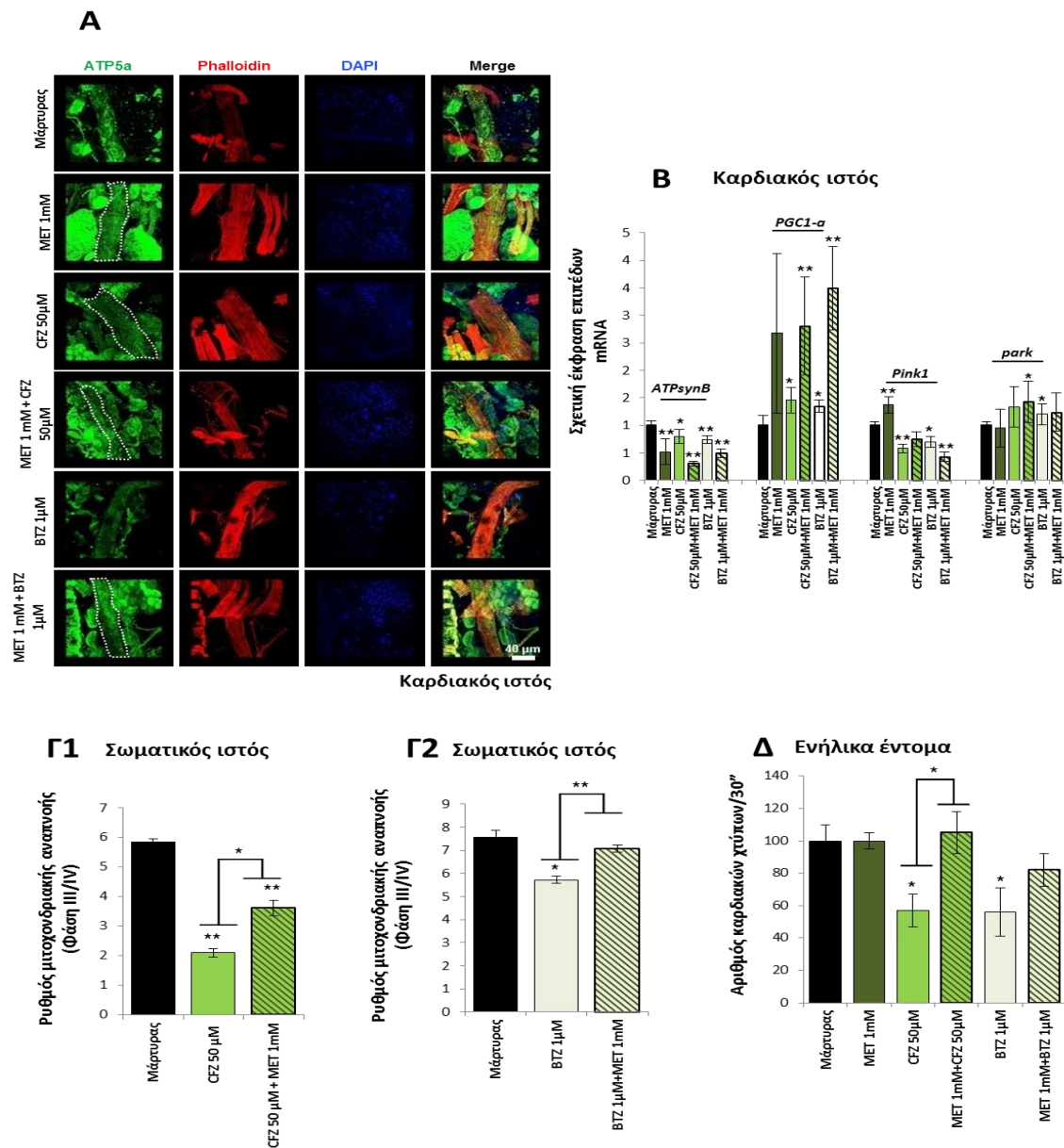
Εικόνα 4.33 Η MET οδηγεί σε μείωση της πρωτεωμικής αστάθειας στον καρδιακό ιστό. (Α)

Η χορήγηση MET δεν επηρεάζει τη δράση των πρωτεασωμικών αναστολέων όσον αφορά στην καταστολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας. (B1-B2) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστέγνωμα ουβικιτινιωμένων (Ub) ή καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών (DNP). Το GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. (Γ) (%) Σχετικά επίπεδα ROS μετά τη χορήγηση MET στον καρδιακό ιστό. (Δ)(%) Ικανότητα αναρρίχησης και (Ε) καμπύλη βιωσιμότητας των εντόμων που εκτέθηκαν σε πρωτεασωμικούς αναστολείς ή/και MET. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.17 Η Μετφορμίνη επάγει τη βιογένεση των μιτοχονδρίων και βελτιώνει τη μιτοχονδριακή και καρδιακή λειτουργία σε W^{1118} έντομα στα οποία χορηγούνται πρωτεασωμικοί αναστολείς

Στη συνέχεια οι μελέτες επικεντρώθηκαν στη μιτοχονδριακή αλλά και στην καρδιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από τη μερική αναστολή του πρωτεασώματος. Ένας από τους στόχους όπως προαναφέρθηκε της παρούσας ΔΔ ήταν η ανάδειξη θεραπευτικών παρεμβάσεων για τη μείωση της καρδιοτοξικότητας χρησιμοποιώντας τον αντι-υπεργλυκαιμικό παράγοντα MET. Βρέθηκε πως η χορήγηση MET αύξησε τον αριθμό των μιτοχονδρίων στα καρδιομυοκύτταρα (Εικ. 4.34Α) όπως είχε παρατηρηθεί και στο γενετικό μοντέλο με την υπερέκφραση της αυτοφαγικής πρωτεΐνης *Atg8a*. Το εύρημα αυτό υποστηρίζεται και από δεδομένα από ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου όπου παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *PGC1- α* , το οποίο σχετίζεται με την βιογένεση των μιτοχονδρίων, έπειτα από τη χορήγηση MET (Εικ. 4.34Β). Ταυτόχρονα, διαπιστώθηκε βελτίωση της αναπνευστικής ικανότητας των μιτοχονδρίων (Εικ. 4.34Γ), αλλά και αύξηση του αριθμού των καρδιακών χτύπων (Εικ. 4.34Δ) σε σχέση με τα έντομα στα οποία χορηγούνται μόνο πρωτεασωμικοί αναστολείς. Μπορούμε να συμπεράνουμε λοιπόν πως η επαγωγή του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος και κατ' επέκταση της μιτοφαγίας (επιλεκτική μιτοχονδριακή αυτοφαγία) βελτίωσε τον αριθμό και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, αυξάνοντας την ανακύκλωση των κατεστραμμένων και δυσλειτουργικών οργανιδίων καθώς και αντικαθιστώντας τα με νέα και «υγιή».



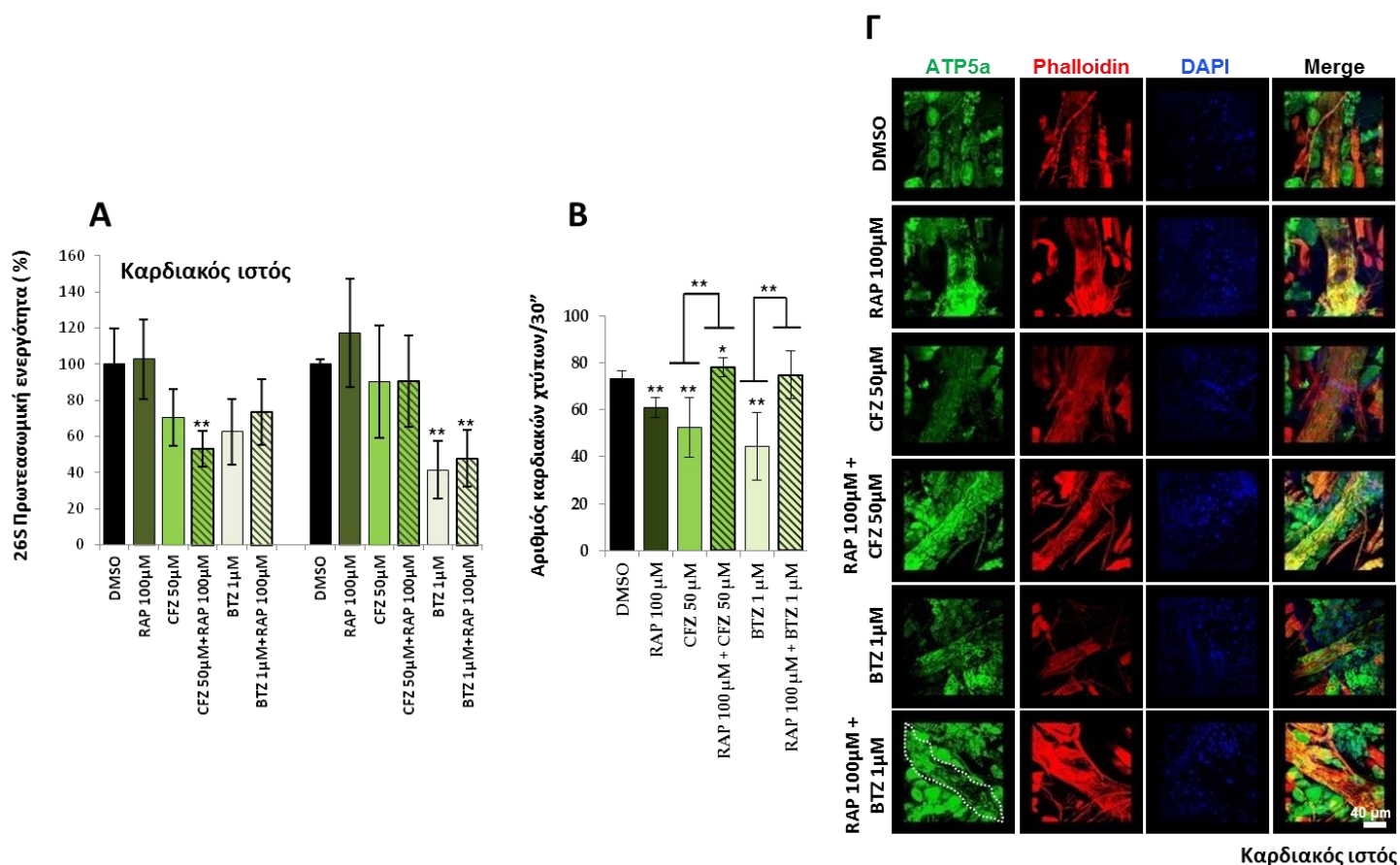
Εικόνα 4.34 Η MET βελτιώνει τη μιτοχονδριακή και καρδιακή λειτουργία όταν χορηγείται με πρωτεασωμικούς αναστολείς. (Α) Η χορήγηση MET οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων στον καρδιακό ιστό, (Β) επάγοντας τη βιογένεσή τους. (Γ) Η μιτοχονδριακή αναπνοή αυξήθηκε εν συγκρίσει με τα έντομα που είναι εκτεθειμένα σε CFZ ή BTZ. (Δ) Ο αριθμός των καρδιακών παλμών εντόμων που εκτέθηκαν σε πρωτεασωμικούς αναστολείς ή/και MET. Το γονίδιο *rr49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για τις μελέτες γονιδιακής έκφρασης. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

4.18 Η χορήγηση Ραπαμυκίνης σε W^{1118} έντομα που λαμβάνουν πρωτεασωμικούς αναστολείς βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία

Ακολούθως και αφού διαπιστώθηκε η επαγωγή της αυτοφαγίας έπειτα από χορήγηση MET, προχωρήσαμε σε χορήγηση ενός άλλου γνωστού επαγωγέα του μονοπατιού αυτού, της RAP. Στόχος μας ήταν η επιβεβαίωση της συμμετοχής της

αυτοφαγίας στη βελτίωση του μιτοχονδριακού αριθμού και της καρδιακής λειτουργίας εντόμων στα οποία χορηγούνται πρωτεασωμικοί αναστολείς.

Βρέθηκε αρχικά, πως η χορήγηση RAP δεν τροποποίησε την ανασταλτική δράση του BTZ ή του CFZ (Εικ. 4.35Α). Όσον αφορά στον καρδιακό παλμό των εντόμων διαπιστώσαμε πως η βραδυκαρδία που προκαλείται από τη χορήγηση πρωτεασωμικών αναστολέων αναστράφηκε μετά την προσθήκη RAP, με επαναφορά του καρδιακού ρυθμού στα επίπεδα της ομάδας των εντόμων μάρτυρα (DMSO) (Εικ. 4.35Β). Τέλος, ο αριθμός των μιτοχονδρίων αυξήθηκε σε σχέση με τα έντομα στα οποία χορηγούνται πρωτεασωμικοί αναστολείς (Εικ. 4.35Γ). Η αύξηση του μιτοχονδριακού αριθμού έπεται από χορήγηση RAP επιβεβαιώνεται και από μελέτη σε μοντέλο ποντικού όπου βρέθηκε πως η ουσία αυτή στην καρδιά γηρασμένων πειραματοζώων οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού παραγωγής μιτοχονδρίων έπεται από αύξηση της ανακύκλωσης των κατεστραμμένων και/ή μη λειτουργικών μιτοχονδρίων μέσω μιτοφαγίας (Chiao et al., 2016).



Εικόνα 4.35 Η RAP αναστρέφει το φαινότυπο που προκαλούν οι πρωτεασωμικοί αναστολείς σε μιτοχόνδρια και καρδιά. (Α) Η χορήγηση RAP δεν επηρεάζει τη δράση των πρωτεασωμικών αναστολέων όσον αφορά στην καταστολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας. **(Β)** Η

RAP αύξησε τον αριθμό των καρδιακών παλμών εντόμων που εκτέθηκαν σε πρωτεασωμικούς αναστολείς. (Γ) Η χορήγηση RAP οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των μιτοχονδρίων στον καρδιακό ιστό. Μπάρες σφάλματος: $\pm$ SD. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η σωστή λειτουργία του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος είναι κεντρική στην πρωτεόσταση (ομοιοστασία του πρωτεώματος) δεδομένου ότι αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της κυτταρικής επιβίωσης τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε καρκινικά κύτταρα. Ως εκ τούτου, δεν αποτελεί έκπληξη ότι η χρήση των πρωτεασωμικών αναστολέων στην κλινική θεραπευτική έχει φέρει επανάσταση στη θεραπεία διαφόρων τύπου καρκίνου (Teicher and Tomaszewski, 2015). Συγκεκριμένα, οι πρωτεασωμικοί αναστολείς έχουν αποδείξει κλινική αποτελεσματικότητα στη θεραπεία αιματολογικών κακοηθειών και είναι υπό αξιολόγηση για άλλες μορφές καρκίνου (Dimopoulos et al., 2016). Παρ' όλα αυτά, εμφανίζουν σοβαρές παρενέργειες στην κλινική όπως περιφερική νευροπάθεια και καρδιοτοξικότητα επηρεάζοντας αρνητικά την ποιότητα ζωής των ασθενών. Θεωρώντας ότι οι κύριες αποκρίσεις ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα σε θεραπευτικούς πρωτεασωμικούς αναστολείς δεν είναι πλήρως κατανοητές και ότι η ανάγκη για μια πιο εξατομικευμένη θεραπευτική προσέγγιση είναι επιτακτική, αναλύθηκε η λειτουργικότητα πρωτεοστατικών μονάδων σε ΜΚΠΑ και ΕΚ απομονωμένα είτε από υγιείς δότες είτε από ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα που έλαβαν ως θεραπεία πρωτεασωμικούς αναστολείς. Σε υγιείς δότες βρέθηκε ότι οι πρωτεασωμικές πεπτιδικές ενεργότητες και στους δύο τύπους κυττάρων του αίματος εμφάνισαν μείωση κατά την εξέλιξη του γήρατος. Σε συμφωνία, προηγούμενες μελέτες, έχουν δείξει ότι η πρωτεασωμική ενεργότητα μειώνεται κατά τη γήρανση κυττάρων των θηλαστικών (Chondrogianni et al., 2003) καθώς και κατά τη διάρκεια της γήρανσης σε διάφορους ιστούς αρουραίων και ποντικών, συμπεριλαμβανομένου του λιπώδους ιστού, της καρδιάς, του εγκεφάλου, του ήπατος και των μυών κ.α (Tsakiri and Trougakos, 2015). Παρόμοια δεδομένα, παρατηρήθηκαν και από τη μελέτη της κύριας πρωτεασωμικής ενεργότητας CT-L στην καρδιά εντόμων *Drosophila melanogaster*, όπου παρουσιάσθηκε μειωμένη σε μεγαλύτερης ηλικίας έντομα εν αντιθέσει με νεαρά. Η μείωση αυτή οδήγησε σε πρωτεωμική αστάθεια και καρδιακή δυσλειτουργία. Η ηλικιο-εξαρτώμενη ελάττωση της ενεργότητας του πρωτεασώματος σχετίζεται πιθανώς είτε με δυσλειτουργία του πρωτεασώματος εξαιτίας του αυξημένου σχηματισμού πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Friguet and Szweda, 1997; Höhn et al., 2011) είτε με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων και του ρυθμού αυτοσυγκρότησης του συμπλόκου (Tsakiri et al., 2013a).

Ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι τα ΜΚΠΑ εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα πρωτεασωμικής ενεργότητας, σε σύγκριση με τα ΕΚ, τα οποία είναι κύτταρα απύρρηνα και υψηλής διαφοροποίησης. Μπορεί επομένως να υποθεθεί ότι το θεραπευτικό

παράθυρο που παρατηρείται στο πολλαπλούν μυέλωμα με τη χρήση πρωτεασωμικών αναστολέων σχετίζεται πιθανότατα και με το γεγονός ότι τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα (ή λιγότερο διαφοροποιημένα) καρκινικά κύτταρα είναι "εθισμένα" σε αυξημένη λειτουργία του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Η εξάρτηση αυτή οφείλεται και στην αυξημένη πρωτεϊνική σύνθεση και το αυξημένο πρωτεοτοξικό στρες στα κύτταρα αυτά, τα οποία έτσι καθίστανται διαφορετικά ευαίσθητα στην αναστολή του πρωτεασώματος. Όπως αναμενόταν, στους περισσότερους ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα, η θεραπεία με πρωτεασωμικούς αναστολείς οδηγεί σε μειωμένη πρωτεασωμική ενεργότητα και στα δύο είδη κυττάρων του αίματος. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η αναστολή του πρωτεασώματος επιτεύχθηκε σε μεταγενέστερους θεραπευτικούς κύκλους ενώ (κυρίως στα ΜΚΠΑ) οι πρωτεασωμικές ενεργότητες εμφάνισαν ανάκαμψη κατά τις περιόδους μη χορήγησης του φαρμάκου. Επίσης, όπως και στους ιστούς του εντόμου *Drosophila melanogaster* (Tsakiri et al., 2013b), η αναστολή του πρωτεασώματος στα ΜΚΠΑ οδήγησε σε αυξημένη έκφραση των πρωτεοστατικών γονιδίων σε μεγάλο αριθμό ασθενών. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι το ρυθμιστικό κύκλωμα ανατροφοδότησης, το οποίο λειτουργεί για την αποκατάσταση της πρωτεωμικής σταθερότητας όταν το πρωτεάσωμα δυσλειτουργεί, είναι εξαιρετικά συντηρημένο στα ανώτερα μετάζωα. Επιπρόσθετα, τα ρυθμιστικά στοιχεία του δικτύου πρωτεόστασης εμφάνισαν θετική συσχέτιση μεταξύ τους 24 ώρες (T1) μετά τη χορήγηση του φαρμάκου, υποδεικνύοντας ότι είναι πιθανόν να ρυθμίζονται σε μία ενιαία λειτουργική μονάδα. Το συγκεκριμένο γεγονός είναι ιδιαίτερα εμφανές από τη διαπιστωθείσα θετική συσχέτιση των πρωτεασωμικών γονιδίων με τα αυτοφαγικά γονίδια *SQSTM1/p62*, *HDAC6* και *BECN1* καθώς και από τη θετική συσχέτιση του τελευταίου με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των μοριακών συνοδών (π.χ. *HSP27* και *HSP90*). Επομένως, η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος επάγει την έκφραση των περισσότερων από τις κύριες μονάδες του δικτύου πρωτεόστασης. Σε συμφωνία, έχει προταθεί ότι οι πρωτεασωμικοί αναστολείς εμπλέκονται στην επαγωγή της έκφρασης της μοριακής συνοδού HSP70 (Hanke et al., 2016; Imam et al., 2017) και στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας ως μηχανισμού προστασίας σε κύτταρα θηλαστικών μέσω (μεταξύ άλλων) επαγωγής του UPR (Zang et al., 2012).

