



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικών και Καποδιστριακών  
Πανεπιστήμιον Αθηνών  
----- ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837-----

Σχολή Θετικών Επιστημών  
Τμήμα Βιολογίας  
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ:

«Μελέτη μηχανισμών πρωτεόστασης και μιτοχονδριακής λειτουργίας  
κατά τη γήρανση»

Μαρία Λάμπρου

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ιωάννης Τρουγκάκος

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

Αθήνα 2020

## Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή.....	6
1.1 Γήρανση.....	6
1.1.1 Γενωμική αστάθεια.....	7
1.1.2 Μείωση μήκους τελομερών.....	9
1.1.3 Διαταραχή της πρωτεόστασης.....	9
• Η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης.....	10
• Η ρύθμιση της αναδίπλωσης.....	10
• Η ρύθμιση της μετακίνησης των πρωτεϊνών.....	11
• Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών.....	11
1.1.3.1 Πρωτεολυτικοί μηχανισμοί.....	13
1.1.3.1.1 Μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος (Autophagy-Lysosome Pathway, ALP).....	13
1.1.3.1.2 Μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Ubiquitin-Proteasome Pathway).....	14
• Το σύστημα της ουβικιτίνης και τα ένζυμα σύζευξης της ουβικιτίνης.....	14
• Η «μοίρα» των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών.....	15
• Πρωτεάσωμα.....	16
• 20S κεντρικό τμήμα.....	17
• 19S ρυθμιστικό τμήμα.....	19
1.1.4 Μιτοχονδριακή Δυσλειτουργία.....	20
1.1.5 Το αντιοξειδωτικό μονοπάτι NRF2/Keap1.....	21
1.2 Καρκίνος.....	22
• Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός.....	24
• Αδρανοποίηση καταστολέων ανάπτυξης.....	24
• Αποφυγή κυτταρικού θανάτου.....	24
• Αθανατοποίηση.....	25
• Επαγόμενη αγγειογένεση.....	25
• Μετάσταση και ενεργητική διείσδυση.....	26
1.2.1 <i>Drosophila melanogaster</i> : Μοντέλο για καρκινική μελέτη.....	26
1.2.2 Το ογκογονίδιο <i>Ras</i> .....	27
1.2.3 Το γονίδιο <i>Cdc6</i> (Cell cycle division 6).....	29
1.3 Σκοπός.....	32
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	33
2.1 Υλικά.....	33
2.1.1 Μηχανήματα.....	33
2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια.....	33

2.1.3 Αντισώματα.....	36
2.1.4 Διαλύματα.....	37
2.1.5 Real-Time PCR εκκινητές (Real-Time PCR primers).....	38
2.1.6 Διαγονιδιακά στελέχη <i>Drosophila melanogaster</i> .....	39
2.1.7 Η τροφή των εντόμων.....	41
2.2 Μέθοδοι.....	42
2.2.1 Μοριακές τεχνικές.....	42
2.2.1.1 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR, Q-RT PCR).....	42
2.2.1.2 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford.....	42
2.2.1.3 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας πρωτεασώματος.....	43
2.2.1.4 Μέτρηση ενεργότητας λυσοσώματος.....	43
2.2.1.5 Μέτρηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS).....	44
2.2.1.6 SDS-PAGE ανοσοστύπωμα κατά Western.....	44
2.2.1.7 Μέθοδος ανοσοφθορισμού σε ενήλικα έντομα.....	45
2.2.2 Πειραματικό μοντέλο: Το έντομο <i>Drosophila melanogaster</i> .....	45
2.2.2.1 Φυσιολογική ανάπτυξη της <i>Drosophila</i> .....	46
2.2.2.2 Ωογένεση.....	47
2.2.2.3 Εμβρυογένεση.....	47
2.2.2.4 Στάδια της προνύμφης.....	47
2.2.2.5 Το ενήλικο άτομο.....	48
2.2.2.6 Καλλιέργεια του εντόμου <i>D.melanogaster</i> .....	48
2.2.2.7 Έλεγχος βιωσιμότητας.....	48
3. Αποτελέσματα.....	49
3.1 Η υπερέκφραση των <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> και <i>Cdc6</i> τείνει να αυξήσει τα επίπεδα οξειδωτικού στρες στο έντομο <i>Drosophila melanogaster</i> .....	49
3.2 Η δομή των μιτοχονδρίων φαίνεται να επηρεάζεται περισσότερο στα διαγονιδιακά έντομα <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> σε σχέση με τα έντομα που υπερεκφράζουν το <i>Cdc6</i> .....	50
3.3 Η καθολική υπερέκφραση των <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> και <i>Cdc6</i> ρυθμίζει με διαφορετικό τρόπο την ενεργότητα του 26S πρωτεασώματος.....	51
3.4 Η υπερέκφραση των <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> και <i>Cdc6</i> προκαλεί αντίθετη απόκριση στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος (Autophagy-Lysosome Pathway, ALP).....	52
3.5 Τα διαγονιδιακά έντομα <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> όπως και τα διαγονιδιακά έντομα <i>Cdc6</i> επηρεάζουν την έκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων.....	52
3.6 Η υπερέκφραση των <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> και <i>Cdc6</i> οδηγεί σε απορρύθμιση των πρωτεασωμικών υπομονάδων και σε συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών.....	54
3.7 Η υπερέκφραση των <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> και <i>Cdc6</i> οδηγεί σε συσσώρευση βλαβών στο γενετικό υλικό.....	55