Σε συμφωνία με τις παραπάνω παρατηρήσεις, οι αναλύσεις μας με τη χρήση των συντελεστών συσχέτισης Pearson και Spearman αποκάλυψαν αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων *TXNRD1*, *HSP27*, *HDAC6* και *SQSTM1* με το PFS των ασθενών και/ή το OS (Πίνακας 4.1) που υποδεικνύει πιθανόν ότι η ρύθμιση των γονιδίων αυτών κατά τη διάρκεια της θεραπείας θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει έναν δείκτη κακής πρόγνωσης. Σε συμφωνία με την παραπάνω παραδοχή, η αναστολή της μοριακής συνοδού HSP27

φαίνεται πως αναστρέφει την ανθεκτικότητα κυττάρων λεμφώματος στον αναστολέα BTZ (Chauhan et al., 2003), ενώ σε μοντέλο μυελώματος σε ποντικό, βρέθηκε ότι η ανάπτυξη αντοχής σε πρωτεασωμικούς αναστολείς σχετίζεται με υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Nrf2 (Stessman et al., 2013). Επίσης, η αυξημένη έκφραση των αντιοξειδωτικών γονιδίων έχει συσχετιστεί με ανθεκτικότητα σε θεραπεία με BTZ σε ασθενείς με λέμφωμα μανδύα (Mantle cell lymphoma, MCL) (Weniger et al., 2011). Επιπλέον, η POMP (μοριακή συνοδός που συμμετέχει στην αυτοσυγκρότηση του ενεργού πρωτεασωμικού ολοενζύμου) είναι μεταγραφικός-στόχος του NRF2 και φαίνεται πως διαμεσολαβεί την ανθεκτικότητα στο BTZ (Li et al., 2015). Καθώς η επίδραση της έκφρασης των γονιδίων *HDAC6* και *SQSTM1*, στο πολλαπλούν μυέλωμα (μιας νόσου που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα πρωτεωμικής αστάθειας) παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη, η μελέτη μας προσθέτει νέα δεδομένα για τη πιθανή προγνωστική τους αξία. Το κύριο υπόστρωμα της *HDAC6* είναι η α -τουμπουλίνη, ενώ η πρωτεΐνη αυτή επίσης εμπλέκεται στην απομάκρυνση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων με τη μεσολάβηση του μονοπατιού της αυτοφαγίας. (Laubach et al., 2017). Η *SQSTM1* φέρει επικράτειες υποδοχέα ουβικιτίνης και εμπλέκεται και αυτή στην απομάκρυνση των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και κατεστραμμένων μη λειτουργικών οργανιδίων (π.χ. μιτοχόνδρια) μέσω του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσσώματος (Lipraai and Löw, 2014). Έχει δειχθεί ότι το *SQSTM1* αλληλεπιδρά με την *HDAC6* μειορρυθμίζοντας τη δράση της αποακετυλάσης (Yan et al, 2013). Ειδικότερα, η *HDAC6* έχει βρεθεί να εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του HSF1 μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος ρυθμίζει, μεταξύ άλλων, την έκφραση του γονιδίου HSP27 (Pernet et al, 2014), ενώ η πρωτεΐνη *SQSTM1* συμμετέχει στην ενεργοποίηση του NRF2 (Jain et al., 2011; Komatsu et al., 2010) ρυθμίζοντας την κυτταρική αντιοξειδωτική απόκριση. Σε συμφωνία, ο αναστολέας έναντι της *HDAC6*, ACY-241 (North et al., 2017) αύξησε την αντι-καρκινική δράση του romalidomide στο πολλαπλούν μυέλωμα, ενώ ο αναστολέας ricolinostat (ACY-1215) βρίσκεται σε κλινική δοκιμή συνδυαζόμενος με BTZ και δεξαμεθαζόνη σε ασθενείς με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό πολλαπλούν μυέλωμα (Vogl, et al., 2017). Επιπλέον, και σε συμφωνία με τα ευρήματά μας, έχει αποκαλυφθεί πρόσφατα ότι η απορρύθμιση των αποακετυλασών ιστόνης αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα (Mithraprabhu et al., 2014). Ομοίως, έχει αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού *SQSTM1*-NRF2 διαμεσολαβεί την ανθεκτικότητα στους πρωτεασωμικούς αναστολείς σε μυελωματικά κύτταρα μέσω οξειδοαναγωγικού, μεταβολικού και μεταγραφικού επαναπρογραμματισμού (Riz et al, 2016).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαπίστωση ότι τα ΜΚΠΑ, αλλά και σε κάποιες περιπτώσεις τα ΕΚ ορισμένων ασθενών, εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα πρωτεασωμικών ενεργοτήτων παρά τη θεραπεία με πρωτεασωμικούς αναστολείς. Στην περίπτωση των ΜΚΠΑ οι αποκρίσεις αυτές μπορεί να σχετίζονται με μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση, όπως επαγωγή γονιδίων ρυθμιστικών στοιχείων του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, με στόχο να υπερνικήσουν τα κύτταρα αυτά την προκληθείσα πρωτεασωμική αναστολή. Στις περισσότερες περιπτώσεις η επαγωγή της έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων είναι μια πρώιμη απόκριση του κυττάρου, η οποία καταλήγει σε μεταγενέστερη ενισχυμένη παραγωγή του πρωτεασωμικού συμπλόκου και συνεπώς σε αυξημένες ενζυμικές ενεργότητες/μg ολικής πρωτεΐνης. Προς αυτήν την κατεύθυνση συνηγορούν μελέτες, οι οποίες υποδεικνύουν ότι η υπερέκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων β5 (ή άλλων υπομονάδων, όπως β1 και β2) λειτουργεί ως ένας πιθανός μηχανισμός ανθεκτικότητας στο BTZ (Fuchs et al., 2008; Kuhn et al., 2012; Ruckrich et al., 2009). Στην περίπτωση των απύρηνων ΕΚ οι αυξημένες πρωτεασωμικές ενεργότητες μπορεί να σχετίζονται με αυξημένη απόσυρση των κατεστραμμένων (π.χ. πρόωρα γηρασμένων) ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσω ερυθροφαγοκυττάρωσης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη ερυθροποίηση, με αύξηση του αριθμού των πρωτεασωμάτων στα νεοσχηματισθέντα ΕΚ. Σε συμφωνία με την προαναφερθείσα παραδοχή, αυξημένη ερυθροποίηση βρέθηκε και σε μοντέλο ποντικού έπειτα από οξειδωτικό στρες εξαιτίας υψηλής συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος, η οποία αποτελεί επίσης παρενέργεια της θεραπείας με πρωτεασωμικούς αναστολείς (Luo et al., 2017). Αυξημένα επίπεδα ερυθροποίησης επίσης παρατηρούνται και έπειτα από αιμόλυση, αιμορραγία (Koury, 2014) ή καταστάσεις υποξίας (Haase, 2013), υποδεικνύοντας την ενεργοποίηση συστημικών αποκρίσεων κατά την απώλεια της ομοιοδυναμικής στο περιφερικό αίμα και της λειτουργικότητας του μυελού των οστών. Με άλλα λόγια, κατά τη διάρκεια της θεραπείας εκτός από τις "τοπικές" κυτταρικές αποκρίσεις και οι συστημικές αποκρίσεις-μηχανισμοί πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν και να μελετώνται λεπτομερώς.

Παράλληλα, διαπιστώθηκε πως οι παρατηρήσεις μας σε ασθενείς με πολλαπλούν μυέλωμα σε μεγάλο βαθμό επιβεβαιώνουν τα ευρήματα στο μοντέλο της *Drosophila melanogaster* (Tsakiri et al., 2013b), υποδηλώνοντας ότι το μοντέλο αυτό αντιπροσωπεύει μια μοναδική *in vivo* πειραματική πλατφόρμα για τη μελέτη των ρυθμιστικών μονάδων του δικτύου πρωτεόστασης κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής γήρανσης, σε νόσους πρωτεωμικής αστάθειας καθώς και για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της

ασφάλειας φαρμάκων, όπως οι πρωτεασωμικοί αναστολείς (Cagan, 2016; Tsakiri et al., 2013b; Tsakiri et al., 2017).

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας προχωρήσαμε επίσης και στη μελέτη των επιπτώσεων της χορήγησης των θεραπευτικών αναστολέων στην καρδιά, αφού η καρδιοτοξικότητα αποτελεί μια από τις πιο σοβαρές παρενέργειες της εφαρμογής τους στην κλινική θεραπευτική (Heckmann, et al., 2018). Τα δεδομένα μας έδειξαν ότι η στοχευμένη καταστολή της έκφρασης των καταλυτικών υπομονάδων του πρωτεασώματος στον καρδιακό ιστό, οδήγησε σε πρωτεωμική αστάθεια στην καρδιά με διαταραχή της μιτοχονδριακής και καρδιακής λειτουργίας.

Πιο αναλυτικά, δεδομένης της εξέλιξης των μιτοχονδρίων και της φυσικής απομόνωσης του περιεχομένου τους, οι μηχανισμοί μιτόστασης θεωρούνται από τους περισσότερους ερευνητές ανεξάρτητοι από το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος όσον αφορά στη ρύθμισή τους. Εν αντιθέσει με τη θεωρία αυτή, πρωτεωμικές αναλύσεις έχουν εντοπίσει πάνω από 100 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες που μπορούν να υποβληθούν σε ουβικιτινίωση (Jeon et al., 2007; Peng, et al., 2003), ενώ επιπλέον νεώτερες μελέτες δείχνουν ότι η δυσλειτουργία του πρωτεασώματος επηρεάζει τα δυναμικά και την κινητικότητα των μιτοχονδρίων, αφού μέσω αυτού αποικοδομούνται πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε αυτές τις διεργασίες (Gumeni and Trougakis, 2016; Tanaka et al., 2010). Προς αυτήν την κατεύθυνση λοιπόν, τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι η απώλεια της λειτουργίας του πρωτεασώματος στην καρδιά προκαλεί σοβαρή μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, όπως αποδεικνύεται από τη διαταραχή της μιτοχονδριακής αναπνοής, τη μείωση του αριθμού τους στα καρδιομυοκύτταρα καθώς και από την αύξηση των επιπέδων ROS στον καρδιακό ιστό. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται και από δεδομένα τα οποία κατέδειξαν ότι η δυσλειτουργία του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος προκαλεί σοβαρές διαταραχές στα μιτοχονδριακά δυναμικά, τα ενεργειακά επίπεδα του κυττάρου καθώς και στη δομή των μιτοχονδριακών cristae (Tsakiri et al., 2019). Σε συμφωνία με τα παραπάνω βρέθηκε ότι η στοχευμένη στον καρδιακό ιστό μειορρύθμιση της β1 (ενεργότητα κασπάσης) σε μικρότερο βαθμό, και της β5 (ενεργότητα χυμοθρυψίνης) υπομονάδας σε μεγαλύτερο, οδήγησε σε μείωση της έκφρασης των μιτοχονδριακών γονιδίων, όπως του κύριου ρυθμιστή της μιτοχονδριακής βιογένεσης *PGC1-α*, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στον ενεργειακό μεταβολισμό (Dorn et al., 2015; Valero, 2014). Μειωμένο εμφανίσθηκε επίσης στα RNAi έντομα και το προφίλ της έκφρασης των γονιδίων *Pink1/park*, τα οποία εμπλέκονται στον έλεγχο της μιτοχονδριακής λειτουργίας (μιτόσταση), αναγνωρίζοντας τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια και στοχεύοντάς τα προς

αποικοδόμηση μέσω της επιλεκτικής μορφής αυτοφαγίας που ονομάζεται μιτοφαγία. Συμπερασματικά, τα *Prosβ1*^{RNAi} και *Prosβ5*^{RNAi} έντομα όχι μόνο εμφανίζουν μειωμένο αριθμό μιτοχονδρίων στον καρδιακό ιστό (εξαιτίας της ελαττωμένης έκφρασης του γονιδίου *PGC1-α*), αλλά και τα λίγα οργανίδια που παράγονται πιθανώς είναι μη λειτουργικά. Συνοψίζοντας, είναι λογικό να θεωρήσουμε ότι η λειτουργία ενός οργάνου σαν την καρδιά, στο οποίο το μιτοχόνδριο αποτελεί οργανίδιο κρίσιμης σημασίας, εξαρτάται άμεσα από την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεόστασης και μιτόστασης (Gumeni and Trougakos, 2016; Tsakiri et al., 2019).

Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος είναι επίσης ιδιαίτερα σημαντικό στο όργανο αυτό, πέρα από τη διατήρηση της ομαλής μιτοχονδριακής λειτουργίας, και για το λόγο ότι τα καρδιομυοκύτταρα είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε πρωτεϊνικές βλάβες εξαιτίας του συνεχούς μηχανικού και μεταβολικού στρες (Patterson et al., 2007; Wang and Robbins, 2006). Επιπλέον, η καρδιά έχει πολύ περιορισμένη ικανότητα αυτοανανέωσης, που σημαίνει ότι ο κυτταρικός θάνατος, που μπορεί να είναι συνέπεια της μειωμένης λειτουργίας του πρωτεασώματος, είναι εξαιρετικά επιβλαβής για την υγεία του οργάνου (Patterson et al., 2007; Wang, 2013). Η σημασία της ομαλής λειτουργίας του πρωτεασώματος στην καρδιά τονίζεται και από το γεγονός ότι η μερική πρωτεασωμική αναστολή είναι επαρκής για να προκαλέσει καρδιακή δυσλειτουργία σε υγιείς χοίρους (Herrmann et al., 2013), ενώ η παρατηρηθείσα συσσώρευση των ουβικιτινιωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών στον καρδιακό ιστό έχει συνδεθεί στο παρελθόν με καρδιακές διαταραχές όπως διαφόρων τύπου καρδιομυοπάθειες (Gilda and Gomes, 2017).

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η καρδιά στο έντομο *Drosophila melanogaster* δεν έχει ως ρόλο τη μεταφορά οξυγόνου διότι δε διαθέτει εξειδικευμένα κύτταρα, αλλά στόχος της είναι η κάλυψη όλων των ιστών του σώματος με θρεπτικά στοιχεία, μεταβολίτες και διάφορες ορμόνες μέσω της αιμολέμφου. Συνεπώς, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ανεξάρτητα από τις υψηλές απαιτήσεις για αυξημένη πρωτεολυτική δράση κατά τα στάδια της μορφογένεσης και ανάπτυξης, η διαταραχή που παρατηρείται στην ανάπτυξη των εντόμων οφείλεται και στη δυσκολία της καρδιάς του εντόμου να αντλήσει την αιμολέμφο προς το υπόλοιπο σώμα.

Η παρούσα ΔΔ προσθέτει σημαντικές επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την ανάδειξη θεραπευτικών παρεμβάσεων για τη μείωση της καρδιοτοξικότητας, η οποία σχετίζεται με τη μερική αναστολή της πρωτεασωμικής λειτουργίας στον καρδιακό ιστό (Heckmann, et al., 2018). Ειδικότερα και σε συμφωνία με τις παραπάνω υποθέσεις διαπιστώθηκε πως η επαγωγή της *Atg8a/LC3* στον καρδιακό ιστό, πρωτεΐνης με κάρριο ρόλο

στο σχηματισμό των αυτοφαγοσωμάτων κατά την έναρξη της αυτοφαγικής διαδικασίας, κατέστησε πιο ήπια, την προκαλούμενη από την πρωτεασωματική δυσλειτουργία, καρδιοτοξικότητα. Τα ευρήματά μας έδειξαν βελτίωση του μιτοχονδριακού αριθμού και λειτουργίας στον καρδιακό ιστό, υποδεικνύοντας τον καρδιοπροστατευτικό ρόλο του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος σε καταστάσεις πρωτεωμικής αστάθειας. Ο ρόλος αυτός του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος φαίνεται πως σχετίζεται πιθανώς με την αυξημένη απομάκρυνση των κατεστραμμένων μιτοχονδρίων μέσω της αυτοφαγίας και αντικατάστασή τους από νέα μιτοχόνδρια. Το γεγονός αυτό φάνηκε από την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *PGC1-α*, έπειτα από την υπερέκφραση της *Atg8α* αυτοφαγικής πρωτεΐνης. Τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζονται και από μελέτες, οι οποίες έδειξαν ότι σε καταστάσεις αυξημένων επιπέδων αυτοφαγίας όπως σε περιόδους νηστείας, το κύτταρο ρυθμίζει τον αριθμό των μιτοχονδρίων του επάγοντας τη μιτοχονδριακή βιογένεση μέσω της έκφρασης του *PGC-1α* (Lee, et al., 2008).

Αφού διαπιστώθηκε η επίδραση της αποσιώπησης των υπομονάδων β1 και β5 στη μιτοχονδριακή λειτουργία ελέγχθηκε αν και η χορήγηση πρωτεασωματικών αναστολέων παράγει παρόμοια αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό, έγινε χορήγηση των δύο πρωτεασωματικών αναστολέων BTZ και CFZ, που χρησιμοποιούνται στην κλινική θεραπευτική, σε έντομα *Drosophila melanogaster* για χρονικό διάστημα 14 ημερών. Αρχικά αποκαλύφθηκε ότι η χορήγηση BTZ και σε λίγο μεγαλύτερο βαθμό του CFZ (κύρια παρενέργεια του οποίου είναι η καρδιοτοξικότητα) μείωσε τα επίπεδα ενεργότητας χυμοθρυψίνης στην καρδιά περισσότερο εν συγκρίσει με ολόκληρο το σώμα. Σε συμφωνία, δεδομένα από τον FDA δεικνύουν ότι η καρδιοτοξική δράση του θεραπευτικού πρωτεασωματικού αναστολέα CFZ ευθύνεται σε αυξημένη συσσώρευση του φαρμάκου στην καρδιά (Heckmann et al., 2018). Η συσσώρευση αυτή οδηγεί σε μεγαλύτερου βαθμού αναστολή της 20S ενεργότητας χυμοθρυψίνης στα καρδιομυοκύτταρα, σε σχέση με τα μυελωματικά κύτταρα-στόχο. Συγκεκριμένα, φαίνεται πως το CFZ μειώνει την ενεργότητα χυμοθρυψίνης στο 10% στα καρδιακά κύτταρα και στο 45% στα κύτταρα μυελού των οστών 5 λεπτά μετά τη χορήγησή του (Heckmann et al., 2018).

Διαπιστώθηκε επίσης πως τα ευρήματα στο φαρμακολογικό μοντέλο χορήγησης των θεραπευτικών πρωτεασωματικών αναστολέων επιβεβαιώνουν τις παρατηρήσεις μας στο γενετικό μοντέλο αποσιώπησης των πρωτεασωματικών υπομονάδων, υπογραμμίζοντας και σε αυτήν την περίπτωση τη μεγάλη σημασία που έχει στην καρδιακή λειτουργία η επικοινωνία του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος με τους μηχανισμούς μιτόστασης. Αν και οι περισσότερες μελέτες σχετικά με την καρδιοτοξική δράση των

πρωτεασωμικών αναστολέων επικεντρώνονται αποκλειστικά στη λειτουργία του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και στο πως η απορρύθμισή του οδηγεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, η παρούσα μελέτη παρουσιάζει νέα δεδομένα σχετικά με τις άμεσες συνέπειες που έχει η πρωτεασωμική δυσλειτουργία στη λειτουργία των μιτοχονδρίων στην καρδιά. Συγκεκριμένα, είδαμε πως και οι δύο αναστολείς και στα τρία διαφορετικά στελέχη που εφαρμόστηκαν (W^{1118} ; $Lamp1^{GFP}/Gal4^{TnC}$; $Mito^{GFP}$, $Gal4^{MEF2}$) προκάλεσαν τον ίδιο φαινότυπο με μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων στον καρδιακό ιστό, βραδυκαρδία και άρρυθμο καρδιακό παλμό. Συνδυάζοντας λοιπόν τις παρατηρήσεις μας αυτές και τα δεδομένα μας από το γενετικό μοντέλο μπορούμε να συμπεράνουμε την ύπαρξη ενός κοινού μηχανισμού σχετικά με τις επιπτώσεις της πρωτεασωμικής δυσλειτουργίας στη μιτοχονδριακή λειτουργία, η οποία οδηγεί και αυτή με τη σειρά της σε καρδιακή δυσλειτουργία. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, τα ευρήματα από τη μελέτη της καρδιακής λειτουργίας των εντόμων έπειτα από μερική αναστολή της πρωτεασωμικής ενεργότητας πιθανώς προτείνουν μια μηχανιστική εξήγηση της καρδιοτοξικότητας που προκαλούν οι πρωτεασωμικοί αναστολείς στην κλινική εφαρμογή, αφού παρατηρήθηκε τόσο στο γενετικό όσο και στο φαρμακολογικό μοντέλο, αργυρυθμία και μείωση του αριθμού των καρδιακών χτύπων, η οποία ενδεχομένως να οφείλεται σε αδυναμία του καρδιακού μυός να επιτελέσει τη λειτουργία του (καρδιακή ανεπάρκεια).

Σε συνέχεια των πειραμάτων μας προχωρήσαμε στη χορήγηση MET σε έντομα, τα οποία λαμβάνουν θεραπευτικούς αναστολείς πρωτεασώματος. Πρόκειται για φάρμακο που χρησιμοποιείται στη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη τύπου II, με πιθανή καρδιοπροστατευτική δράση (Efentakis et al., 2019; Varjabedian et al., 2018) και σύμφωνα με τα δεδομένα μας αντέστρεψε το φαινότυπο που προκλήθηκε από τη χορήγηση των πρωτεασωμικών αναστολέων, αυξάνοντας τον αριθμό και τη λειτουργία των μιτοχονδρίων στον καρδιακό ιστό και βελτιώνοντας γενικότερα την καρδιακή λειτουργία των εντόμων. Υποθέτουμε ότι η βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας οφείλεται στη συμμετοχή του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσώματος, το οποίο όπως φαίνεται και από τα ευρήματά μας επάγεται έπειτα από τη χορήγηση MET. Η MET χαρακτηρίζεται σαν ενεργοποιητής της αυτοφαγίας μέσω επαγωγής της κινάσης AMPK (Efentakis et al., 2019; Karnewar et al., 2018; Wang et al., 2017), η οποία φαίνεται πως επάγει την έκφραση του γονιδίου *PGC1-α* στα καρδιομυοκύτταρα (Gundewar et al., 2009; Karnewar et al., 2018). Σε συμφωνία με τα παραπάνω είδαμε πως τα έντομα στα οποία χορηγήθηκε MET εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα του γονιδίου *PGC1-α* (όπως και στην περίπτωση της υπερέκφρασης της *Atg8a*) στον καρδιακό ιστό. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με την επαγωγή του μονοπατιού

αυτοφαγίας-λυσosώματος, υποδηλώνει και στην περίπτωση της φαρμακολογικής παρέμβασης, το γεγονός ότι η βελτίωση της ποιότητας και του αριθμού των μιτοχονδρίων επιτεύχθηκε από την αποκατάσταση της μιτόστασης στο καρδιομυοκύτταρο. Συμπερασματικά, η λειτουργία των μιτοχονδρίων και κατ' επέκταση της καρδιάς ρυθμίζεται από την ισορροπία μεταξύ βιογένεσης και μιτοφαγίας, μιας διαδικασίας μέσω της οποίας τα κατεστραμμένα μιτοχόνδρια υποβάλλονται σε αυτοφαγική αποικοδόμηση (Rambold and Lippincott-Schwartz, 2011).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί επίσης το γεγονός ότι ενώ η MET θεωρείται ήπιος αναστολέας του συμπλόκου I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, τα έντομα τα οποία αναπτύχθηκαν σε τροφή με MET (επίσης για 14 ημέρες) παρουσίασαν αυξημένη μιτοχονδριακή αναπνευστική ικανότητα σε σχέση με τα έντομα μάρτυρες, κάτι που παρατηρήθηκε και μετά τη συγχορήγηση MET με CFZ ή BTZ εν συγκρίσει με τα έντομα τα οποία αναπτύσσονται μόνο παρουσία πρωτεασωμικών αναστολέων. Φαίνεται πως η προκαλούμενη από τη MET αναστολή του συμπλόκου I έχει μοναδικά χαρακτηριστικά. Μεταξύ αυτών, ένα από τα πιο ιδιαίτερα αφορά στη συγκέντρωση της MET (Fontaine, 2018). Ειδικότερα, στις περισσότερες έρευνες τα πειράματα σε απομονωμένα σύμπλοκα I ή μιτοχόνδρια πραγματοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις της τάξης των mM, ενώ τα επίπεδα στο πλάσμα όταν χορηγείται σε θεραπευτικές δόσεις παραμένουν στο εύρος των μΜ, τόσο σε μελέτες σε ανθρώπους όσο και σε ζώα, υπογραμμίζοντας ότι η συγκέντρωση της MET είναι καίριας σημασίας (Higgins et al., 2012; Karnewar et al., 2018; Wang et al., 2002). Παράλληλα, και προς υποστήριξη των ευρημάτων μας έχει φανεί πως πέρα από τη συγκέντρωση της MET, σημαντικό ρόλο στη δράση της ως αναστολέα του συμπλόκου I παίζει και το διάστημα χορήγησής της. Συγκεκριμένα, η MET σε μία δόση προκάλεσε αναστολή του ρυθμού μιτοχονδριακής κατανάλωσης οξυγόνου (mitochondrial oxygen consumption rate, OCR) και μειωμένα επίπεδα ATP σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Αντίθετα, η χρόνια θεραπεία με MET είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του OCR και των επιπέδων ATP λόγω της ενίσχυσης των μιτοχονδριακών συμπλόκων II και IV, παρακάμπτοντας έτσι την ανασταλτική επίδραση στο συμπλόκο I (Karnewar et al., 2018). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με άλλη πρόσφατη μελέτη, η οποία έδειξε, ότι ενώ η σύντομη χορήγηση MET προκάλεσε ήπια αναστολή της ενεργότητας του συμπλόκου I, η μακροπρόθεσμη έκθεση σε MET σχετίζεται με οφέλη, συμπεριλαμβανομένου του μειωμένου οξειδωτικού στρες και της αυξημένης αντιοξειδωτικής άμυνας (Gonzalez-Barroso et al., 2012; Martin-Montalvo et al., 2013). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι η προσαρμογή των ενδοθηλιακών κυττάρων στη παρατεταμένη χορήγηση MET είναι σημαντική για την

ευεργετική δράση της στη μιτοχονδριακή βιογένεση και λειτουργία και κατ'επέκτασιν στην εκδήλωση της καρδιοπροστατευτικής της ιδιότητας. Συμπερασματικά, η μη βελτίωση της μακροβιότητας των εντόμων όταν αυτά αναπτύχθηκαν σε συγκέντρωση 5mM (μεγαλύτερη συγκέντρωση) MET παρουσία BTZ, σε σχέση με τα έντομα που αναπτύχθηκαν μόνο σε BTZ ή CFZ, πιθανώς να οφείλεται στην εξάρτηση της δράσης της MET από τη συγκέντρωση χορήγησης.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω και δεδομένου ότι οι πρωτεασωματικές ενεργότητες μειώνονται σε φυσιολογικούς ιστούς κατά τη διάρκεια της γήρανσης, αναμένεται και η τοξικότητα των πρωτεασωματικών αναστολέων να αυξάνεται σημαντικά σε ηλικιωμένους ασθενείς, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και στην κλινική πράξη. Ταυτόχρονα, τα δεδομένα μας υπογραμμίζουν την αναγκαιότητα προσαρμογής της θεραπευτικής δόσης των πρωτεασωματικών αναστολέων, όχι απλά χορηγώντας τους σε δόσεις ανά επιφάνεια σώματος (mg/m^2), αλλά ελέγχοντας επίσης τα επίπεδα μείωσης των πρωτεασωματικών ενεργοτήτων έπειτα από κάθε χορήγηση, με τη χρήση μη επεμβατικών μεθόδων (σε κύτταρα περιφερικού αίματος). Στόχος είναι η επίτευξη της βέλτιστης απόκρισης των ασθενών με πολλαπλούν μυέλωμα στη θεραπεία, από την οποία πέρα από τα οφέλη που προσφέρει δε λείπουν σημαντικές παρενέργειες, όπως περιφερική νευροπάθεια και καρδιοτοξικότητα.

Επιπλέον, στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα ΔΔ αναδεικνύει τον καρδιοπροστατευτικό ρόλο της MET έναντι των πρωτεασωματικών αναστολέων, μέσω βελτίωσης της λειτουργίας των μιτοχονδρίων που προέκυψε όταν ενεργοποιήθηκε η αυτοφαγία. Η συμμετοχή του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσosώματος στην αύξηση της ποιότητας και του αριθμού των μιτοχονδρίων επιβεβαιώθηκε και έπειτα από τη συγχορήγηση RAP με πρωτεασωματικούς αναστολείς. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν παρόλα αυτά και το γεγονός ότι το πολλαπλούν μυέλωμα αποτελεί μια νόσο πρωτεωμικής αστάθειας και ότι η θεραπεία με αναστολείς πρωτεασώματος βασίζεται σε αυτό. Για το λόγο αυτό και παρόλο που τα πειραματικά μας δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ανασταλτική ικανότητα τόσο του BTZ όσο και του CFZ δεν επηρεάζεται από την προσθήκη MET, θα πρέπει να διεξαχθούν κλινικές μελέτες σε μεγάλο δείγμα ασθενών, με στόχο την εύρεση των κατάλληλων συγκεντρώσεων ώστε ούτε οι ιδιότητες της MET να μη μείνουν ανεκμετάλλευτες, αλλά ούτε και να αναιρεθεί η αντινεοπλασματική δράση των θεραπευτικών πρωτεασωματικών αναστολέων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, J. 2004. The Proteasome in Cell-Cycle Regulation. In: Adams, J. (eds) Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy. Cancer Drug Discovery and Development. Humana Press, Totowa, NJ. pp 77-84.
- Agarwal, A., Ghobrial, I.M. 2013. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: a review of the current understanding of epidemiology, biology, risk stratification, and management of myeloma precursor disease. 19, 985–94.
- Ahmad, S.M. 2017. Conserved signaling mechanisms in *Drosophila* heart development. Dev Dyn. 2469, 641-56.
- Akasaka, T., Klinedienst, S., Occor, K., Bustamante, E.L., Kim, S.,K., Bodmer, R. 2006. The ATP-sensitive potassium (KATP) channel-encoded dSUR gene is required for *Drosophila* heart function and is regulated by tinman. PNAS. 103, 11999–12004.
- Alsina, M., Trudel, S., Furman, R.R., Rosen, P.J., O'Connor, O.A., Comenzo, R.L., Wong, A., Kunkel, L.A., Molineaux, C.J., Goy, A. 2012. A phase I single-agent study of twice-weekly consecutive-day dosing of the proteasome inhibitor carfilzomib in patients with relapsed or refractory multiple myeloma or lymphoma. Clin Cancer Res. 18, 4830-40.
- Amerik, A.Y., Hochstrasser, M. 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. Biochim Biophys Acta. 1695, 189–207.
- Arastu-Kapur, S., Anderl, J.L., Kraus, M., Parlati, F., Shenk, K.D., Lee, S.J., Muchamuel, T., Bennett, M.K., Driessen, C., Ball, A.J., Kirk, C.J. 2011. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. Clin Cancer Res. 17, 2734-43.
- Arendt, C.S., Hochstrasser, M. 1997. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. Proc. Natl. Acad.Sci. USA. 94, 7156-61.
- Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Trougkos, I.P., Skaltsounis, A.L. 2013. Natural compounds with anti-aging activity. Nat. Prod. Rep. 30, 1412-37.
- Armstrong, E.J., Bischoff, J. 2004. Heart valve development: Endothelial cell signaling and differentiation. Circ. Res. 95, 459–70.
- Asensio-Lopez, M.C., Lax, A., Pascual-Figal, D.A., Valdes, M. Sanchez-Mas, J. 2011. Metformin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity: involvement of the adiponectin cardiac system. Free Radic Biol Med. 51, 1861-71.
- Ashour, A. E., Sayed-Ahmed, M. M., Abd-Allah, A. R., Korashy, H. M., Maayah, Z. H., Alkhalidi, H., Mubarak, M., Alhaider, A. 2012. Metformin rescues the myocardium from doxorubicin-induced energy starvation and mitochondrial damage in rats. Oxidative medicine and cellular longevity. 434195.
- Avet-Loiseau, H., Attal, M., Campion, L., Caillot, D., Hulin, C., Marit, G., Stoppa, A.M., Voillat, L., Wetterwald, M., Pegourie, B., Voog, E., Tiab, M., Banos, A., Jaubert, J., Bouscary, D., Macro, M., Kolb, B., Traulle, C., Mathiot, C., Magrangeas, F., Minvielle, S., Facon, T., Moreau, P. 2012. Long-term analysis of the IFM 99 trials for myeloma: cytogenetic abnormalities [t(4;14), del(17p), 1q gains] play a major role in defining long-term survival. J Clin Oncol. 30, 1949-52.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., Ktistakis, N.T. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. J. Cell Biol. 182, 685–701.
- Baba, M., Osumi, M., Scott, S.V., Klionsky, D.J., Ohsumi, Y. 1997. Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. J. Cell Biol. 139, 1687–95.
- Badros, A., Burger, A.M., Philip, S., Niesvizky, R., Kolla, S.S., Goloubeva, O., Harris, C., Zwiebel, J., Wright, J.J., Espinoza-Delgado, I., Baer, M.R., Holleran, J.L., Egorin, M.J., Grant, S. 2009. Phase I study of vorinostat in combination with bortezomib for relapsed and refractory multiple myeloma. Clin Cancer Res. 15, 5250-7.

- Baker, M.J., Tatsuta, T., Langer, T. 2011. Quality control of mitochondrial proteostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3, a007559.
- Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., Kelly, J.W. 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science.* 319, 916-9.
- Barlogie, B., Shaughnessy, J., Tricot, G., Jacobson, J., Zangari, M., Anaissie, E., Walker, R., Crowley, J. 2004. Treatment of multiple myeloma. *Blood.* 103, 20-32.
- Barton, L.F., Cruz, M., Rangwala, R., Deepe, G.S. Jr., Monaco J.J. 2002. Regulation of immunoproteasome subunit expression *in vivo* following pathogenic fungal infection. *J. Immunol.* 169, 3046-52.
- Bataillé, L., Frendo, J.L., Vincent, A. 2015. Hox control of *Drosophila* larval anatomy; The alary and thoracic alary-related muscles. *Mech. Dev.* 138, 170–6.
- Benjamin, E.J., Blaha, M.J., Chiuve, S.E., Cushman, M., Das, S.R., Deo, R., de Ferranti, S.D., Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C.R., Jiménez, M.C., Jordan, L.C., Judd, S.E., Lackland, D., Lichtman, J.H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C.T., Mackey, R.H., Matsushita, K., Mozaffarian, D., Mussolino, M.E., Nasir, K., Neumar, R.W., Palaniappan, L., Pandey, D.K., Thiagarajan, R.R., Reeves, M.J., Ritchey, M., Rodriguez, C.J., Roth, G.A., Rosamond, W.D., Sasson, C., Towfighi, A., Tsao, C.W., Turner, M.B., Virani, S.S., Voeks, J.H., Willey, J.Z., Wilkins, J.T., Wu, J.H., Alger, H.M., Wong, S.S., Muntner, P. 2017. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 135, 146-603.
- Benjamin, E.J., Virani, S.S., Callaway, C.W., Chamberlain, A.M., Chang, A.R., Cheng, S., Chiuve, S.E., Cushman, M., Delling, F.N., Deo, R., de Ferranti, S.D., Ferguson, J.F., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C.R., Jiménez, M.C., Jordan, L.C., Judd, S.E., Lackland, D., Lichtman, J.H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C.T., Lutsey, P.L., Mackey, J.S., Matchar, D.B., Matsushita, K., Mussolino, M.E., Nasir, K., O'Flaherty, M., Palaniappan, L.P., Pandey, A., Pandey, D.K., Reeves, M.J., Ritchey, M.D., Rodriguez, C.J., Roth, G.A., Rosamond, W.D., Sampson, U.K.A., Satou, G.M., Shah, S.H., Spartano, N.L., Tirschwell, D.L., Tsao, C.W., Voeks, J.H., Willey, J.Z., Wilkins, J.T., Wu, J.H., Alger, H.M., Wong, S.S., Muntner, P. 2018. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 137, 67–492.
- Bennett, M.K., Kirk, C.J. 2008. Development of proteasome inhibitors in oncology and autoimmune diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 1, 616-25.
- Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., Zhan, F., Sawyer, J., Barlogie, B., Shaughnessy, J.Jr. 2005. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood.* 106, 296-303.
- Bianchi, G., Oliva, L., Cascio, P., Pengo, N., Fontana, F., Cerruti, F., Orsi, A., Pasqualetto, E., Mezghrani, A., Calbi, V., Palladini, G., Giuliani, N., Anderson, K.C., Sitia, R., Cenci, S. 2009. The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood.* 113, 3040-9.
- Bishopric, N.H. 2005. Evolution of the heart from bacteria to man. *Ann N Y Acad Sci.* 1047, 13–29.
- Blom, J.A. 2003. Monitoring of Respiration and Circulation. CRC Press. p. 27.
- Bodmer, R. 1993. The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development.* 118, 719–29.
- Brewer, J.W., Diehl, J.A. 2000. PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci.* 97, 12625–30.
- Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R.Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M. C., Hendil, K.B., Tanaka, K., Dyson, J., Rivett, J. 2000. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *The Biochemical journal.* 346. 1, 155–61.
- Bunt, S., Hooley, C., Hu, N., Scahill, C., Weavers, H., Skaer, H. 2010. Hemocyte-secreted type IV collagen enhances BMP signaling to guide renal tubule morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell.* 19, 296-306.
- Cagan, R. 2016. Drug screening using model systems: some basics. *Dis Model Mech.* 9, 1241-4.

- Calvert, J.W., Gundewar, S., Jha, S., Greer, J.J., Bestermann, W.H., Tian, R., Lefer, D.J. 2008. Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. *Diabetes*. 57, 696-705.
- Cenci, S., Mezghrani, A., Cascio, P., Bianchi, G., Cerruti, F., Fra, A., Sitia, R. 2006. Progressively impaired proteasomal capacity during terminal plasma cell differentiation. *The EMBO journal*. 25, 1104-13.
- Cengiz Seval, G., Beksac, M. 2018. The safety of bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Drug Saf*. 17, 953-62.
- Chauhan, D., Li, G., Shringarpure, R., Podar, K., Ohtake, Y., Hideshima, T., Anderson, K.C. 2003. Blockade of Hsp27 overcomes Bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 resistance in lymphoma cells. *Cancer Res*. 63, 174-7.
- Chen-Scarabelli, C., Corsetti, G., Pasini, E., Dioguardi, F.S., Sahni, G., Narula, J., Gavazzoni, M., Patel, H., Saravolatz, L., Knight, R., Raddino, R., Scarabelli, T. M. 2017. Spasmogenic Effects of the Proteasome Inhibitor Carfilzomib on Coronary Resistance, Vascular Tone and Reactivity. *EBioMedicine*. 21, 206-12.
- Chesi, M., Nardini, E., Brents, L.A., Schröck, E., Ried, T., Kuehl, W.M., Bergsagel, P.L. 1997. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet*. 16, 260-4.
- Chiao, Y.A., Kolwicz, S.C., Basisty, N., Gagnidze, A., Zhang, J., Gu, H., Djukovic, D., Beyer, R.P., Raftery, D., MacCoss, M., Tian, R., Rabinovitch, P.S. 2016. Rapamycin transiently induces mitochondrial remodeling to reprogram energy metabolism in old hearts. *Aging*. 8, 314-27.
- Chiecchio, L., Dagrada, G.P., Ibrahim, A.H., Dachs Cabanas, E., Protheroe, R.K., Stockley, D.M., Orchard, K.H., Cross, N.C., Harrison, C.J., Ross, F.M., UK Myeloma Forum. 2009. Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica*, 94, 1708-13.
- Choma, M.A., Suter, M.J., Vakoc, B.J., Bouma, B.E., Tearney, G.J. 2010. Heart wall velocimetry and exogenous contrast-based cardiac flow imaging in *Drosophila melanogaster* using Doppler optical coherence tomography. *J Biomed Opt*. 15, 056020.
- Chondrogianni, N., Stratford, F.L., Trougakos, I.P., Friguet, B., Rivett, A.J., 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.
- Ciechanover, A., Orian, A., Schwartz, A.L. 2000. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem*. 34, 40-51.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., Perales-Clemente, E., Salvati, L., Fernandez-Silva, P., Enriquez, J.A., Scorrano, L. 2013. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*. 155, 160-71.
- Cui, Z., Scruggs, S.B., Gilda, J.E., Ping, P., Gomes, A.V. 2014. Regulation of cardiac proteasomes by ubiquitination, SUMOylation, and beyond. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 71, 32-42.
- Das, D., Aradhya, R., Ashoka, D., Inamdar, M. 2008. Post-embryonic pericardial cells of *Drosophila* are required for overcoming toxic stress but not for cardiac function or adult development. *Cell Tissue Res*. 331, 565-70.
- Davis, B.J., Xie, Z., Viollet, B., Zou, M.H. 2006. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis *in vivo* by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes*. 55, 496-505.
- Day, S.M. 2013. The ubiquitin proteasome system in human cardiomyopathies and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 304, H1283-93.
- de Jong, M.C., Slootstra, J.W., Scheffer, G.L., Schroeijers, A.B., Puijk, W.C., Dinkelberg, R., Kool, M., Broxterman, H.J., Muelen, R.H., Scheper, R.J. 2001. Peptide transport by the multidrug resistance protein MRP1. *Cancer Res*. 61, 2552-7.