3.8 Τα αυξημένα επίπεδα του <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> προκαλούν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας ενώ η υπερέκφραση του <i>Cdc6</i> επηρεάζει σε μικρό βαθμό το προσδόκιμο ζωής στα έντομα <i>Drosophila melanogaster</i> .....	57
3.9 Η συνδυαστική υπερέκφραση των <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> , <i>cncC</i> και των <i>Cdc6</i> , <i>cncC</i> στο έντομο <i>Drosophila melanogaster</i> τείνει να μειώνει το οξειδωτικό στρες.....	57
3.10 Τα διαγονιδιακά <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> και <i>Cdc6</i> παρουσιάζουν αυξημένη ενεργότητα του 26S πρωτεασώματος ύστερα από την υπερέκφραση του <i>cncC</i> .....	58
3.11 Η υπερέκφραση του <i>cncC</i> στα έντομα <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> και <i>Cdc6</i> τείνει να οδηγεί σε αύξηση της λυσοσωμικής τους ενεργότητας.....	59
3.12 Το <i>cncC</i> ρυθμίζει την έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων και αυξάνει τη συγκέντρωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών στα διαγονιδιακά <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> και στα διαγονιδιακά <i>Cdc6</i> έντομα.....	60
3.13 Η συνδυαστική υπερέκφραση του <i>cncC</i> στα διαγονιδιακά έντομα <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> και <i>Cdc6</i> τείνει να μειώνει τα επίπεδα των γενωμικών βλαβών.....	62
3.14 Η ενεργοποίηση του <i>cncC</i> βελτιώνει την ποιότητα ζωής στα διαγονιδιακά έντομα <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> αλλά αυξάνει την θνησιμότητα στα διαγονιδιακά <i>Cdc6</i> .....	63
3.15 Η ιστοειδική έκφραση των γονιδίων <i>Ras85D<sup>v12</sup></i> και <i>Cdc6</i> στον οφθαλμό του εντόμου <i>Drosophila melanogaster</i> προκαλεί αλλοιώσεις στην αρχιτεκτονική της δομής του.....	64
4. Συζήτηση.....	67
5. Βιβλιογραφία.....	71
Παράρτημα.....	85

## Πρόλογος

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με θέμα “Μελέτη των μηχανισμών πρωτεόστασης και της μιτοχονδριακής λειτουργίας κατά τη γήρανση”, πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής στα πλαίσια της διπλωματικής μου εργασίας στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ). Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την ευκαιρία που μου έδωσε να παρευρεθώ στο εργαστήριο του. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην Μεταδιδάκτορα Sentiljana Gumeni, η οποία ανέλαβε όχι μόνο να μου μάθει όλα όσα ήταν απαραίτητα για την πραγματοποίηση της εργασίας μου αλλά και να βρίσκεται εκεί σε ό,τι κι αν χρειαζόμουν. Την ευχαριστώ για όλο τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε, την τεράστια υπομονή της στο να με ηρεμεί όταν χρειαζόταν αλλά και την ψυχραιμία της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ελένη-Δήμητρα Παπανάγνου (Μεταδιδάκτωρ), την Μαρία Μανωλά (υποψήφια Διδάκτωρ) και την Ζωή Ευαγγελάκου (υποψήφια Διδάκτωρ) για τις πολύτιμες συμβουλές αλλά και τις γνώσεις που μου προσέφεραν από την αρχή της εργασίας μου καθημερινά στον χώρο του εργαστηρίου αλλά και εκτός αυτού. Επίσης, την Αιμιλία Σκληρού (Μεταδιδάκτωρ), την Χριστίνα-Μαρία Χειμωνίδη και την Δέσποινα Γιαννιού για την βοήθειά τους όποτε τη χρειαζόμουν και φυσικά για το όμορφο κλίμα. Τέλος, όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, την Αλεξάνδρα Ραφελέτου (προπτυχιακή φοιτήτρια) που ήταν και συνοδοιπόρος μου σε αυτό το ταξίδι, την Ξανθίππη, τον Γιώργο, την Ιωάννα και την Όλγα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής όπου διεξήχθη η παρούσα εργασία, τον Διευθυντή του Τομέα κύριο Ιωάννη Τρουγκάκο για ακόμη μία φορά, φυσικά όλα τα μέλη ΔΕΠ και όλα τα υπόλοιπα μέλη που τον απαρτίζουν.

Ένα ακόμη μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς στην Καλλιόπη Ατσόνιου και Άννα Ντελή για την αγάπη και την στήριξή τους όλο αυτό το διάστημα.

Κλείνοντας, το τελευταίο ευχαριστώ αξίζει να ειπωθεί στην οικογένειά μου, τους φίλους μου και όλους αυτούς που εδώ και χρόνια με στηρίζουν σε κάθε βήμα μου. Σε όλους αυτούς, αφιερώνω και την εργασία αυτή.

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Γήρανση

Η γήρανση είναι μια διαδικασία ενδογενούς επιδείνωσης που αντανακλάται στο επίπεδο του πληθυσμού ως αύξηση της πιθανότητας θανάτου και μείωση της παραγωγής των απογόνων<sup>1</sup>. Η γήρανση ρυθμίζεται τόσο από τα γονίδια όσο και από το περιβάλλον<sup>1</sup>. Κατά τη γήρανση, τα βιολογικά μακρομόρια, συμπεριλαμβανομένων λιπιδίων, πρωτεϊνών και DNA, συσσωρεύουν διαφόρων μορφών βλάβες που μπορούν να προκαλέσουν δυσλειτουργία στα κυτταρικά οργανίδια και ιδιαίτερα στα μιτοχόνδρια<sup>2</sup>.

Η κατανόηση των κυτταρικών και των μοριακών μηχανισμών της γήρανσης εξακολουθεί να αποτελεί ένα από τα πιο πολύπλοκα και πολυπαραγοντικά ζητήματα που αφορούν τις βιοεπιστήμες. Η προσπάθεια του Medvedev (Medvedev, 1990) να κατηγοριοποιήσει τις υποθέσεις που είχαν γίνει έως τότε, κατέληξε σε μία λίστα περισσότερων από 300 θεωριών σχετικά με τη γήρανση. Οι οργανισμοί μοντέλα που χρησιμοποιούνται στη μελέτη της γήρανσης (σκουλήκια, μύγες, ποντίκια) έχουν συμβάλει στην ραγδαία ανάπτυξη του συγκεκριμένου πεδίου της έρευνας. Οι López-Otín et al.<sup>3</sup>, σε μια τελευταία ανασκόπηση, πρότειναν εννέα κυτταρικά και μοριακά ορόσημα που συμβάλλουν και χαρακτηρίζουν τη γήρανση, συμπεριλαμβανομένων των εξής: **(1)** γενετική αστάθεια, **(2)** φθορά των τελομερών, **(3)** επιγενετικές αλλοιώσεις, **(4)** απώλεια της πρωτεόστασης, **(5)** απορρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών ανίχνευσης θρεπτικών συστατικών, **(6)** μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, **(7)** κυτταρική γήρανση, **(8)** εξάντληση των βλαστικών κυττάρων και **(9)** αλλοιωμένη διακυτταρική επικοινωνία, όπως υποδεικνύονται στην παρακάτω (Εικόνα 1.1). Αυτά τα χαρακτηριστικά οδηγούν σε προοδευτική μειωμένη κυτταρική λειτουργία η οποία τελικά οδηγεί σε απώλεια της οργανισμικής ακεραιότητας και σε αύξηση της νοσηρότητας<sup>4</sup>.