- Demchenko, Y.N., Glebov, O.K., Zingone, A., Keats, J.J., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M. 2010. Classical and/or alternative NF-kappaB pathway activation in multiple myeloma. *Blood*. 115, 3541-52.
- Demo, S.D., Kirk, C.J., Aujay, M.A., Buchholz, T.J., Dajee, M., Ho, M.N., Jiang, J., Laidig, G.J., Lewis, E.R., Parlati, F., Shenk, K.D., Smyth, M.S., Sun, C.M., Vallone, M.K., Woo, T.M., Molineaux, C.J., Bennett, M.K. 2007. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res*. 67, 6383-91.
- Dephoure, N., Hwang, S., O'Sullivan, C., Dodgson, S.E., Gygi, S.P., Amon, A., Torres, E.M. 2014. Quantitative proteomic analysis reveals posttranslational responses to aneuploidy in yeast. *Elife*. 29, 3, e03023
- Deshaies, R. J. 2014. Proteotoxic Crisis, the Ubiquitin-Proteasome System, Cancer Therapy. *BMC Biology*. 12, 1–14.
- Dimopoulos, M.A., Moreau, P., Palumbo, A., Joshua, D., Pour, L., Hájek, R., Facon, T., Ludwig, H., Oriol, A., Goldschmidt, H., Rosiñol, L., Straub, J., Suvorov, A., Araujo, C., Rimashevskaya, E., Pika, T., Gaidano, G., Weisel, K., Goranova-Marino, V., Schwarzer, A., Minuk, L., Masszi, T., Karamanesht, I., Offidani, M., Hungria, V., Spencer, A., Orłowski, R.Z., Gillenwater, H.H., Mohamed, N., Feng, S., Chng, W.J. 2016. ENDEAVOR Investigators. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol*. 17, 27-38.
- Ding, W.X., Yin, X.M. 2012. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis, *Biol. Chem*. 393, 547–64.
- Dorn, G.W., Vega, R.B., Kelly, D.P. 2015. "Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart". *Genes Dev*. 29, 1981–91.
- Drechsler, M., Schmidt, A., Paululat, A. 2013. The ADAMTS-like protein Lonely heart mediates fibrillar Pericardin matrix formation essential for cardiac integrity in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*. 9, e1003616.
- Dulcis, D., Levine, R.B. 2003. Innervation of the heart of the adult fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol*. 4654, 560–78
- Dulcis D, Levine RB. 2005. Glutamatergic innervation of the heart initiates retrograde contractions in adult *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci*. 25, 271-80.
- Efentakis, P., Kremastiotis, G., Varela, A., Nikolaou, P.E., Papanagnou, E.D., Davos, C.H., Tsoumani, M., Agrogiannis, G., Konstantinidou, A., Kastiris, E., Kanaki, Z., Iliodromitis, E.K., Klinakis, A., Dimopoulos, M.A., Trougakos, I.P., Andreadou, I., Terpos, E. 2019. Molecular mechanisms of carfilzomib-induced cardiotoxicity in mice and the emerging cardioprotective role of metformin. *Blood*. 133, 710-23.
- Eskelinen, E.L. 2019. Autophagy: Supporting cellular and organismal homeostasis by self-eating. *Int J Biochem Cell Biol*. 111, 1-10.
- FDA: 202714Orig1s000 MEDICAL REVIEW(s) Section 4.3
- FDA: 202714Orig1s000 PHARMACOLOGY REVIEW
- Field-Smith A., Morgan G.J., Davies F.E. Bortezomib (Velcade TM) in the treatment of multiple myeloma. 2006. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2, 271-9.
- Fontaine, E. 2018. Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Frontiers in endocrinology*. 9, 753.
- Fontbonne., A., Diouf, I., Baccara-Dinet, M., Eschwege, E., Charles, M.A. 2009. Effects of 1-year treatment with metformin on metabolic and cardiovascular risk factors in non-diabetic upper-body obese subjects with mild glucose anomalies: a post-hoc analysis of the BIGPRO1 trial. *Diabetes Metab*. 35, 385–91.
- Förster, A., Masters, E.I., Whitby, F.G., Robinson, H., Hill, C.P. 2005. The 1.9 Å structure of a proteasome-11S activator complex and implications for proteasome-PAN/PA700 interactions. *Mol Cell*. 18, 589-99.
- Franz, A. Kevei, É., Hoppe, T. 2015. Double-edged alliance: mitochondrial surveillance by the UPS and autophagy, *Curr. Opin. Cell Biol*. 37, 18–27.

- Friguet, B., Szveda, L.I. 1997. Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal crosslinked protein. *FEBS Lett.* 405, 21-5.
- Fuchs, D., Berges, C., Opelz, G., Daniel, V., Naujokat, C. 2008. Increased expression and altered subunit composition of proteasomes induced by continuous proteasome inhibition establish apoptosis resistance and hyperproliferation of Burkitt lymphoma cells. *J Cell Biochem.* 103, 270-83.
- Galluzzi, L., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J.M., Cecconi, F., Choi, A.M., Chu, C.T., Codogno, P., Colombo, M.I., Cuervo, A.M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E.L., Fimia, G.M., Fulda, S., Gewirtz, D.A., Green, D.R., Hansen, M., Harper, J.W., Jaattela, M., Johansen, T., Juhasz, G., Kimmelman, A.C., Kraft, C., Ktistakis, N.T., Kumar, S., Levine, B., Lopez-Otin, C., Madeo, F., Martens, S., Martinez, J., Melendez, A., Mizushima, N., Munz, C., Murphy, L.O., Penninger, J.M., Piacentini, M., Reggiori, F., Rubinsztein, D.C., Ryan, K.M., Santambrogio, L., Scorrano, L., Simon, A.K., Simon, H.U., Simonsen, A., Tavernarakis, N., Tooze, S.A., Yoshimori, T., Yuan, J., Yue, Z., Zhong, Q., Kroemer, G. 2017. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 36, 1811–36.
- Gilda, J.E., Gomes, A.V. 2017. Proteasome dysfunction in cardiomyopathies. *J Physiol.* 595, 4051-71.
- Givvimani, S., Munjal, C., Tyagi, N., Sen, U., Metreveli, N., Tyagi, S.C. 2012. Mitochondrial division/mitophagy inhibitor (Mdivi) ameliorates pressure overload induced heart failure, *PLoS One.* 7, e32388.
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 221, 3-12.
- Glickman, M.H., Ciechanover, A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82, 373-428.
- Groen, K., van de Donk, N., Stege, C., Zweegman, S., Nijhof, I.S. 2019. Carfilzomib for relapsed and refractory multiple myeloma. *Cancer management and research.* 11, 2663–75.
- Gomes, A.V. 2013. Genetics of proteasome diseases. *Scientifica (Cairo).* 637629.
- González, D., van der Burg, M., García-Sanz, R., Fenton, J.A., Langerak, A.W., González, M., van Dongen, J.J., San Miguel, J.F., Morgan, G.J. 2007. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood.* 110, 3112-21.
- Gonzalez-Barroso, M.M., Anedda, A., Gallardo-Vara, E., Redondo-Horcajo, M., Rodriguez-Sanchez, L., Rial, E. 2012. Fatty acids revert the inhibition of respiration caused by the antidiabetic drug metformin to facilitate their mitochondrial beta-oxidation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1817, 1768–75.
- Graham, G.G., Punt, J., Arora, M., Day, R.O., Doogue, M.P., Duong, J.K., Furlong, T.J., Greenfield, J.R., Greenup, L.C., Kirkpatrick, C.M., Ray, J.E., Timmins, P., Williams, K.M. 2011. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* 50, 81–98.
- Grimm, S., Horlacher, M., Catalgol, B., Hoehn, A., Reinheckel, T., Grune, T. 2012. Cathepsins D and L reduce the toxicity of advanced glycation end products. *Free Radic. Biol Med.* 52, 1011-23.
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., Finley, D. 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1062-7.
- Groll, M., Clausen, T. 2003. Molecular shredders: how proteasomes fulfill their role. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 665-73.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., Huber, R. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* 386, 463-71.
- Grumati, P., Dikic, I., Stolz, A. 2018. ER-phagy at a glance, *J. Cell Sci.* 131.
- Grzybowska, M., Bober, J., Olszewska, M. 2011. Metformin—mechanisms of action and use for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 65, 277–85.
- Gumeni, S., Evangelakou, Z., Tsakiri, E.N., Scorrano, L., Trougakos, I.P. 2019. Functional wiring of proteostatic and mitostatic modules ensures transient organismal survival during imbalanced mitochondrial dynamics. *Redox Biol.* 24, 101219.
- Gumeni, S., Trougakos, I.P. 2016. CrossTalk of Proteostasis and Mitostasis in Cellular Homeodynamics, Ageing and Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 4587691

- Gundewar, S., Calvert, J.W., Jha, S., Toedt-Pingel, I., Ji, S.Y., Nunez, D., Ramachandran, A., Anaya-Cisneros, M., Tian, R., Lefer, D.J. 2009. Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circulation research*. 104, 403–11.
- Guo, J.Y., Xia, B., White, E. 2013. Autophagy-mediated tumor promotion. *Cell*. 155, 1216–9.
- Gustafsson, A.B., Gottlieb, R.A. 2003. Mechanisms of apoptosis in the heart, *J. Clin. Immunol.* 23, 447–59.
- Haase, V.H. 2013. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 27, 41–53.
- Hales, K.G., Korey, C.A., Larracuenta, A.M., Roberts, D.M. 2015. Genetics on the Fly: A Primer on the *Drosophila* Model System. *Genetics*. 201, 815–42.
- Hanke, N.T., Garland, L.L., Baker, A.F. 2016. Carfilzomib combined with suberanilohydroxamic acid (SAHA) synergistically promotes endoplasmic reticulum stress in non-small cell lung cancer cell lines. *J. Cancer Res Clin Oncol.* 142, 549–60.
- Hasinoff, B.B., Patel, D., Wu, X. 2017. Molecular Mechanisms of the Cardiotoxicity of the Proteasomal-Targeted Drugs Bortezomib and Carfilzomib. *Cardiovasc Toxicol.* 17, 237–50.
- Heckmann, M.B., Doroudgar, S., Katus, H.A., Lehmann, L.H. 2018. Cardiovascular adverse events in multiple myeloma patients. *Journal of thoracic disease*. 10, 4296–305.
- Helfand, S.L., Rogina, B. 2003. Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Genet.* 37, 329–48.
- Herrmann, J., Wohler, C., Saguner, A.M., Flores, A., Nesbitt, L.L., Chade, A., Lerman, L.O., Lerman, A. 2013. Primary proteasome inhibition results in cardiac dysfunction. *European journal of heart failure*. 15, 614–23.
- Hershko, A., Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–79.
- Hideshima, T., Mitsiades, C., Tonon, G., Anderson, K.C. 2007. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 7, 585–98.
- Hideshima, T., Qi, J., Paranal, R. M., Tang, W., Greenberg, E., West, N., Colling, M.E., Estiu, G., Mazitschek, R., Perry, J.A., Ohguchi, H., Cottini, F., Mimura, N., Görgün, G., Tai, Y.T., Richardson, P.G., Carrasco, R.D., Wiest, O., Schreiber, S.L., Anderson, K.C., Bradner, J.E. 2016. Discovery of selective small-molecule HDAC6 inhibitor for overcoming proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113, 13162–7.
- Higgins, J.W., Bedwell, D.W., Zamek-Gliszczynski, M.J. 2012. Ablation of both organic cation transporter (OCT)1 and OCT2 alters metformin pharmacokinetics but has no effect on tissue drug exposure and pharmacodynamics. *Drug Metab Dispos.* 40, 1170–7.
- Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., Murata, S. 2005. A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature*. 437, 1381–5.
- Höhn, A., Jung, T., Grimm, S., Catalgol, B., Weber, D., Grune, T. 2011. Lipofuscin inhibits the proteasome by binding to surface motifs. *Free Radic Biol Med.* 50, 585–91.
- Hohn, T.J., Grune, T. 2014. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part III-Redox regulation of the proteasomal system. *Redox Biol.* 2, 388–94.
- Hollfelder, D., Frasch, M., Reim, I. 2014. Distinct functions of the laminin β LN domain and collagen IV during cardiac extracellular matrix formation and stabilization of alary muscle attachments revealed by EMS mutagenesis in *Drosophila*. *BMC Dev. Biol.* 14, 31–9.
- Hurt, E.M., Wiestner, A., Rosenwald, A., Shaffer, A.L., Campo, E., Grogan, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., Staudt, L.M. 2004. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell*. 5, 191–9.
- Hyttinen, J.M., Amadio Viiri, M.J., Pascale, A., Salminen, A., Kaarniranta, K. 2014. Clearance of misfolded and aggregated proteins by autophagy and implications for aggregation diseases, *Ageing Res. Rev.* 18, 16–28.
- Ikeda, F., Crosetto, N., Dikic, I. 2010. What determines the specificity and outcomes of ubiquitin signaling? *Cell*. 143, 677–81.

- Imam, F., Al-Harbi, N.O., Al-Harbi, M.M., Qamar, W., Algerian, K., Belali, O.M., Alsanea, S., Alanazi, A.Z., Alhazzani, K. 2019. Apremilast ameliorates carfilzomib-induced pulmonary inflammation and vascular injuries. *Int Immunopharmacol.* 66, 260-6.
- Imam, F., Al-Harbi, N.O., Al-Harbia, M.M., Korashy, H.M., Ansari, M.A., Sayed-Ahmed, M.M., Nagi, M.N., Iqbal, M., Anwer, M.K., Kazmi, I., Afzal, M., Bahashwan, S. 2017. Rutin attenuates carfilzomib-induced cardiotoxicity through inhibition of NF- κ B, hypertrophic gene expression and oxidative stress. *Cardiovasc Toxicol.* 17, 58-66.
- Isoda, K., Young, J.L., Zirlik, A., Zirlik, A., MacFarlan, L.A., Tsuboi, N., Gerdes, N., Schönbeck, U., Libby, P. 2006. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26, 611–17.
- Ivy, J.R., Drechsler, M., Catterson, J.H., Bodmer, R., Ocorr, K., Paululat, A., Hartley, P.S. 2015. Klf15 is critical for the development and differentiation of *Drosophila* nephrocytes. *PLoS ONE* 10, e0134620
- Jagannath, S., Barlogie, B., Berenson, J.R., Siegel, D.S., Irwin, D., Richardson, P.G., Niesvizky, R., Alexanian, R., Limentani, S.A., Alsina, M., Esseltine, D.L., Anderson, K.C. 2008. Updated survival analyses after prolonged follow-up of the phase 2, multicenter CREST study of bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma. *Br J Haematol.* 143, 537-40.
- Jagla, K., Frasch, M., Jagla, T., Dretzen, G., Bellard, F., Bellard, M. 1997. Ladybird, a new component of the cardiogenic pathway in *Drosophila* required for diversification of heart precursors. *Development.* 124, 3471–9.
- Jain, S., Diefenbach, C., Zain, J., O'Connor, O.A. 2011. Emerging role of carfilzomib in treatment of relapsed and refractory lymphoid neoplasms and multiple myeloma. *Core evidence.* 6, 43–57.
- Jeon, H.B., Choi, E.S., Yoon, J.H., Hwang, J.H., Chang, J.W., Lee, E.K., Choi, H.W., Park, Z.Y., Yoo, Y.J. 2007. A proteomics approach to identify the ubiquitinated proteins in mouse heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 357, 731–6.
- Johnson, E., Sherry, T., Ringo, J., Dowse, H. 2002. Modulation of the cardiacpacemaker of *Drosophila*: cellular mechanisms. *J Comp Physiol.* 172, 227–36.
- Karnewar, S., Neeli, P.K., Panuganti, D., Kotagiri, S., Mallappa, S., Jain, N., Jerald, M.K., Kotamraju, S. 2018. Metformin regulates mitochondrial biogenesis and senescence through AMPK mediated H3K79 methylation: Relevance in age-associated vascular dysfunction. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1864, 1115-28.
- Kaushik, S., Cuervo, A.M. 2018. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 365–81.
- Kimura, H.J., Chen, C.Y., Tzou, S.C., Rocchi, R., Landek-Salgado, M.A., Suzuki, K., Kimura, M., Rose, N.R., Caturegli, P. 2009. Immunoproteasome overexpression underlies the pathogenesis of thyroid oncocytes and primary hypothyroidism: studies in humans and mice. *PLoS One* 4, e7857.
- Kisselev, A.F., van der Linden, W.A., Overkleeft, H.S. 2012. Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. *Chem Biol.* 19, 99-115.
- Klaips, C.L., Jayaraj, G.G., Hartl, F.U. 2017. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *The Journal of cell biology.* 217, 51–63.
- Komander, D. 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans.* 37, 937-53.
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T, Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., Yamamoto, M. 2010. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor NRF2 through inactivation of keap1. *Nat Cell Biol.* 2010. 12, 213-23.
- Koury, M.J. 2014. Abnormal erythropoiesis and the pathophysiology of chronic anemia. *Blood Rev.* 28, 49-66.
- Kubiczkova, L., Pour, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., Sevcikova, S. P. 2014. Proteasome inhibitors-molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *J Cell Mol Med* 18, 947-61.

- Kubli, D.A., Gustafsson, A.B. 2012. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control, *Circ. Res.* 111, 1208–21.
- Kuehl, W.M., Staudt, L.M. 2004. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell.* 5, 191-9.
- Kuhn, D.J., Chen, Q., Voorhees, P.M., Strader, J.S., Shenk, K.D., Sun, C.M., Demo, S.D., Bennett, M.K., van Leeuwen, F.W., Chanan-Khan, A.A., Orlowski RZ. 2007. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood.* 110, 3281-90.
- Kuhn, D.J., Berkova, Z., Jones, R.J., Woessner, R., Bjorklund, C.C., Ma, W., Davis, R.E., Lin, P., Wang, H., Madden, T.L., Wei, C., Baladandayuthapani, V., Wang, M., Thomas, S.K., Shah, J.J., Weber, D.M., Orlowski, R.Z. 2012. Targeting the insulinlike growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma. *Blood.* 120, 3260-70.
- Kunjappu, M.J., Hochstrasser, M. 2014. Assembly of the 20S proteasome. *Biochim. Biophys. Acta.* 1843, 2-12.
- LaBeau, E.M., Trujillo, D.L., Cripps, R.M. 2009. Bithorax Complex genes control alary muscle patterning along the cardiac tube of *Drosophila*. *Mech. Dev.* 126, 478–86.
- Lander, G.C., Estrin, E., Matyskiela, M.E., Bashore, C., Nogales, E., Martin, A. 2012. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature.* 482, 186-91.
- Landgren, O., Gridley, G., Turesson, I., Caporaso, N.E., Goldin, L.R., Baris, D., Fears, T.R., Hoover, R.N., Linet, M.S. Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States. *Blood.* 107, 904-6.
- Laubach, J.P., San-Miguel, J.F., Hungria, V., Hou, J., Moreau, P., Lonial, S., Lee, J.H., Einsele, H., Alsina, M., Richardson, P.G. 2017. Deacetylase inhibitors: an advance in myeloma therapy? *Expert Rev Hematol.* 10, 229-37.
- Lee, I. H., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D.B., Liu, J., Bruns, N.E., Tsokos, M., Alt, F.W., Finkel, T. 2008. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 3374–9.
- Lehmacher, C., Abeln, B., Paululat, A. 2012. The ultrastructure of *Drosophila* heart cells. *Arthropod Struct. Dev.* 41, 459–74.
- Lehmann, C., Begley, T.P., Ealick, S.E. 2006. Structure of the Escherichia coli ThiS-ThiF complex, a key component of the sulfur transfer system in thiamin biosynthesis. *Biochemistry.* 45, 11–19.
- Li, B., Fu, J., Chen, P., Ge, X., Li, Y., Kuatse, I., Wang, H., Wang, H., Zhang, X., Orlowski, R.Z. 2015. The nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2 and proteasome maturation protein axis mediates bortezomib resistance in multiple myeloma. *J Biol Chem.* 290, 29854-68.
- Li, J., Favata, M., Kelley, J.A., Caulder, E., Thomas, B., Wen, X., Sparks, R.B., Arvanitis, A., Rogers, J.D., Combs, A.P., Vaddi, K., Solomon, K.A., Scherle, P.A., Newton, R., Fridman, J.S. 2010. NCB16562, a JAK1/2 selective inhibitor, is efficacious against multiple myeloma cells and reverses the protective effects of cytokine and stromal cell support. *Neoplasia.* 12, 28-38.
- Li, M., Li, X., Zhang, H., Lu, Y. 2018. Molecular mechanisms of metformin for diabetes and cancer treatment. *Front Physiol.* 9, 1039.
- Li, X., Matilainen, O., Jin, C., Glover-Cutter, K.M., Holmberg, C.I., Blackwell, T.K. 2011. Specific SKN-1/Nrf stress responses to perturbations in translation elongation and proteasome activity. *PLoS Genet.* 7, e1002119.
- Lippai, M., Lőw, P. 2014. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *Biomed Res Int.* 832704.
- Liu, C.W., Jacobson, A.D. 2013. Functions of the 19S complex in proteasomal degradation. *Trends Biochem Sci.* 38, 103-10.