**Εικόνα 1.1: Τα ορόσημα της γήρανσης.** Στην εικόνα φαίνονται τα εννέα ορόσημα που συνεισφέρουν στην διαδικασία της γήρανσης. Πρόκειται για τη γενωμική αστάθεια, τη φθορά των τελομερών, τις επιγενετικές τροποποιήσεις, την έλλειψη της πρωτεόστασης, την απορρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών ανίχνευσης θρεπτικών συστατικών, τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, την κυτταρική γήρανση, την εξάντληση των βλαστοκυττάρων και την αλλοιωμένη διακυτταρική επικοινωνία<sup>5</sup>.

### 1.1.1 Γενωμική αστάθεια

Η ακεραιότητα και η σταθερότητα του γενετικού υλικού υφίσταται διαρκώς προκλήσεις τόσο από εξωγενείς φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς στρεσογόνους παράγοντες, αλλά και από ενδογενείς στρεσογόνους παράγοντες, όπως λάθη κατά την αντιγραφή του DNA, αυτόματες υδρολυτικές αντιδράσεις και δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Οι γενετικές αλλοιώσεις από τέτοιους παράγοντες είναι ποικίλες και συμπεριλαμβάνουν σημειακές μεταλλαγές, μετατοπίσεις, χρωμοσωμικές αλλαγές, μείωση του μήκους των τελομερών και γονιδιακή αποσιώπιση με παρεμβολή στοιχείων (ενθέσεις μεταθετών στοιχείων, παρεμβολή ιϊκού γενετικού

υλικού κ.ά.)<sup>6</sup>. Η γενωμική αστάθεια προκύπτει από την ανισορροπία μεταξύ των βλαβών και της επιδιόρθωσης του DNA<sup>7</sup>. Όλες αυτές οι αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό επηρεάζουν βασικά γονίδια και διάφορα μεταγραφικά μονοπάτια οδηγώντας σε δυσλειτουργικά κύτταρα, τα οποία αν δεν εξαλειφθούν είτε με απόπτωση είτε με γήρανση θα αποτελέσουν κίνδυνο για την ομοιόσταση των ιστών και των οργάνων<sup>8</sup>.

Ένα κοινό χαρακτηριστικό της γήρανσης είναι η συσσώρευση βλαβών στο DNA κατά τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού<sup>9</sup>. Οι οργανισμοί, στην προσπάθειά τους να μειώσουν τη συσσώρευση τέτοιων αλλοιώσεων στο γενετικό υλικό, έχουν αναπτύξει ένα πολύπλοκο δίκτυο μηχανισμών επιδιόρθωσης των βλαβών του πυρηνικού DNA<sup>10</sup>. Έχει αποδειχθεί η αιτιώδης σχέση ανάμεσα στην αύξηση βλαβών του γενετικού υλικού και στην γήρανση. Μελέτες σε ποντίκια και ανθρώπους δείχνουν πως η ανεπάρκεια των μηχανισμών επιδιόρθωσης προκαλεί επιταχυνόμενη γήρανση και αποτελούν τη βάση για σχετικά σύνδρομα<sup>11-13</sup>.

Τα συστήματα γενωμικής σταθερότητας περιλαμβάνουν ειδικούς μηχανισμούς για τη διατήρηση του κατάλληλου μήκους και της λειτουργικότητας των τελομερών αλλά και για τη διασφάλιση της ακεραιότητας του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA)<sup>14</sup>.

Οι μεταλλαγές και ελλείψεις στο μιτοχονδριακό DNA μπορεί να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη της γήρανσης<sup>15</sup>. Το mtDNA έχει θεωρηθεί κύριος στόχος ηλικιο-εξαρτώμενων σωματικών μεταλλαγών εξαιτίας του οξειδωτικού μικροπεριβάλλοντος των μιτοχονδρίων, της έλλειψης προστατευτικών ιστονών στο mtDNA αλλά και της περιορισμένης απόδοσης των μηχανισμών επιδιόρθωσης συγκριτικά με το πυρηνικό DNA<sup>16</sup>. Ωστόσο, η εμπλοκή των μεταλλαγών του mtDNA στη γήρανση είναι αμφιλεγόμενη εξαιτίας των πολλαπλών αντιγράφων του mtDNA που επιτρέπει τη συνύπαρξη μεταλλαγμένων και άγριου τύπου αντιγράφων μέσα στο ίδιο κύτταρο, ένα φαινόμενο που καλείται ετεροπλασμία<sup>17</sup>. Ωστόσο, οι περισσότερες μεταλλαγές του mtDNA σε γηρασμένα κύτταρα ή κύτταρα ενήλικης φάσης φαίνεται να προκαλούνται από λάθη κατά την αντιγραφή του γενετικού υλικού στα πρώτα στάδια της ζωής παρά από το οξειδωτικό στρες. Οι μεταλλαγές αυτές πιθανά να υφίστανται πολυκλωνική εξάπλωση και να προκαλούν τη δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας σε διάφορους ιστούς<sup>18</sup>.