- Lohr, J.G., Stojanov, P., Carter, S.L., Cruz-Gordillo, P., Lawrence, M.S., Auclair, D., Sougnez, C., Knoechel, B., Gould, J., Saksena, G., Cibulskis, K., McKenna, A., Chapman, M.A., Straussman, R., Levy, J., Perkins, L.M., Keats, J.J., Schumacher, S.E., Rosenberg, M., Multiple Myeloma Research Consortium, Getz, G., Golub, T.R. 2014. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*. 25, 91-101.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell*. 153, 1194-217.
- Lovén, J., Hoke, H.A., Lin, C.Y., Lau, A., Orlando, D.A., Vakoc, C.R., Bradner, J.E., Lee, T.I., Young, R.A. 2013. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell*. 153, 320-34.
- Lu, Q., Li, X., Liu, j., Sun, X., Rousselle, T., Ren, D., Tong N., Li, J. 2019. AMPK is associated with the beneficial effects of antidiabetic agents on cardiovascular diseases. *Biosci Rep*. 39, BSR20181995.
- Luo, J., Solimini, N.L., Elledge, S.J. 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. 136, 823-37.
- Luo, S.T., Zhang, D.M., Qin, Q., Lu, L., Luo, M., Guo, F.C., Shi, H.S., Jiang, L., Shao, B., Li, M., Yang, H.S., Wei, Y.Q. 2017. The promotion of erythropoiesis via the regulation of reactive oxygen species by lactic Acid. *Sci Rep*. 7, 38105.
- Ma, X., Cong, P., Hou, X., Edgecombe, G.D., Strausfeld, N.J. 2014. An exceptionally preserved arthropod cardiovascular system from the early Cambrian. *Nat Commun*. 5, 3560.
- Malin, S.K., Nightingale, J., Choi, S.E., Chipkin, S.R., Braun, B. 2013. Metformin modifies the exercise training effects on risk factors for cardiovascular disease in impaired glucose tolerant adults. *Obesity (Silver Spring)*. 21, 93–100.
- Malloy, M.T., McIntosh, D.J., Walters, T.S., Flores, A., Goodwin, J.S., Arinze, I.J. 2013. Trafficking of the transcription factor Nrf2 to promyelocytic leukemia-nuclear bodies: implications for degradation of NRF2 in the nucleus. *J Biol Chem*. 288, 14569-83.
- Martinez-Garcia, E., Popovic, R., Min, D.J., Sweet, S.M., Thomas, P.M., Zamdborg, L., Heffner, A., Will, C., Lamy, L., Staudt, L.M., Levens, D.L., Kelleher, N.L., Licht, J.D. 2011. The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood*. 117, 211-20.
- Martin-Montalvo, A., Mercken, E.M., Mitchell, S.J., Palacios, H.H., Mote, P.L., Scheibye-Knudsen, M., Gomes, A.P., Ward, T.M., Minor, R.K., Blouin, M.J., Schwab, M., Pollak, M., Zhang, Y., Yu, Y., Becker, K.G., Bohr, V.A., Ingram, D.K., Sinclair, D.A., Wolf, N.S., Spindler, S.R., Bernier, M., de Cabo, R. 2013. Metformin improves healthspan and lifespan in mice, *Nat. Commun*. 4, 2192.
- Matthaei, S., Greten, H. 1991. Evidence that metformin ameliorates cellular insulin-resistance by potentiating insulin-induced translocation of glucose transporters to the plasma membrane. *Diabete Metab*. 17, 150–8.
- Maupin-Furlow, J.A. 2013. Ubiquitin-like proteins and their roles in archaea. *Trends Microbiol*. 21, 31-8.
- Medina, D.L., Fraldi, A., Bouche, V., Annunziata, F., Mansueto, G., Spampanato, C., Puri, C., Pignata, A., Martina, J.A., Sardiello, M., Palmieri, M., Polishchuk, R., Puertollano, R., Ballabio, A. 2011. Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Dev. Cell*. 21, 421–30.
- Meiners, S., Heyken, D., Weller, A., Ludwig, A., Stangl, K., Kloetzel, P.M., Krüger, E. 2003. Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *J Biol Chem*. 278, 21517-25.
- Meister, S., Schubert, U., Neubert, K., Herrmann, K., Burger, R., Gramatzki, M., Hahn, S., Schreiber, S., Wilhelm, S., Herrmann, M., Jäck, H.M., Voll, R.E. 2007. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res*. 67, 1783-92.
- Meng, L., Mohan, R., Kwok, B.H., Elofsson, M., Sin, N., Crews, C.M. 1999. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits *in vivo* antiinflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96, 10403–8.

- Mercer, T.J., Gubas, A., Tooze, S.A. 2018. A molecular perspective of mammalian autophagosome biogenesis. *J. Biol. Chem.* 293, 5386–95.
- Meyer, H., Panz, M., Zmojdian, M., Jagla, K., Paululat, A. 2009. Neprilysin 4, a novel endopeptidase from *Drosophila melanogaster*, displays distinct substrate specificities and exceptional solubility states. *J. Exp. Biol.* 212, 3673–83.
- Miyahira, A. 2012. Types of immune cells present in human PBMC. *sanguinebio.com*. Retrieved 23 Sep 2014.
- Mithraprabhu, S., Kalff, A., Chow, A., Khong, T., Spencer, A. 2014. Dysregulated class I histone deacetylases are indicators of poor prognosis in multiple myeloma. *Epigenetics*. 9, 1511–20.
- Molina, M.R., Cripps, R.M. 2001. Ostia, the inflow tracts of the *Drosophila* heart, develop from a genetically distinct subset of cardiac cells. *Mech Dev.* 109, 51–9.
- Monier, B., Astier, M., Sémériva, M., Perrin, L. 2005. Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the *Drosophila* heart. *Development*. 132, 5283–93.
- Moreau, P., Pylypenko, H., Grosicki, S., Karamanesht, I., Leleu, X., Grishunina, M., Rekhtman, G., Masliak, Z., Robak, T., Shubina, A., Arnulf, B., Kropff, M., Cavet, J., Esseltine, D.L., Feng, H., Girgis, S., van de Velde, H., Deraedt, W., Harousseau, J.L. 2011. Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study. *Lancet Oncol.* 12, 431–40.
- Morimoto, R.I. 2008. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev.* 22, 11427–38.
- Nedić, O., Rattan, S.I., Grune, T., Trougakos, I.P. 2013. Molecular effects of advanced glycation end products (AGEs) on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. *Free Radic Res.* 47, 28–38.
- Neubert, K., Meister, S., Moser, K., Weisel, F., Maseda, D., Amann, K., Wiethe, C., Winkler, T.H., Kalden, J.R., Manz, R.A., Voll, R.E. 2008. The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat Med.* 14, 748–55.
- Niforou, K., Cheimonidou, C., Trougakos, I.P. 2014. Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biol.* 2, 323–32.
- Nishida, H. 2018. Bone-targeted agents in multiple myeloma. *Hematol Rep.* 10, 7401.
- North, B.J., Almeciga-Pinto, I., Tamang, D., Yang, M., Jones, S.S., Quayle, S.N. 2017. Enhancement of pomalidomide anti-tumor response with ACY-241, a selective HDAC6 inhibitor. *PLoS One.* 12, e0173507.
- Nutt, S.L., Taubenheim, N., Hasbold, J., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D. 2011. The genetic network controlling plasma cell differentiation. *Semin Immunol.* 5, 341–9.
- Obeng, E.A., Carlson, L.M., Gutman, D.M., Harrington, W.J. Jr., Lee, K.P., Boise, L.H. 2006. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood.* 107, 4907–16.
- Ocorr, K., Akasaka, T., Bodmer, R. 2007a. Age-related cardiac disease model of *Drosophila*. *Mechanisms of ageing and development.* 128, 112–6.
- Ocorr, K., Perrin, L., Lim, H.Y., Qian, L., Wun, X., Bodmer, R. 2007b. Genetic control of heart function and aging in *Drosophila*. *Trends Cardiovasc. Med.* 17, 177–82.
- O'Connor, O.A., Stewart, A.K., Vallone, M., Molineaux, C.J., Kunkel, L.A., Gerecitano, J.F., Orlowski, R.Z. 2009. A phase 1 dose escalation study of the safety and pharmacokinetics of the novel proteasome inhibitor carfilzomib (PR-171) in patients with hematologic malignancies. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* 15, 7085–91.
- Ortega, J., Heymann, J.B., Kajava, A.V., Ustrell, V., Rechsteiner, M., Steven, A.C. 2005. The axial channel of the 20S proteasome opens upon binding of the PA200 activator. *J Mol Biol.* 346, 1221–7.
- Papanagnou, E.D., Terpos, E., Kastiris, E., Papassideri, I.S., Tsitsilonis, O., Dimopoulos, M.A., Trougakos, I.P. 2018. Molecular responses to therapeutic proteasome inhibitors in multiple myeloma patients are donor-, cell type- and drug-dependent. *Oncotarget.* 9, 17797–809.

- Pass, G., Tögel, M., Krenn, H., Paululat, A. 2015. The circulatory organs of insect wings: Prime examples for the origin of evolutionary novelties. *Zool. Anz.* 256, 82–95.
- Patel, M.B., Majetschak, M. 2007. Distribution and interrelationship of ubiquitin proteasome pathway component activities and ubiquitin pools in various porcine tissues. *Physiol Res.* 56, 341–50.
- Patterson, C., Ike, C., Willis, P.W. 4th, Stouffer, G.A., Willis, M.S. 2007. The bitter end: the ubiquitin-proteasome system and cardiac dysfunction. *Circulation* 115, 1456–63.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., Gygi, S.P. 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol.* 21, 921–6.
- Pernet, L., Faure, V., Gilquin, B., Dufour-Guérin, S., Khochbin, S., Vourc'h, C. 2014. HDAC6-ubiquitin interaction controls the duration of HSF1 activation after heat shock. *Mol Biol Cell.* 25, 4187–94.
- Pickart, C.M. 2000. Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 25, 544–8.
- Pickering, A.M., Davies, K.J. 2012. Degradation of Damaged Proteins: The Main Function of the 20S Proteasome. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 109, 227–48.
- Pieper, K., Grimbacher, B., Eibel, H. 2013. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* 131, 959–71.
- Powell, S.R., Herrmann, J., Lerman, A., Patterson, C., Wang, X. 2012. The ubiquitin-proteasome system and cardiovascular disease. *Progress in molecular biology and translational science.* 109, 295–346.
- Powers, E.T., Morimoto, R.I., Dillin, A., Kelly, J.W., Balch, W.E. 2009. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 959–91.
- Predmore, J.M., Wang, P., Davis, F., Bartolone, S., Westfall, M.V., Dyke, D.B., Pagani, F., Powell, S.R., Day, S.M. 2010. Ubiquitin proteasome dysfunction in human hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Circulation.* 121, 997–1004.
- Raab, M., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P.G., Anderson, K.C. 2009. Multiple myeloma. *Lancet.* 374, 324–39.
- Radhakrishnan, S.K., Lee, C.S., Young, P., Beskow, A., Chan, J.Y., Deshaies, R.J. 2010. Transcription factor Nrf1 mediates the proteasome recovery pathway after proteasome inhibition in mammalian cells. *Mol. Cell.* 38, 17–28.
- Rambold, A.S., Lippincott-Schwartz, J. 2011. Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. *Cell cycle (Georgetown, Tex.).* 10, 4032–8.
- Ramos, P.C., Höckendorff, J., Johnson, E.S., Varshavsky, A., Dohmen, R.J. 1998. Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell.* 20, 489–99.
- Reim, I., Frasch, M. 2005. The Dorsocross T-box genes are key components of the regulatory network controlling early cardiogenesis in *Drosophila*. *Development* 132, 4911–25.
- Ren, J., Pulakat, L., Whaley-Connell, A., Sowers, J.R. 2010. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J. Mol. Med. (Berl).* 88, 993–1001.
- Richardson, P.G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar, S.V., Srkalovic, G., Alsina, M., Alexanian, R., Siegel, D., Orlowski, R.Z., Kuter, D., Limentani, S.A., Lee, S., Hideshima, T., Esseltine, D.L., Kauffman, M., Adams, J., Schenkein, D.P., Anderson, K.C. 2003. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med.* 348, 2609–17.
- Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M.W., Irwin, D., Stadtmauer, E.A., Facon, T., Harousseau, J.L., Ben-Yehuda, D., Lonial, S., Goldschmidt, H., Reece, D., San-Miguel, J.F., Bladé, J., Boccadoro, M., Cavenagh, J., Dalton, W.S., Boral, A.L., Esseltine, D.L., Porter, J.B., Schenkein, D., Anderson, K.C. 2005. Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med.* 352, 2487–98.
- Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M.W., Stadtmauer, E.A., Facon, T., Harousseau, J.L., Ben-Yehuda, D., Lonial, S., Goldschmidt, H., Reece, D., Bladé, J., Boccadoro, M., Cavenagh, J.D., Boral, A.L., Esseltine, D.L., Wen, P.Y., Amato, A.A., Anderson, K.C., San Miguel, J. 2009. Reversibility of

- symptomatic peripheral neuropathy with bortezomib in the phase III APEX trial in relapsed multiple myeloma: impact of a dose-modification guideline. *Br J Haematol.* 144, 895-903
- Richardson, P.G., Weller, E., Lonial, S., Jakubowiak, A.J., Jagannath, S., Raje, N.S., Avigan, D.E., Xie, W., Ghobrial, I.M., Schlossman, R.L., Mazumder, A., Munshi NC, Vesole DH, Joyce R, Kaufman JL, Doss D, Warren DL, Lunde LE, Kaster S, Delaney, C., Hideshima, T., Mitsiades, C.S., Knight, R., Esseltine, D.L., Anderson, K.C. 2010. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 116, 679–86.
- Riz, I., Hawley, T.S., Marsal, J.W., Hawley, R.G. 2016. Noncanonical SQSTM1/p62-Nrf2 pathway activation mediates proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma cells via redox, metabolic and translational reprogramming. *Oncotarget.* 7, 66360-85.
- Roe, N.D., Xu, X., Kandadi, M.R., Hu, N., Pang, J., Weiser-Evans, M.C., Ren, J. 2015. Targeted deletion of PTEN in cardiomyocytes renders cardiac contractile dysfunction through interruption of Pink1-AMPK signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 1852, 290-8.
- Rollig, C., Knop, S., Bornhauser, M. 2015. Multiple myeloma. *Lancet.* 385, 2197–208.
- Rotstein, B., Paululat, A. 2016. On the Morphology of the *Drosophila* Heart. *J Cardiovasc Dev, Dis.* 3, 15.
- Rowe, G.C., Jiang, A. Z. 2010. Arany, PGC-1 coactivators in cardiac development and disease, *Circ. Res.* 107, 825–88.
- Ruckrich, T., Kraus, M., Gogel, J., Beck, A., Ovaa, H., Verdoes, M., Overkleeft, H.S., Kalbacher, H., Driessen, C. 2009. Characterization of the ubiquitin proteasome system in bortezomib-adapted cells. *Leukemia.* 23, 1098-105.
- Ruderman, N.B., Carling, D., Prentki, M., Cacicedo, J.M. 2013 AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 123, 2764-72.
- Saeki, Y., Tanaka, K. 2012. Assembly and function of the proteasome. *Methods Mol. Biol.* 832, 315–37.
- Salpeter, S., Greyber, E., Pasternak, G., Salpeter, E. 2006. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev.* 1, CD002967.
- Schubert, U., Antón, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., Binnink, J.R. 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature.* 404, 770-4.
- Seifarth, C., Schehler, B., Schneider, H.J. 2013. Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 121, 27–31.
- Sellin, J., Albrecht, S., Kölsch, V., Paululat, A. 2006. Dynamics of heart differentiation, visualized utilizing heart enhancer elements of the *Drosophila melanogaster* bHLH transcription factor Hand. *Gene Expr Patterns.* 6, 360-75.
- Sellin, J., Drechsler, M., Nguyen, H.T., Paululat, A. 2009. Antagonistic function of Lmd and Zfh1 fine tunes cell fate decisions in the Twi and Tin positive mesoderm of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 32, 444-55.
- Sha, Z., Goldberg, A.L. 2014. Proteasome-mediated processing of Nrf1 is essential for coordinate induction of all proteasome subunits and p97. *Curr Biol.* 24, 1573-83.
- Shah, A.P., Nongthomba, U., Kelly Tanaka, K.K., Denton, M.L., Meadows, S.M., Bancroft, N., Molina, M.R., Cripps, R.M. 2011. Cardiac remodeling in *Drosophila* arises from changes in actin gene expression and from a contribution of lymph gland-like cells to the heart musculature. *Mech Dev.* 128, 222-33.
- Shringarpure, R., Grune, T., Mehlhase, J., Davies, K.J. 2003. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem.* 278, 311-8.
- Simoes-Costa, M.S., Vasconcelos, M., Sampaio, A.C., Cravo, R.M., Linhares, V.L., Hochgreb, T., Yan, C.Y., Davidson, B., Xavier-Neto, J. 2005. The evolutionary origin of cardiac chambers. *Dev Biol.* 277, 1–15.
- Sklirou, A., Papanagnou, E.D., Fokialakis, N., Trougakos, I.P. 2018. Cancer chemoprevention via activation of proteostatic modules. *Cancer Lett.* 413, 110-21.
- Slack, J.M.W. 2006. Βασικές αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης. Δεύτερη έκδοση.
- Sláma, K. 2006. Heartbeat reversal after sectioning of the dorsal vessel and removal of the brain in diapausing pupae of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Eur. J. Entomol.* 103, 17–26.