Οι συσσωρευμένες βλάβες στο DNA εμπλέκονται άμεσα στην καρκινογένεση αλλά και σε άλλες διαταραχές που σχετίζονται με τη γήρανση, όπως οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες<sup>19</sup>.



### 1.1.2 Μείωση μήκους τελομερών

Τα τελομερή είναι επαναλαμβανόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που προστατεύουν τα άκρα των χρωμοσωμάτων και διατηρούν τη γονιδιωματική σταθερότητα. Οι DNA πολυμεράσες αδυνατούν να αντιγράψουν επιτυχώς τα άκρα των γραμμικών μορίων DNA, μια λειτουργία που συντελείται από μία ειδική DNA πολυμεράση γνωστή ως τελομεράση. Παρόλα αυτά, τα περισσότερα σωματικά κύτταρα των θηλαστικών δεν εκφράζουν την τελομεράση και αυτό οδηγεί σε σταδιακή μείωση των τελομερών<sup>20,21</sup>

Τα τελομερή έχουν δεσμευμένο ένα χαρακτηριστικό πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο γνωστό ως σελετερίνη<sup>22</sup>. Η κύρια λειτουργία αυτού του συμπλόκου είναι να παρεμποδίζει την πρόσβαση των επιδιορθωτικών ενζύμων στα τελομερή, διαφορετικά οι αλληλουχίες αυτές θα αναγνωρίζονταν ως θραύσματα του DNA και θα επιδιορθώνονταν οδηγώντας σε χρωμοσωμικές συντήξεις<sup>22,23</sup>.

Η δυσλειτουργία των τελομερών φαίνεται να έχει κρίσιμη σημασία για τη γήρανση σε κυτταρικό επίπεδο<sup>19</sup>. Εξαιτίας της περιορισμένης αυτής επιδιόρθωσης, οι βλάβες στις τελομερικές αλληλουχίες συσσωρεύονται και είναι ικανές να επάγουν τα φαινόμενα της γήρανσης και/ή της απόπτωσης<sup>14</sup>. Η έλλειψη των τελομερών εξηγεί και την περιορισμένη αναπαραγωγική ικανότητα κάποιων τύπων κυττάρων σε καλλιέργειες *in vitro*, γνωστή ως αναπαραγωγική γήρανση ή αλλιώς όριο Hayflick<sup>21,24</sup>.

### 1.1.3 Διαταραχή της πρωτεόστασης

Το δίκτυο της πρωτεόστασης (Δ.Π.) είναι υπεύθυνο για την ακεραιότητα της λειτουργίας και της δομής των πρωτεϊνών. Το Δ.Π. αποτελείται από ένα σύνολο παραγόντων και διευθύνει αυστηρά τη σύνθεση, την αναδίπλωση, τη μετακίνηση και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα, όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα, πετυχαίνοντας έτσι τη διατήρηση της πρωτεόστασης στο σύνολο του κυττάρου<sup>25</sup>. Η επιτυχής επιδιόρθωση ή αποικοδόμηση λανθασμένα αναδιπλωμένων ή μη λειτουργικών (μη-ενζυματικά τροποποιημένων) πρωτεϊνικών μορίων, τα οποία τείνουν να δημιουργούν τοξικά συσσωματώματα, αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του κυττάρου έναντι του πρωτεοτοξικού στρες αποτρέποντας την συσσώρευση τοξικών ολιγομερών και εξασφαλίζοντας τη συνεχή ανανέωση των ενδοκυττάρων συστατικών<sup>5</sup>. Το Δ.Π. είναι ειδικά σχεδιασμένο τόσο ως προς τη στελέχωση όσο και ως προς την ενεργότητά του ώστε να προσαρμόζεται στις εκάστοτε πρωτεϊνικές ανάγκες του κυττάρου και να επαναφέρει την ισορροπία ύστερα από την επίδραση κυρίως οξειδωτικού και θερμικού