- Sláma, K. 2010. Physiology of heartbeat reversal in adult *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Eur. J. Entomol.* 107, 13–31.
- Smadja, N.V., Bastard, C., Brigaudeau, C., Leroux, D., Fruchart, C. 2001. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Groupe Français de Cytogénétique Hématologique.* 98, 2229–38.
- Stadtmueller, B.M., Kish-Trier, E., Ferrell, K., Petersen, C.N., Robinson, H., Myszk, D.G., Eckert, D.M., Formosa, T., Hill, C.P. 2012. Structure of a proteasome Pba1-Pba2 complex: implications for proteasome assembly, activation, and biological function. *J. Biol. Chem.* 287, 37371–82.
- Stapnes, C., Døskeland, A.P., Hatfield, K., Ersvaer, E., Rynningen, A., Lorens, J.B., Gjertsen, B.T., Bruserud, O. 2007. The proteasome inhibitors bortezomib and PR-171 have antiproliferative and proapoptotic effects on primary human acute myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol.* 136, 814–28.
- Steffen, J., Seeger, M., Koch, A., Krüger, E. 2010. Proteasomal degradation is transcriptionally controlled by TCF11 via an ERAD-dependent feedback loop. *Mol. Cell.* 40, 147–58.
- Steinberg, G.R., Kemp, B.E. 2009. AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev* 89, 1025–78.
- Stessman, H.A., Baughn, L.B., Sarver, A., Xia, T., Deshpande, R., Mansoor, A., Walsh, S.A., Sunderland, J.J., Dolloff, N.G., Linden, M.A., Zhan, F., Janz, S., Myers, C.L., Van Ness, B.G. 2013. Profiling bortezomib resistance identifies secondary therapies in a mouse myeloma model. *Mol Cancer Ther.* 12, 1140–50.
- Stewart, A.K., Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M.A., Masszi, T., Špička, I., Oriol, A., Hájek, R., Rosiñol, L., Siegel, D.S., Mihaylov, G.G., Goranova-Marinova, V., Rajnics, P., Suvorov, A., Niesvizky, R., Jakubowiak, A.J., San-Miguel, J.F., Ludwig, H., Wang, M., Maisnar, V., Minarik, J., Bensinger, W.I., Mateos, M.V., Ben-Yehuda, D., Kukreti, V., Zojwalla, N., Tonda, M.E., Yang, X., Xing, B., Moreau, P., Palumbo, A. 2015. ASPIRE Investigators. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med.* 372, 142–52.
- Su, H., Wang, X. 2010. The ubiquitin-proteasome system in cardiac proteinopathy: a quality control perspective. *Cardiovasc Res.* 85, 253–62.
- Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K.B., Tanaka, K. 2000. Hybrid Proteasomes. Induction by Interferon-Gamma and Contribution to ATP-Dependent Proteolysis. *The Journal of biological chemistry.* 275, 14336–45.
- Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.F., Karbowski, M., Youle, R.J. 2010. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol.* 191, 1367–80.
- Tanaka, K. 2013. The Proteasome: From Basic Mechanisms to Emerging Roles. *Keio Journal of Medicine.* 62, 1–12.
- Teicher, B.A., Tomaszewski, J.E. 2015. Proteasome inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 96, 1–9.
- Tekirdag, K., Cuervo, A.M. 2018. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: joint by a chaperone. *J. Biol. Chem.* 293, 5414–24.
- Thomopoulos, C., Katsimaglis, G., Makris, T. 2017. Metformin and blood pressure lowering: a questioned association. *J Hypertens.* 35, 27–8.
- Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M., Wolf, D.H. 1994. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 349, 275–80.
- Tijsterman, M., Plasterk, R.H. 2004. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell.* 117, 1–3.
- Tögel, M., Pass, G., Paululat, A. 2008. The *Drosophila* wing hearts originate from pericardial cells and are essential for wing maturation. *Dev. Biol.* 318, 29–37.
- Trougamos, I.P., Margaritis, L.H. 1998. Immunolocalization of the temporally "early" secreted major structural chorion proteins, Dvs38 and Dvs36, in the eggshell layers and regions of *Drosophila virilis*. *J Struct Biol.* 123, 111–23.
- Trougamos, I.P., Sesti, F., Tsakiri, E., Gorgoulis, V.G. 2013. Non-enzymatic posttranslational protein modifications and proteostasis network deregulation in carcinogenesis. *J Proteomics.* 92, 274–98.
- Tsakiri, E.N., Gumeni, S., Vougas, K., Pendin, D., Papassideri, I., Daga, A., Gorgoulis, V., Juhász, G., Scorrano, L., Trougamos, I.P. 2019. Proteasome dysfunction induces excessive proteome instability and loss of

- mitostasis that can be mitigated by enhancing mitochondrial fusion or autophagy. *Autophagy*. 19, 1-17.
- Tsakiri, E.N., Sykiotis, G.P., Papassideri, I.S., Gorgoulis, V.G., Bohmann, D., Trougakos, I.P. 2013a. Differential regulation of proteasome functionality in reproductive vs. somatic tissues of *Drosophila* during ageing or oxidative stress. *FASEB J*. 27, 2407-20.
- Tsakiri, E.N., Sykiotis, G.P., Papassideri, I.S., Terpos, E., Dimopoulos, M.A., Gorgoulis, V.G., Bohmann, D., Trougakos, I.P. 2013b. Proteasome dysfunction in *Drosophila* signals to an NRF2-dependent regulatory circuit aiming to restore proteostasis and prevent premature aging. *Aging Cell*. 12, 802-13.
- Tsakiri, E.N., Terpos, E., Papanagnou, E.D., Kastritis, E., Briudes, V., Halabalaki, M., Bagratuni, T., Florea, B.I., Overkleeft, H.S., Scorrano, L., Skaltsounis, A.L., Dimopoulos, M.A., Trougakos, I.P. 2017. Milder degenerative effects of Carfilzomib vs. Bortezomib in the *Drosophila* model: a link to clinical adverse events. *Sci Rep*. 7, 17802.
- Tsakiri, E.N., Trougakos, I.P. 2015. The Amazing Ubiquitin-Proteasome System: Structural Components and Implication in Aging. *Int Rev Cell Mol Biol*. 314, 171-237.
- Valero, T. 2014. Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches. *Curr. Pharm. Des*. 20, 5507-9.
- van Anken, E., Romijn, E.P., Maggioni, C., Mezghrani, A., Sitia, R., Braakman, I., Heck, A.J. 2003. Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion. *Immunity*. 18, 243-53.
- Varjabedian, L., Bourji, M., Pourafkari, L., Nader, N.D. 2018. Cardioprotection by Metformin: Beneficial Effects Beyond Glucose Reduction. *Am J Cardiovasc Drugs*. 18, 181-93.
- Vernace, V.A., Arnaud, L., Schmidt-Glenewinkel, T., Figueiredo-Pereira, M.E. 2007. Ageing perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J*. 21, 2672-82.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A. Jr., Kinzler, K.W. 2013. Cancer genome landscapes. *Science*. 339, 1546-58.
- Vogl, D.T., Raje, N., Jagannath, S., Richardson, P., Hari, P., Orlowski, R., Supko, J.G., Tamang, D., Yang, M., Jones, S.S., Wheeler, C., Markelewicz, R.J., Lonial, S. 2017. Ricolinostat, the first selective histone deacetylase 6 inhibitor, in combination with bortezomib and dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 23, 3307-15.
- Vogler, G., Bodmer, R. 2015. Cellular Mechanisms of *Drosophila* Heart Morphogenesis. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2, 2-16.
- Vogler, G., Bodmer, R., Akasaka, T. 2009. A *Drosophila* model for congenital heart disease. *Drug Discov. Today: Disease Models*. 6, 47-54.
- von Mikecz, A.A. 2006. The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J Cell Sci*. 119, 1977-84.
- Walker, B.A., Wardell, C.P., Brioli, A., Boyle, E., Kaiser, M. F., Begum, D.B., Morgan, G.J. 2014. Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. *Blood cancer journal*. 4, e191.
- Wan, X., Huo, Y., Johns, M, Piper, E., Mason, J.C., Carling, D., Haskard, D.O., Boyle, J.J. 2013. 5'-AMP-activated protein kinase-activating transcription factor 1 cascade modulates human monocyte-derived macrophages to atheroprotective functions in response to heme or metformin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 33, 2470-80.
- Wang, D.S., Jonker, J.W., Kato, Y., Kusuhara, H., Schinkel, A.H., Sugiyama, Y. 2002. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J Pharmacol Exp Ther*. 302, 510-5.
- Wang, X. 2013. Repeated intermittent administration of a ubiquitous proteasome inhibitor leads to restrictive cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 15, 597-8.
- Wang, X., Robbins, J. 2006. Heart failure and protein quality control. *Circ Res*. 99, 1315-28.
- Wang, Y., Ai, L., Cui, G., Gowrea, B., Li, M., Hu, Y. 2012. Once versus twice-weekly Bortezomib induction therapy with dexamethasone in newly diagnosed multiple myeloma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 32, 495-500.

- Wang, Y.W., He, S.J., Feng, X., Cheng, J., Luo, Y.T., Tian, L., Huang, Q. 2017. Metformin: a review of its potential indications. *Drug Des Devel Ther.* 11, 2421-9.
- Wasserthal, L.T. 2007. *Drosophila* flies combine periodic heartbeat reversal with a circulation in the anterior body mediated by a newly discovered anterior pair of ostial valves and venous channels. *J. Exp. Biol.* 210, 3707–19.
- Weaver, B.A., Cleveland, D.W. 2006. Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol* 18, 658–67.
- Weavers, H., Prieto-Sanchez, S., Grawe, F., Garcia-Lopez, A., Artero, R., Wilsch-Brauninger, M., Ruiz-Gomez, M., Skaer, H., Denholm, B. 2008. The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. *Nature.* 457, 322–6.
- Weekes, J., Morrison, K., Mullen, A., Wait, R., Barton, P., Dunn, M.J. 2003. Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy. *Proteomics.* 3, 208-16.
- Weniger, M.A., Rizzatti, E.G., Pérez-Galán, P., Liu, D., Wang, Q., Munson, P.J., Raghavachari, N., White, T., Tweito, M.M., Dunleavy, K., Ye, Y., Wilson, W.H., Wiestner, A. 2011. Treatment induced oxidative stress and cellular antioxidant capacity determine response to bortezomib in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 17, 5101-12.
- Williams, B.R., Amon, A. 2009. Aneuploidy: cancer's fatal flaw? *Cancer Res.* 69, 5289–91.
- Wirkner, C.S., Tögel, M., Pass, G. 2013. The Arthropod Circulatory System. In *Arthropod Biology and Evolution: Molecules, Development, Morphology.* 343–91.
- Witters, L.A. 2001. The blooming of the French lilac. *J Clin Invest.* 108, 1105–7.
- Wood, W., Jacinto, A. 2007. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 542-51.
- Xie, Z., Lau, K., Eby, B., Lozano, P., He, C., Pennington, B., Li, H., Rath, S., Dong, Y., Tian, R., Kem, D., Zou, M.H. 2011. Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice. *Diabetes.* 60, 1770–8.
- Yan, J., Seibenhener, M.L., Calderilla-Barbosa, L., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., Jiang, J., Wooten, M.W., Wooten, M.C. 2013. SQSTM1/p62 interacts with HDAC6 and regulates deacetylase activity. *PLoS One.* 8, e76016.
- Yang, J., Wang, Z., Fang, Y., Jiang, J., Zhao, F., Wong, H., Bennett, M.K., Molineaux, C.J., Kirk, C.J. 2009. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, metabolism, distribution, and excretion of carfilzomib in rats. *Drug Metab Dispos.* 39, 1873-82.
- Yashiroda, H., Mizushima, T., Okamoto, K., Kameyama, T., Hayashi, H., Kishimoto, T., Niwa, S., Kasahara, M., Kurimoto, E., Sakata, E., Takagi, K., Suzuki, A., Hirano, Y., Murata, S., Kato, K., Yamane, T., Tanaka, K. 2008. Crystal structure of a chaperone complex that contributes to the assembly of yeast 20S proteasomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 228-36.
- Yeh, C.H., Chen, T.P., Wang, Y.C., Lin, Y.M., Fang, S.W. 2010. AMP-activated protein kinase activation during cardioplegia-induced hypoxia/reoxygenation injury attenuates cardiomyocytic apoptosis via reduction of endoplasmic reticulum stress. *Mediators Inflamm.* 130636.
- Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., Hailey, D.W., Oorschot, V., Klumperman, J., Baehrecke, E.H., Lenardo, M.J. 2010. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature.* 465, 942–6.
- Zaffran, S., Astier, M., Gratecos, D., Guillen, A., Sémériva, M. 1995. Cellular interactions during heart morphogenesis in the *Drosophila* embryo. *Biol Cell.* 84, 13-24.
- Zaffran, S., Reim, I., Qian, L., Lo, P.C., Bodmer, R., Frasch, M. 2006. Cardioblast-intrinsic Tinman activity controls proper diversification and differentiation of myocardial cells in *Drosophila*. *Development.* 133, 4073–83.
- Zang, Y., Thomas, S.M., Chan, E.T., Kirk, C.J., Freilino, M.L., DeLancey, H.M., Grandis, J.R., Li, C., Johnson, D.E. 2012. The next generation proteasome inhibitors carfilzomib and oprozomib activate prosurvival autophagy via induction of the unfolded protein response and ATF4. *Autophagy.* 8, 1873-4.

- Zeitouni, B., Sénatore, S., Séverac, D., Aknin, C., Sémeriva, M., Perrin, L. 2007. Signalling pathways involved in adult heart formation revealed by gene expression profiling in *Drosophila*. PLoS Genetics. 3, 1907–21.
- Zeng, R., Chen, Y., Zhao, S., Cui, G.H. 2012. Autophagy counteracts apoptosis in human multiple myeloma cells exposed to oridonin *in vitro* via regulating intracellular ROS and SIRT1. Acta Pharmacol Sin. 33, 91-100.
- Zhang, B.B., Zhou, G., Li, C. 2009. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. Cell Metab. 9, 407–16.
- Zhang, C., Jiang, H., Wang, P., Liu, H., Sun, X. 2017. Transcription factor NF-kappa B represses ANT1 transcription and leads to mitochondrial dysfunctions. Scientific reports. 7, 44708.
- Zhang, F., Zhao, Y., Han, Z. 2013. An *in vivo* functional analysis system for renal gene discovery in *Drosophila* pericardial nephrocytes. J. Am. Soc. Nephrol. 24, 191–7.
- Zhou, L., Liu, H., Wen, X., Peng, Y., Tian, Y., Zhao, L. 2017. Effects of metformin on blood pressure in nondiabetic patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. J Hypertens. 35, 18–26.
- Zhuang, S., Shao, H., Guo, F., Trimble, R., Pearce, E., Abmayr, S.M. 2009. Sns and Kirre, the *Drosophila* orthologs of Nephrin and Neph1, direct adhesion, fusion and formation of a slit diaphragm-like structure in insect nephrocytes. Development. 136, 2335–44.

Ιστοσελίδες

<https://droso4schools.wordpress.com/organs/>

European Medicines Agency (EMA). 2019. <https://www.ema.europa.eu/>

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΑΚΡΟΒΙΟΤΗΤΑΣ

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΑΚΡΟΒΙΟΤΗΤΑΣ

Means and Medians for Survival Time	Mean ^a				Median				
			95% Confidence Interval				95% Confidence Interval		Total animals died/Total
Samples/Genotype	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	
+/ <i>Gal4</i> ^{TinC}	49,24	2,38	44,58	53,91	50,00	3,23	43,67	56,33	108/110
<i>UAS Pros61</i> ^{RNAi} / <i>Gal4</i> ^{TinC}	17,63	1,01	15,64	19,61	17,00	1,75	13,58	20,42	110/110
Overall	33,43	1,68	30,15	36,72	24,00	1,62	20,82	27,18	110/110

Log Rank (Mantel-Cox)	Pairwise Comparisons				
	Samples/Genotype		+/ <i>Gal4</i> ^{TinC}		<i>UAS Pros61</i> ^{RNAi} / <i>Gal4</i> ^{TinC}
			Chi-Square	Sig.	Chi-Square
	+/ <i>Gal4</i> ^{TinC}				123,32
	<i>UAS Pros61</i> ^{RNAi} / <i>Gal4</i> ^{TinC}		123,32	0,00	

Means and Medians for Survival Time	Mean ^a				Median				
			95% Confidence Interval				95% Confidence Interval		Total animals died/Total
Samples/Genotype	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	
+/ <i>Gal4</i> ^{TinC}	61,87	2,03	57,90	65,85	71,00	3,02	65,09	76,91	
<i>UAS Pros85</i> ^{RNAi} / <i>Gal4</i> ^{TinC}	30,24	1,08	28,12	32,36	32,00	1,57	28,92	35,08	149/158
<i>UAS Atg8a</i> / <i>Gal4</i> ^{TinC}	50,39	1,66	47,14	53,64	56,00	1,88	52,31	59,69	158/158
<i>UAS Pros85</i> ^{RNAi} , <i>UAS Atg8a</i> / <i>Gal4</i> ^{TinC}	37,30	1,44	34,49	40,12	41,00	1,89	37,30	44,70	155/158
Overall	44,74	0,92	42,93	46,55	44,00	0,98	42,08	45,92	158/158

Pairwise Comparisons								
Samples/Genotype	+/ <i>Gal4</i> ^{TinC}		<i>UAS pros85</i> ^{RNAi} / <i>Gal4</i> ^{TinC}		<i>UAS Atg8a</i> / <i>Gal4</i> ^{TinC}		<i>UAS Pros85</i> ^{RNAi} , <i>UAS Atg8a</i> / <i>Gal4</i> ^{TinC}	
	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.
+/ <i>Gal4</i> ^{TinC}			175,30	0,00	62,32	0,00	128,42	0,00
<i>UAS Pros85</i> ^{RNAi} / <i>Gal4</i> ^{TinC}	175,30	0,00			138,72	0,00	34,04	0,00
<i>UAS Atg8a</i> / <i>Gal4</i> ^{TinC}	62,32	0,00	138,72	0,00			64,90	0,00
<i>UAS Pros85</i> ^{RNAi} , <i>UAS Atg8a</i> / <i>Gal4</i> ^{TinC}	128,42	0,00	34,04	0,00	64,90	0,00		

a Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

			95% Confidence Interval				95% Confidence Interval		
Samples	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Total animals died/Total
Μάρτυρας	35,65	1,55	32,62	38,69	34,00	2,66	28,79	39,21	
MET 1mM	36,28	1,76	32,82	39,73	37,00	3,79	29,57	44,43	115/120
CFZ 50μM	16,93	0,64	15,68	18,19	16,00	1,14	13,77	18,23	120/120
CFZ 50μM+MET 1mM	18,01	0,78	16,49	19,53	18,00	0,97	16,11	19,89	120/120
BTZ 1μM	16,50	0,64	15,24	17,76	15,00	0,50	14,03	15,98	120/120
BTZ 1μM+MET 1mM	22,77	0,91	20,99	24,55	23,00	1,56	19,93	26,07	120/120

Log Rank (Mantel-Cox)	Pairwise Comparisons													
	Μάρτυρας		MET 1mM		CFZ 50μM		CFZ 50μM+MET 1mM		BTZ 1μM		BTZ 1μM+MET 1mM			
	Samples	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	
	Μάρτυρας			0,45	0,50	125,06	0,00	106,03	0,00	125,96	0,00	65,82	0,00	
	MET 1mM	0,45	0,50			109,73	0,00	98,43	0,00	109,68	0,00	65,77	0,00	
	CFZ 50μM	125,06	0,00	109,73	0,00			4,97	0,03	0,02	0,88	41,17	0,00	
	CFZ 50μM+MET 1mM	106,03	0,00	98,43	0,00	4,97	0,03			3,03	0,08	26,05	0,00	
	BTZ 1μM	125,96	0,00	109,68	0,00	0,02	0,88	3,03	0,08			43,41	0,00	
	BTZ 1μM+MET 1mM	65,82	0,00	65,77	0,00	41,17	0,00	26,05	0,00	43,41	0,00			

Means and Medians for Survival Time	Mean ^a				Median				
			95% Confidence Interval				95% Confidence Interval		
Samples	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Total animals died/Total
Μάρτυρας	35,65	1,55	32,62	38,69	34,00	2,66	28,79	39,21	115/120
MET 5mM	32,08	1,50	29,14	35,02	35,00	1,75	31,58	38,43	115/120
CFZ 50 μM	15,59	0,67	14,28	16,91	14,00	0,79	12,46	15,54	114/120
CFZ 50μM+MET 5mM	14,47	0,66	13,18	15,76	13,00	0,47	12,08	13,92	119/120
BTZ 1μM	14,16	0,46	13,25	15,07	14,00	0,45	13,12	14,88	118/120
BTZ 1μM+MET 5mM	14,33	0,69	12,98	15,69	12,00	0,38	11,25	12,75	117/120

Log Rank (Mantel-Cox)	Pairwise Comparisons												
	Samples	Μάρτυρας		MET 5mM		CFZ 50μM		CFZ 50μM+MET 5mM		BTZ 1μM		BTZ 1μM+MET 5mM	
		Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.
	Μάρτυρας			3,69	0,06	127,45	0,00	136,10	0,00	159,39	0,00	136,56	0,00
	MET 5mM	3,69	0,06			92,26	0,00	100,89	0,00	118,92	0,00	104,74	0,00
	CFZ 50μM	127,45	0,00	92,26	0,00			2,96	0,09	7,74	0,01	0,74	0,39
	CFZ 50μM+MET 5mM	136,10	0,00	100,89	0,00	2,96	0,09			0,27	0,60	0,06	0,81
	BTZ 1μM	159,39	0,00	118,92	0,00	7,74	0,01	0,27	0,60			1,53	0,22
	BTZ 1μM+MET 5mM	136,56	0,00	104,74	0,00	0,74	0,39	0,06	0,81	1,53	0,22		

a Estimation is limited to the largest survival time if it is censored.

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II: ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Η Ελένη-Δήμητρα Παπανάγγελου είναι απόφοιτη του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α). Κατά τη διάρκεια του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών της συμμετείχε στην ερευνητική ομάδα του Ομότιμου Καθηγητή κ. Λουκά Χ. Μαργαρίτη, στο πλαίσιο της Πτυχιακής εργασίας (2010-2011) με τίτλο «Οι επιπτώσεις της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην ωογένεση του δίπτερου εντόμου *Drosophila virilis*» και κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού κύκλου, εκπόνησε την ερευνητική της εργασία (2013-2014) στο εργαστήριο του Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκου με τίτλο «Μελέτη των μεταβολών της λειτουργικότητας βασικών ρυθμιστών του δικτύου πρωτεόστασης (ομοιοστασίας του πρωτεώματος) κατά τη γήρανση». Από το Σεπτέμβριο του 2014 είναι υποψήφια διδάκτωρ στο εργαστήριο της Μοριακής-Κυτταρικής γήρανσης και καρκινογένεσης υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκου, ενώ το έργο της επικεντρώνεται στη μελέτη της ρύθμισης λειτουργικών μονάδων του δικτύου κυτταρικής πρωτεόστασης στη γήρανση και τον καρκίνο. Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της Διδακτορικής της Διατριβής υπήρξε Υπότροφος του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ), ενώ παράλληλα στο διάστημα των σπουδών της εκπαιδεύτηκε στην εφαρμογή τεχνικών Μοριακής-Κυτταρικής Βιολογίας καθώς και σε Βιοχημικές μεθόδους και τεχνικές Μικροσκοπίας. Από τον Αύγουστο του 2014 έως τον Ιούνιο του 2015 έχει εργαστεί στο ερευνητικό πρόγραμμα της ΓΓΕΤ EnGAGE, ενώ από το Σεπτέμβριο του 2015 έως το Σεπτέμβριο του 2018 εργάστηκε στο ευρωπαϊκό ερευνητικό πρόγραμμα TASCAR-Horizon 2020 project 11SYN-1-420. Επιπρόσθετα έχει συμμετάσχει στα ερευνητικά προγράμματα της ΓΓΕΤ 1440-BET-2013-AGROSMETICS project και NatProt 3207. Συγκεκριμένα, εξειδικεύεται στο χειρισμό διαφόρων τύπων κυτταροκαλλιιεργειών και ζωικών μοντέλων όπως *Drosophila melanogaster* και *Drosophila virilis*. Είναι συγγραφέας ερευνητικών εργασιών σε διεθνή περιοδικά (6) και συλλογικούς τόμους (2 κεφάλαια). Επίσης έχει παρουσιάσει εργασίες σε Διεθνή (14) και Πανελλήνια (6) επιστημονικά συνέδρια.

9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ: ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Αναλυτικά οι Ερευνητικές Δημοσιεύσεις και τα Άρθρα ανασκόπησης που έχουν προκύψει στο πλαίσιο της Διδακτορικής Διατριβής:

1. **Papanagnou, E.D.**, Terpos, E., Kastritis, E., Papassideri, I.S., Tsitsilonis, O.E., Dimopoulos, M.A., Trougkos, I.P. 2018. Molecular responses to therapeutic proteasome inhibitors in multiple myeloma patients are donor-, cell type- and drug-dependent. *Oncotarget*. 9, 17797-809.
2. Efentakis, P.*, Kremastiotis, G.*, Varela, A., Nikolaou, P.E., **Papanagnou, E.D.**, Davos, C.H., Tsoumani, M., Agrogiannis, G., Konstantinidou, A., Kastritis, E., Kanaki, Z., Iliodromitis, E.K., Klinakis, A., Dimopoulos, M.A., Trougkos, I.P., Andreadou, I., Terpos, E. 2019. Molecular mechanisms of carfilzomib-induced cardiotoxicity in mice and the emerging cardioprotective role of metformin. *Blood*. 133, 710-23.
3. Sklirou, A., Papanagnou, E.D., Fokialakis, N., Trougkos, I.P. 2018. Cancer chemoprevention via activation of proteostatic modules. *Cancer Lett*. 28, 413, 110-21.
4. Tsakiri, E.N., Terpos, E., **Papanagnou, E.D.**, Kastritis, E., Briudes, V., Halabalaki, M., Bagratuni, T., Florea, B.I., Overkleeft, H.S., Scorrano, L., Skaltsounis, A.L., Dimopoulos, M.A., Trougkos, I.P. 2017. Milder degenerative effects of Carfilzomib vs. Bortezomib in the *Drosophila* model: a link to clinical adverse events. *Sci Rep*. 7, 17802.

Από τη συμμετοχή σε άλλα ερευνητικά προγράμματα κατά τη διάρκεια εκπόνησης της Διατριβής έχουν προκύψει οι παρακάτω εργασίες:

5. Kontogiannis, C., Georgiopoulos, G., Loukas, K., **Papanagnou, E.D.**, Pachi, V.K., Bakogianni, I., Laina, A., Kouzoupis, A., Karatzi, K., Trougkos, I.P., Stamatelopoulou, K. 2019. Chios mastic improves blood pressure haemodynamics in patients with arterial hypertension: Implications for regulation of proteostatic pathways. *Eur J Prev Cardiol*. 26, 328-31.
6. Tsakiri, E.N., Gaboriaud-Kolar, N., Iliaki, K.K., Tchoumtchoua, J., **Papanagnou, E.D.**, Chatzigeorgiou, S., Tallas, K.D., Mikros, E., Halabalaki, M., Skaltsounis, A.L., Trougkos, I.P. 2017. The Indirubin Derivative 6-Bromoindirubin-3'-Oxime Activates Proteostatic Modules, Reprograms Cellular Bioenergetic Pathways, and Exerts Antiaging Effects. *Antioxid Redox Signal*. 10, 1027-47.
7. Gumeni, S.*, Tsakiri, E.*, Cheimonidi, C.M., Evaggelakou, Z., Gianniou, D., Tallas, K., **Papanagnou, E.D.**, Sklirou, A., Trougkos, I.P. 2017. Impact of mitostasis and the role of antioxidant responses on Central Nervous System disorders. In Protein folding disorders of the central nervous system. Ghiso J. and Rostagno A. (eds). *World Scientific Publishing Co*. 185-201.
8. Gumeni, S.*, Tsakiri, E.*, Cheimonidi, C.M., Evaggelakou, Z., Gianniou, D., Tallas, K., **Papanagnou, E.D.**, Sklirou, A., Trougkos, I.P. 2017. Impact of loss of proteostasis on Central Nervous System disorders. In Protein folding disorders of the central nervous system. Ghiso J. and Rostagno A. (eds). *World Scientific Publishing Co*. 131-162.

Molecular responses to therapeutic proteasome inhibitors in multiple myeloma patients are donor-, cell type- and drug-dependent

Eleni-Dimitra Papanagnou¹, Evangelos Terpos², Efstathios Kastiris², Issidora S. Papassideri¹, Ourania E. Tsitsilonis³, Meletios A. Dimopoulos² and Ioannis P. Trougakos¹

¹Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, 15784 Athens, Greece

²Department of Clinical Therapeutics, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 11528 Athens, Greece

³Department of Animal and Human Physiology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, 15784 Athens, Greece

Correspondence to: Meletios A. Dimopoulos, **email:** mdimop@med.uoa.gr
Ioannis P. Trougakos, **email:** itroutagos@biol.uoa.gr

Keywords: bortezomib; cancer; carfilzomib; multiple myeloma; proteasome

Received: July 14, 2017

Accepted: March 06, 2018

Published: April 03, 2018

Copyright: Papanagnou et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Proteasome is central to proteostasis network functionality and its over-activation represents a hallmark of advanced tumors; thus, its selective inhibition provides a strategy for the development of novel antitumor therapies. In support, proteasome inhibitors, e.g. Bortezomib or Carfilzomib have demonstrated clinical efficacy against hematological cancers. Herein, we studied proteasome regulation in peripheral blood mononuclear cells and erythrocytes isolated from healthy donors or from Multiple Myeloma patients treated with Bortezomib or Carfilzomib. In healthy donors we found that peripheral blood mononuclear cells express higher, as compared to erythrocytes, basal proteasome activities, as well as that proteasome activities decline during aging. Studies in cells isolated from Multiple Myeloma patients treated with proteasome inhibitors revealed that in most (but, interestingly enough, not all) patients, proteasome activities decline in both cell types during therapy. In peripheral blood mononuclear cells, most proteostatic genes expression patterns showed a positive correlation during therapy indicating that proteostasis network modules likely respond to proteasome inhibition as a functional unit. Finally, the expression levels of antioxidant, chaperone and aggresomes removal/autophagy genes were found to inversely associate with patients' survival. Our studies will support a more personalized therapeutic approach in hematological malignancies treated with proteasome inhibitors.

INTRODUCTION

The surveillance of proteome quality is critical for cell survival and is maintained by the modular proteostasis network (PN) [1, 2]. Proteotoxic stress activates the PN in order to either rescue (when feasible), or degrade non

repairable polypeptides; a process known as the triage decision of *hold*, *fold*, or *degrade*. Key components of the PN are the protein synthesis module, the Unfolded Protein Response of the Endoplasmic Reticulum (ER) (UPR^{ER}) and the molecular chaperones along with the Ubiquitin Proteasome- (UPP) and the Autophagy

LYMPHOID NEOPLASIA

Molecular mechanisms of carfilzomib-induced cardiotoxicity in mice and the emerging cardioprotective role of metformin

Panagiotis Efentakis,^{1,2,*} Georgios Kremastiotis,^{1,*} Aimilia Varela,³ Panagiota-Efstathia Nikolaou,¹ Eleni-Dimitra Papanagnou,⁴ Constantinos H. Davos,³ Maria Tsoumani,¹ Georgios Agrogiannis,⁵ Anastasia Konstantinidou,⁵ Efstathios Kastiris,⁶ Zoi Kanaki,⁷ Efstathios K. Iliodromitis,⁸ Apostolos Klinakis,⁷ Meletios A. Dimopoulos,⁶ Ioannis P. Trougakos,⁴ Ioanna Andreadou,^{1,†} and Evangelos Terpos^{6,†}

¹Laboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece; ²Center for Thrombosis and Hemostasis, University Medical Center of the Johannes Gutenberg-University Mainz, Mainz, Germany; ³Cardiovascular Research Laboratory, Biomedical Research Foundation Academy of Athens, Athens, Greece; ⁴Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, ⁵1st Department of Pathology, School of Medicine, and ⁶Department of Clinical Therapeutics, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece; ⁷Division of Genetics and Gene Therapy, Center for Basic Research, Biomedical Research Foundation Academy of Athens, Athens, Greece; and ⁸2nd Department of Cardiology, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

KEY POINTS

- Czf decreases left ventricular function in mice through increased PP2A activity and inhibition of AMPK α /autophagy regulatory axes.
- Met preserves left ventricular function in mice by restoring AMPK α activation; thus, it emerges as a prophylactic therapy.

Carfilzomib (Czf), an irreversible proteasome inhibitor licensed for relapsed/refractory myeloma, is associated with cardiotoxicity in humans. We sought to establish the optimal protocol of Czf-induced cardiac dysfunction, to investigate the underlying molecular-signaling and, based on the findings, to evaluate the cardioprotective potency of metformin (Met). Mice were randomized into protocols 1 and 2 (control and Czf for 1 and 2 consecutive days, respectively); protocols 3 and 4 (control and alternate doses of Czf for 6 and 14 days, respectively); protocols 5A and 5B (control and Czf, intermittent doses on days 0, 1 [5A] and 0, 1, 7, and 8 [5B] for 13 days); protocols 6A and 6B (pharmacological intervention; control, Czf, Czf+ Met and Met for 2 and 6 days, respectively); and protocol 7 (bortezomib). Czf was administered at 8 mg/kg (IP) and Met at 140 mg/kg (per os). Czf resulted in significant reduction of proteasomal activity in heart and peripheral blood mononuclear cells in all protocols except protocols 5A and 5B. Echocardiography demonstrated that Czf led to a significant fractional shortening (FS) depression in protocols 2 and 3, a borderline dysfunction in protocols 1 and 4, and had no detrimental effect on protocols 5A and 5B. Molecular analysis revealed that Czf inhibited AMPK α /

mTORC1 pathways derived from increased PP2A activity in protocol 2, whereas it additionally inhibited phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway in protocol 3. Coadministration of Met prevented Czf-induced FS reduction and restored AMPK α phosphorylation and autophagic signaling. Conclusively, Czf decreased left ventricular function through increased PP2A activity and inhibition of AMPK α and its downstream autophagic targets, whereas Met represents a novel promising intervention against Czf-induced cardiotoxicity. (Blood. 2019;133(7):710-723)

Introduction

Multiple myeloma (MM) is a plasma cell malignancy^{1,2} in which proteasome inhibitors (PI) are widely used for its treatment.³ Carfilzomib (Czf) is an irreversible PI licensed for the treatment of relapsed/refractory MM.⁴ The Carfilzomib and Dexamethasone Versus Bortezomib and Dexamethasone for Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma study showed that Czf significantly improved survival of relapsed/refractory MM patients compared with treatment with the reversible PI bortezomib (Btz).⁵ However, Czf (contrary to Btz) has been associated with severe cardiac adverse effects.^{1,6} MM is a disease of

the elderly,⁷ and approximately two-thirds of patients had a concomitant coronary heart disease or other cardiovascular disorder before Czf treatment.⁸ Additionally, patients with co-existing cardiovascular diseases and other comorbidities have a higher prevalence of developing cardiac dysfunction during Czf treatment.⁹ Thus, thorough patient evaluation and risk assessment before initiation of therapy with Czf is crucial.^{10,11}

Notably, there are data lacking on current preventive strategies for Czf-induced cardiotoxicity.¹⁰⁻¹⁵ Thus, there is an imperative need for molecular-based research on novel pharmacological interventions.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

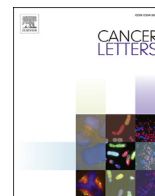
Milder degenerative effects of Carfilzomib vs. Bortezomib in the *Drosophila* model: a link to clinical adverse events

Eleni N. Tsakiri¹, Evangelos Terpos², Eleni-Dimitra Papanagnou¹, Efstathios Kastiris², Vincent Briudes³, Maria Halabalaki³, Tina Bagratuni², Bogdan I. Florea⁴, Herman S. Overkleeft⁴, Luca Scorrano⁵, Alexios-Leandros Skaltsounis³, Meletios A. Dimopoulos² & Ioannis P. Trougakos¹

Proteasome inhibitors, e.g. Bortezomib (BTZ) and Carfilzomib (CFZ), have demonstrated clinical efficacy against haematological cancers. Interestingly, several adverse effects are less common, compared to BTZ, in patients treated with CFZ. As the molecular details of these observations remain not well understood we assayed the pathophysiological effects of CFZ vs. BTZ in the *Drosophila* experimental model. Mass Spectrometry analyses showed that neither CFZ nor BTZ are hydrolysed in flies' tissues, while at doses inducing similar inhibition of the rate limiting for protein breakdown chymotrypsin-like (CT-L) proteasomal activity, CFZ treatment resulted in less intense increase of oxidative stress or activation of antioxidant and proteostatic modules. Also, despite comparable cardiotoxicity likely due to disrupted mitochondrial function, CFZ did not affect developmental processes, showed minimal neuromuscular defects and reduced to a lesser extent flies' healthspan. Studies in flies, human cancer cell lines and blood cells isolated from Multiple Myeloma patients treated with CFZ or BTZ revealed, that the increased BTZ toxicity likely relates to partial co-inhibition of the caspase-like (C-L) proteasomal activity. Supportively, co-treating flies with CFZ and a C-L selective proteasome inhibitor exacerbated CFZ-mediated toxicity. Our findings provide a reasonable explanation for the differential adverse effects of CFZ and BTZ in the clinic.

Organisms require efficient surveillance of proteome quality to prevent disruption of proteostasis (homeodynamics of the proteome). Proteostasis maintenance is achieved by the concerted action of a number of modules that constitute the proteostasis network (PN). PN is (among others) composed from the network of molecular chaperones, as well as from the autophagy lysosome- (ALP) and the ubiquitin proteasome- (UPP) degradation pathways^{1,2}. ALP is mostly involved in the clearance of protein aggregates and damaged organelles³, while UPP degrades normal short-lived ubiquitinated proteins and non-repairable unfolded polypeptides^{1,4}. The 26 S proteasome is composed from the 20S core particle (CP) and the 19 S regulatory particles (RP)⁵. Proteasome peptidase activities are localised in the 20S CP and specifically at the β 1, β 2 and β 5 subunits that bear caspase- (C-L; LLE/ β 1), trypsin- (T-L; LRR/ β 2) and chymotrypsin- (CT-L; LLVY/ β 5) like proteolytic activity, respectively^{6,7}. Proteome functionality also depends on the transcriptional activity of the NF-E2-related factor 2 (Nrf2) which upon increased oxidative or proteotoxic stress stimulates the expression of antioxidant enzymes and proteasomal subunits^{8,9}.

¹Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, 15784, Athens, Greece. ²Department of Clinical Therapeutics, School of Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, 11528, Athens, Greece. ³Department of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, 15771, Athens, Greece. ⁴Leiden Institute of Chemistry and Netherlands Proteomics Centre, Gorlaeus Laboratories, Einsteinweg 55, 2333 CC, Leiden, The Netherlands. ⁵Dulbecco-Telethon Institute, Venetian Institute of Molecular Medicine and Department of Biology, University of Padua, 35129, Padova, Italy. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.A.D. (email: mdimop@med.uoa.gr) or I.P.T. (email: itrougakos@biol.uoa.gr)



Original Article

Cancer chemoprevention via activation of proteostatic modules



Aimilia Sklirou^a, Eleni-Dimitra Papanagnou^a, Nikolas Fokialakis^b,
Ioannis P. Trougakos^{a,*}

^a Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens 15784, Greece

^b Department of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Athens 15771, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2017

Received in revised form

16 October 2017

Accepted 20 October 2017

Keywords:

Cancer prevention

Proteostasis network

Natural products

Nrf2

Chemopreventive agents

ABSTRACT

Proteins carry out the majority of cellular functions and maintain cellular homeodynamics mostly by participating in multimeric assemblies that operate as protein machines. Proteome quality control is thus critical for cellular functionality, and it is carried out through the curating activity of the proteostasis network (PN). Key components of the PN are the protein synthesis and trafficking modules, the endoplasmic reticulum unfolded protein response, molecular chaperones, and the two main degradation machineries, namely the ubiquitin proteasome and autophagy lysosome pathways. Part of the PN are also several stress responsive pathways, including nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), which mobilises genomic responses against oxidative and/or xenobiotic damage. Nevertheless, the gradual accumulation of stressors during ageing or earlier due to lifestyle results in an increasingly damaged and unstable proteome. This outcome may then increase genomic instability due to reduced DNA replication fidelity or repair, leading to various age-related diseases such as cancer. Considering that the activation of proteostatic modules exerts anti-ageing effects in model organisms, we present herein a synopsis of studies showing that proteostatic modules activation (e.g. by natural products) represents a promising tumour-chemopreventive approach.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

The integrity of proteome homeodynamics (or proteostasis) is critical for cell homeostasis and survival. Thus, organisms that

constantly encounter a variety of stresses, have developed several mechanisms in order to monitor the basal functionality and structure of cellular biomolecules and hence avoid proteotoxic stress. The maintenance of proteome functionality and stability along with the clearance of damaged components of the proteome are orchestrated by a highly integrated modular system, which is called the proteostasis network (PN) [1–4]. Proteome instability activates the PN in order to rescue, when possible, or degrade unfolded, misfolded, damaged, and/or non-native polypeptides, a process known as the triage decision of *hold*, *fold*, or *degrade*. Deregulation of proteostasis is associated with several age-related diseases, as the onset of senility is considered a major risk factor for a wide spectrum of protein conformational diseases, including immunological and metabolic disorders, neurodegenerative diseases, and cancer [2,5,6]. Notably, it has been proposed that proteotoxic stress constitutes a hallmark of cancer, as evidenced by the constant activation of the heat shock response (HSR) [7].

Cancer is the second leading cause of death worldwide after cardiovascular diseases. According to the World Health Organization (WHO), cancer was responsible for 8.8 million deaths in 2015, and the number of new cases is estimated to increase by about 70%

Abbreviations: 6BIO, 6-Bromoindirubin-3'-oxime; ALP, Autophagy Lysosome Pathway; ARE, antioxidant response elements; ATF, activating transcription factor; DMBA, 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene; ER, Endoplasmic Reticulum; FoxO, fork-head box O; Gsk-3, Glycogen synthase kinase-3; Hsf1, heat shock factor 1; Hsps, heat shock proteins; HSR, heat shock response; IRE1, inositol-requiring enzyme 1; Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1; NP, natural product; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; OMMAD, outer mitochondrial membrane associated degradation; PEITC, phenethyl isothiocyanate; PERK, protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase; PKR, protein kinase R; PN, Proteostasis Network; PQC, proteome quality control; ROS, Reactive Oxygen Species; TPA, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate; UPR, unfolded protein response; UPR^{ER}, endoplasmic reticulum unfolded protein response; UPR^{MT}, mitochondrial unfolded protein response; UPP, Ubiquitin Proteasome Pathway; XBP1, X box-binding protein.

* Corresponding author. Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 15784, Greece.

E-mail address: itrougakos@biol.uoa.gr (I.P. Trougakos).



Chios mastic improves blood pressure haemodynamics in patients with arterial hypertension: Implications for regulation of proteostatic pathways

Christos Kontogiannis¹, Georgios Georgiopoulos¹, Konstantinos Loukas¹, Eleni-Dimitra Papanagnou², Vasiliki K Pachi³, Ioanna Bakogianni¹, Ageliki Laina¹, Anastasios Kouzoupis⁴, Kalliopi Karatzi⁵, Ioannis P Trougakos² and Kimon Stamatelopoulos¹

European Journal of Preventive
Cardiology
0(00) 1–4

© The European Society of
Cardiology 2018

Article reuse guidelines:

sagepub.com/journals-permissions

DOI: 10.1177/2047487318796985

journals.sagepub.com/home/ejpc



Chios mastic (CM) is the resin of *Pistacia lentiscus* var. chia, exclusively produced in the Greek Aegean island of Chios. Accumulating evidence suggests a cardioprotective role of this resin by way of its antioxidant and anti-inflammatory properties.^{1,2} These attributes may also convey favourable effects on prohypertensive mechanisms,³ but its impact on blood pressure (BP) haemodynamics has not been investigated in clinical or experimental settings. We therefore sought to assess the acute effects of CM on peripheral and aortic haemodynamics and associated changes in gene expression of molecules involved in pathways related to hypertension.

The study population consisted of 27 consecutive eligible volunteers (13 hypertensive patients) who responded to a call for participation in the study. Exclusion criteria were history of cardiovascular disease, current treatment with statins, history of allergy to CM, current use of vitamins or antioxidant supplements, dieting at the time of the study, history of eating disorders, acute or chronic inflammatory disease and active cancer. All volunteers gave written informed consent. In a randomised double-blind case controlled crossover design, volunteers were assessed at two consecutive visits one week apart. Participants were randomly assigned to first visit oral administration of 2800 mg of CM (four tablets of 700 mg IASIS pharma Hellas S.A., Athens, Greece) or placebo. At each visit, haemodynamic parameters were assessed at three distinct time points (baseline, 2 and 3 hours after administration). Haemodynamic assessment included non-invasive measurement of aortic systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure and aortic augmentation index normalised for heart rate at 75 bpm by using radial artery tonometry (Sphygmocor System;

Atcor Medical, Sydney, Australia) as previously described.⁴ We also studied expression levels of genes involved in proteome stability, proteasome and chaperones, cellular pro-oxidant responses, mitochondrial-metabolic pathways and inflammation (Figure 1) using isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Gene expression analysis was performed in samples from four hypertensive patients with available samples of isolated PBMCs and the highest observed decrease in peripheral SBP 2 hours after CM administration, and was compared to three control normotensive subjects without decrease in peripheral SBP after CM administration. Univariable and multivariable analyses using linear mixed models with random effects were implemented to assess the effect of CM administration on longitudinal changes in parameters of interest. Statistical analysis was performed using the STATA package, version 11.1 (StataCorp, College Station, TX, USA). The level of statistical significance was set at $P < 0.05$ except for multiple comparisons

¹Department of Clinical Therapeutics, National and Kapodistrian University of Athens, Greece

²Department of Cell Biology and Biophysics, National and Kapodistrian University of Athens, Greece

³Laboratory of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, National and Kapodistrian University of Athens, Greece

⁴First Psychiatric Clinic, National and Kapodistrian University of Athens, Greece

⁵Department of Nutrition and Dietetics, Harokopio University, Greece

Corresponding author:

Kimon Stamatelopoulos, Vascular Laboratory, Department of Clinical Therapeutics, Alexandra Hospital Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, 80 Vas. Sofias Str, Athens 11528, Greece.

Email: kstamatel@med.uoa.gr



ORIGINAL RESEARCH COMMUNICATION

The Indirubin Derivative 6-Bromoindirubin-3'-Oxime Activates Proteostatic Modules, Reprograms Cellular Bioenergetic Pathways, and Exerts Antiaging Effects

Eleni N. Tsakiri,¹ Nicolas Gaboriaud-Kolar,² Kalliopi K. Iliaki,¹ Job Tchoumtchoua,² Eleni-Dimitra Papanagnou,¹ Sofia Chatzigeorgiou,¹ Konstantinos D. Tallas,¹ Emmanuel Mikros,³ Maria Halabalaki,² Alexios-Leandros Skaltsounis,² and Ioannis P. Trougakos¹

Abstract

Aims: Organismal aging can be delayed by mutations that either activate stress responses or reduce the nutrient-sensing pathway signaling; thus, by using *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* experimental screening platform, we searched for compounds that modulate these pathways.

Results: We noted that oral administration of the glycogen synthase kinase 3 (Gsk-3) inhibitor 6-bromoindirubin-3'-oxime (6BIO) in *Drosophila* flies extended healthy life span. 6BIO is not metabolized in fly tissues, modulated bioenergetic pathways, decreased lipid and glucose tissue load, activated antioxidant and proteostatic modules, and enhanced resistance to stressors. Mechanistically, we found that the effects on the stress-responsive pathways were largely dependent on the activity of the transcription factor nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf-2). Genetic inhibition of Gsk-3 largely phenocopied the 6BIO-mediated effects, while high levels of Gsk-3 expression and/or kinase activity suppressed proteostatic modules and reduced flies' longevity; these effects were partially rescued by 6BIO. Also, 6BIO was found to partially reduce the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (Pdk1) activity, a major effector of the insulin/insulin-like growth factor-1 cell signaling pathways.

Innovation: 6BIO exerts the unique property of increasing stress tolerance and in parallel partially suppressing the nutrient-sensing pathway signaling.

Conclusion: Our findings suggest that the 6BIO scaffold can be used for the development of novel antiaging compounds. *Antioxid. Redox Signal.* 27, 1027–1047.

Keywords: 6-bromoindirubin-3'-oxime, aging, Gsk-3, Nrf-2, Pdk1, proteostasis

Introduction

ORGANISMAL AGING IS a complex molecular process that relates to time-dependent decline of stress resistance and functional capacity, which leads to increased risk of morbidity and mortality; accordingly, age is the major risk factor for several diseases, including cancer, cardiovascular disease, neurodegeneration, and diabetes (31). It is nowadays evident that both healthspan (the disease-free period of life) and/or life span (maximum longevity) can be prolonged by

genetic and/or diet interventions, suggesting that animals have the latent potential to live longer than they normally do. Specifically, several studies at model organisms have demonstrated that longevity can be increased by caloric restriction (CR) or gene mutations that reduce the activity of nutrient sensing, for example, the insulin/insulin-like growth factor-1 (InS/IGF-1) cell signaling pathways (1, 2, 15).

Alternatively, CR activates the AMP-activated kinase (AMPK) signaling pathway that functions as a nutrient and energy sensor, which represses anabolic pathways under

¹Department of Cell Biology and Biophysics, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.

Departments of ²Pharmacognosy and Natural Products Chemistry and ³Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece.

© Eleni N. Tsakiri *et al.* 2017; Published by Mary Ann Liebert, Inc. This article is available under the Creative Commons License CC-BY-NC (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>). This license permits non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. Permission only needs to be obtained for commercial use and can be done via RightsLink.

Chapter 6

Impact of Loss of Proteostasis on Central Nervous System Disorders

Sentiljana Gumeni*, Eleni N. Tsakiri*,
Christina-Maria Cheimonidi, Zoi Evangelakou,
Despoina Gianniou, Kostantinos Tallas,
Eleni-Dimitra Papanagnou, Aimilia D. Sklirou,
and Ioannis P. Trougakos

6.1 Introduction

As organisms encounter many different kinds of stress, several mechanisms that modulate cellular homeodynamics have been developed in order to ensure the correct structure and function of biomolecules in cells. The vast majority of cellular functions are performed by proteins that are organized in large assemblies and largely work as complicated energy-demanding protein machines. Proteome stability is maintained by an elegant compartment-specific system called the proteostasis network (PN). PN under stress conditions is activated to rescue, when feasible, or degrade unfolded, misfolded, and/or damaged polypeptides, and this process is also known as a triage decision (fold, hold, or degrade) [1]. Proteome quality control (PQC) consists of two main arms, namely *arm I* (proteotoxic stress-related cellular responses) which is represented by

* Equal contribution.

Chapter 8

Impact of Mitostasis and the Role of the Anti-oxidant Responses on Central Nervous System Disorders

Sentiljana Gumeni*, Eleni N. Tsakiri*,
Christina-Maria Cheimonidi, Zoi Evangelakou,
Despoina Gianniou, Kostantinos Tallas,
Eleni-Dimitra Papanagnou, Aimilia D. Sklirou,
and Ioannis P. Trougakos

8.1 Introduction

Mitochondria are the “powerhouse” organelles of the cell, providing adenosine triphosphate (ATP) through oxidative phosphorylation (OXPHOS) of nutritional sources. They are highly dynamic organelles that undergo fission and fusion, move into the cell along the microtubules to generate the mitochondrial network, and likely provide locally the required ATP [1]. Apart from ATP production, mitochondria contribute to plenty of cellular functions including the buffering and sequestering of the intracellular Ca^{2+} ; the modulation of the cellular reduction–oxidation (redox) rate, the production of reactive oxygen species (ROS), and also the regulation of cellular transcription rates [2]. By affecting both energy metabolism and apoptosis, mitochondria play an important role in cellular survival. Among different cell types, neurons are particularly dependent on the proper function of

*Equal contribution.

10. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV: ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΚΑΙ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Δεδομένα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής παρουσιάστηκαν σε Διεθνή και Ελληνικά συνέδρια:

Ελληνικά Συνέδρια

Κρεμασιώτης Γ., Εφεντάκης Π., Βαρελά Α., Δάβος Χ. Κ., Τσουμάνη Μ., Χατζηστεφάνου Μ., **Παπανάγνου Ε.Δ.**, Τρουγκάκος Π.Ι., Καστρίτης Ε., Κανάκη Ζ., Ηλιοδρομίτης Ε.Κ., Κλινάκης Α., Δημόπουλος Μ.Α., Τέρπος Ε., Ανδρεάδου Ι. (2018) Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού της επαγόμενης καρδιοτοξικότητας από τον αναστολέα πρωτεασώματος καρφιλζομίμη: Ο ρόλος της μετφορμίνης ως καρδιοπροστατευτική θεραπεία. Περίληψη από 39ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Αθήνα.

Κρεμασιώτης Γ., Εφεντάκης Π., Βαρελά Α., Τρουγκάκος Ι., **Παπανάγνου Ε.Δ.**, Χαβδούλα Ε., Ηλιοδρομίτης Ε.Κ., Κλινάκης Α., Τέρπος Ε., Ανδρεάδου Ι. (2017) Μελέτη καρδιοτοξικότητας επαγόμενης από τη χρήση του φαρμάκου carfilzomib σε σύγκριση με το φάρμακο bortezomib σε μύες και μελέτη του υποκείμενου μηχανισμού. Περίληψη από 38ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Αθήνα.

Κρεμασιώτης Γ., Εφεντάκης Π., Βαρελά Α., Δάβος Κ., **Παπανάγνου Ε.Δ.**, Τρουγκάκος Ι., Καστρίτης Ε., Χαβδούλα Ε., Ηλιοδρομίτης Ε.Κ., Κλινάκης Α., Δημόπουλος Μ.Α., Τέρπος Ε., Ανδρεάδου Ι. (2017) Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού της επαγόμενης από αναστολείς πρωτεασώματος καρδιοτοξικότητας: Σύγκριση μεταξύ καρφιλζομίμης και βορτεζομίμης. Περίληψη από 28ο Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο, Αθήνα- Βραβείο προφορικής ανακοίνωσης.

Παπανάγνου Ε.Δ., Μπαγκρατούνη Τ., Καστρίτης Ε., Tsakiri E., Παπασιδέρη Ι.Σ., Τέρπος Ε., Δημόπουλος Μ.Α., Τρουγκάκος Ι.Π. (2015). Ανάλυση των επιδράσεων αναστολέων του πρωτεασώματος σε ασθενείς Πολλαπλού Μυελώματος: Μεταφραστική έρευνα από το in vivo πειραματικό μοντέλο της Drosophila στον άνθρωπο. Περίληψη από 37ο Επιστημονικό Συνέδριο ΕΕΒΕ, Βόλος.

Papanagnou E.D., Bagratuni T., Kastitis E., Tsakiri E., Papassideri I.S., Terpos E., Dimopoulos M. A., Trougakos I.P. (2015). Translating findings of proteasome inhibitors effects from the in vivo Drosophila experimental model to Multiple Myeloma cancer patients. Abstracts of 66ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ε.Ε.Β.Μ.Β. Αθήνα.

Niforou K., **Papanagnou E.D.**, Iliaki K.K., Gorgoulis V.G., Trougakos I.P., (2015) Disruption of ataxia-telangiectasia mutated (ATM) activity modulates the proteostasis network both in human cells and in adult Drosophila somatic tissues. Abstracts of 66ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ε.Ε.Β.Μ.Β. Αθήνα.

Διεθνή Συνέδρια

Kremastiotis G., Efentakis P., Varela A., Davos C.H., **Papanagnou E.D.**, Trougakos I.P., Kastitis E., Kanaki Z., Iliodromitis E.K., Klinakis A., Dimopoulos M.A., Terpos E., Andreadou I. (2018) Investigating the molecular mechanisms of carfilzomib-induced cardiotoxicity and the emerging role of metformin as a prophylactic therapy. Abstracts of European Society of Cardiology Congress, Munich.

Kremastiotis G., Efentakis P., Varela A., Davos C.H., **Papanagnou E.D.**, Trougakos I.P., Kastritis E., Kanaki Z., Iliodromitis E.K., Klinakis A., Dimopoulos M.A., Andreadou I., Terpos E. (2018) Carfilzomib-induced cardiotoxicity: Molecular mechanisms and the emergin role of metformin as prophylactic therapy. Abstracts of 23rd Congress of European Hematology Association, Stockholm.

Kremastiotis G., Efentakis P., Varela A., Davos C.H., Tsoumani M., Agrogiannis G., Konstantinidou A., **Papanagnou E.D.**, Trougakos I.P., Kastritis E., Kanaki Z., Iliodromitis E.K., Klinakis A., Dimopoulos M.A., Andreadou I., Terpos E. (2018) The proteasome inhibitor carfilzomib (Cfz) induces cardiotoxicity in vivo: molecular mechanisms and the cardioprotective effect of metformin (Met). Abstracts of 60th ASH Annual Meeting & Exposition, San Diego.

Kremastiotis G., Efentakis P., Varela A., Davos C.H., Tsoumani M., **Papanagnou E.D.**, Trougakos I.P., Kastritis E., Kanaki Z., Iliodromitis E.K., Klinakis A., Dimopoulos M.A., Terpos E., Andreadou I. (2018) The proteasome inhibitor carfilzomib (Cfz) induces cardiotoxicity in vivo: molecular mechanisms and the cardioprotective effect of metformin (Met). Abstracts of International Society of Heart Research Meeting, Amsterdam.

Papanagnou E.D., Bagratuni T., Kastritis E., Papassideri I.S., Terpos E., Dimopoulos M.A., Trougakos I.P. (2015) Analysis of molecular-cellular responses to proteasome inhibitors in Multiple Myeloma patients; a translational approach of proteasome inhibitors in vivo effects from the Drosophila experimental model to humans. Abstracts of 3th Aegean Hematology Oncology Symposium, Thessaloniki, 2016.

Papanagnou E.D., Bagratuni T., Kastritis E., Papassideri I.S., Terpos E., Dimopoulos M.A., Trougakos I.P. (2015) Analysis of molecular-cellular responses to proteasome inhibitors in Multiple Myeloma patients; a translational approach of proteasome inhibitors in vivo effects from the Drosophila experimental model to humans. Abstracts of 57th ASH Annual Meeting & Exposition, Orlando.

Trougakos I.P., **Papanagnou E.D.**, Bagratuni T., Kastritis E., Papassideri I., Terpos E., Dimopoulos M.A. (2014) Translating findings of proteasome inhibitors effects from the in vivo Drosophila experimental model to humans: the paradigm of the molecular-cellular responses to Bortezomib and Carfilzomib. Abstracts of 56th ASH Annual Meeting & Exposition, San Francisco.

Συμμετοχές σε Διεθνή συνέδρια κατά τη διάρκεια εκπόνησης της Διδακτορικής Διατριβής στο πλαίσιο άλλων ερευνητικών προγραμμάτων:

Papanagnou ED, Fokialakis N, Cheimoni C, Sklirou A, Baira E, Le Goff G, Vlachou P, Tsafantakis N, Álvarez P, Chavanich S, Bialecki A, Benayahu Y, Wenzkowski C, Ouazzani J, Trougakos IP. (2018). A research pipeline for the discovery of bioactive small molecules with health ageing-promoting activity from the marine mesophotic zone. Abstracts of the 4th EuroSymposium on Healthy Ageing, Brussels, Belgium.

Fokialakis N, Sklirou A, Baira E, Tsafantakis N, **Papanagnou ED**, Vlachou P, Cheimonidi C, Álvarez P, Chavanich S, Bialecki A, De Voogd N, Benayahu Y, Schaeffer M, Le Goff G, Ouazzani

J, Trougakos IP. (2018). A research pipeline for the discovery of bioactive small molecules with antiaging activity from the marine mesophotic zone. Abstracts of the 4th International Conference and Exhibition on Natural Products, Medicinal Plants & Marine Drugs, Rome, Italy.

Fokialakis N, Tsafantakis N, Baira E, Trougakos IP, Sklirou A, Vlachou P, **Papanagnou ED**, Cheimonidi C, Álvarez P, Chavanich S, Bialecki A, De Voogd N, Benayahu Y, Schaeffer M, Le Goff, Ouazzani J. (2018). Investigating the marine mesophotic zone for the discovery of bioactive small molecules with antiaging activity. Abstracts of the 66th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (jointly with the 11th Shanghai TCM conference), Shanghai, China.

Fokialakis N, Tsafantakis N, Baira E, Trougakos IP, Sklirou A, Vlachou P, **Papanagnou ED**, Cheimonidi C, Álvarez P, Chavanich S, Bialecki A, De Voogd N, Benayahu Y, Schaeffer M, Ouazzani J. (2018). Invertebrates and associated microorganisms of the marine mesophotic zone – a unique source for the discovery of bioactive small molecules with antiaging activity. Abstracts of the International Conference of Natural and Medical Sciences, Lublin, Poland.

Ouazzani J, Fokialakis N, Cheimonidi C, **Papanagnou ED**, Sklirou A, Baira E, Le Goff G, Vlachou P, Tsafantakis N, Gardikis K, Álvarez P, Chavanich S, Bialecki A, Benayahu Y, Wenzkowski C, Trougakos IP. (2018). Natural products in the fight against ageing and age-related diseases; the marine mesophotic zone as a source for the discovery of novel bioactive compounds. Abstracts of the 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 10th International Congress on Biodiversity (ISCNP30 & ICB10), Athens, Greece.

Vlachou P, Baira E, Nikolaou IA, Katsiki MC, Bistolaki AA, Tsafantakis N, Trougakos IP, Sklirou A, **Papanagnou ED**, Cheimonidi C, Chavanich S, Le Goff G, Ouazzani J, Fokialakis N. (2018). Investigating marine invertebrates and microorganisms for the discovery of novel skin antiaging compounds. Abstracts of the 66th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (jointly with the 11th Shanghai TCM conference), Shanghai, China.

Fokialakis N, Tsafantakis N, Baira E, Trougakos I, Sklirou A, Vlachou P, **Papanagnou ED**, Cheimonidi MC, Álvarez P, Chavanich S, Bialecki A, De-Voogd N, Benayahu Y, Schaeffer M, Ouazzani J. (2017). Investigating the marine mesophotic zone for the discovery of bioactive molecules with applications in cosmeceutical and pharmaceutical industry. Abstracts of the 52nd European Marine Biology Symposium, PortoRož, Slovenia.