στρες<sup>26,27</sup>. Παρ' όλα αυτά, αλλαγές στη φυσιολογία του οργανισμού, η έκθεση σε περιβαλλοντικό στρες και τελικά η γήρανση οδηγούν σε έκπτωση της ενεργότητας του Δ.Π. και σε απορρύθμιση της πρωτεόστασης<sup>28</sup>. Παράλληλα, μειώνεται η ικανότητα των κυττάρων να διαχειριστούν τις συσσωρευμένες επιβλαβείς πρωτεΐνες, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες εμφάνισης και εξέλιξης ασθενειών που σχετίζονται ή επιταχύνονται με το γήρας, όπως η νόσος Alzheimer's, η νόσος Parkinson's και ο καταρράκτης<sup>29,30</sup>.

Έτσι, οι βασικοί μηχανισμοί διατήρησης της πρωτεόστασης είναι:

#### • Η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης

Το πρώτο βήμα για την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας σχηματισμού πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και κατ' επέκταση παθογένειας είναι η αποφυγή της δημιουργίας ελαττωματικών μορίων. Το πρώτο σημείο ελέγχου, λοιπόν, είναι η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης, η οποία φαίνεται να συμβάλει καταλυτικά στην προώθηση της μακροβιότητας<sup>31</sup>. Η συγκεκριμένη ρύθμιση επιτυγχάνεται μέσω των ριβοσωμάτων και άλλων παραγόντων που ελέγχουν τη σύνθεση των εκκλαπτόμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων<sup>25</sup>. Η ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης περιλαμβάνει τη ρύθμιση του ρυθμού της πρωτεϊνοσύνθεσης<sup>32,33</sup>, την ικανότητα των tRNA συνθετασών να απομακρύνουν λανθασμένα, ενσωματωμένα αμινοξέα από το ενεργό τους κέντρο<sup>34</sup>, την ικανότητα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων να αναδιπλώνονται πριν ακόμα ολοκληρωθεί η πρωτεϊνοσύνθεση με τη βοήθεια μοριακών συνοδών<sup>33</sup> και τέλος τον έλεγχο της ποιότητας των νεοσυντιθέμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων μέσω της ακεραιότητας της δομής και της λειτουργίας των ίδιων των ριβοσωμάτων<sup>35</sup>.

#### • Η ρύθμιση της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών

Όπως προαναφέρθηκε, η αναδίπλωση των εκκλαπτόμενων πολυπεπτιδικών αλυσίδων μπορεί να γίνεται μετά την ολοκλήρωση ή παράλληλα με τη διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Βασικό ρόλο στην σωστή αναδίπλωση των μορίων και κατ' επέκταση στη διατήρηση της κυτταρικής πρωτεόστασης κατέχει το δίκτυο των μοριακών συνοδών (molecular chaperones)<sup>36</sup>. Η απόκριση σε θερμικό, οξειδωτικό και οσμωτικό στρες που μπορεί να προκαλέσει χαλάρωση στην αναδίπλωση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, ξεκινά με την ενεργοποίηση του παράγοντα θερμικού στρες 1 (Heat shock factor 1-Hsf1), ο οποίος τριμερίζεται και μετακινείται στον πυρήνα, όπου προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες των υποκινητών γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες του θερμικού στρες (Heat shock protein-Hsps)<sup>37</sup>. Οι πρωτεΐνες θερμικού στρες Hsp70 (Heat shock protein 70) και Hsp90 (Heat shock protein 90) είναι μοριακές συνοδοί που επιτρέπουν τη σύνδεση σε αυτές επιπλέον μοριακών συνοδών (co-chaperones),

δημιουργώντας σύμπλοκα που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, αποφεύγοντας έτσι την δημιουργία συσσωματωμάτων<sup>38</sup>. Η λειτουργική αλληλεπίδραση του πρωτεασώματος και των μοριακών συνοδών ως απόκριση στο στρες, δεν περιορίζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα αλλά επεκτείνεται και σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα. Χαρακτηριστικά η ομοιόσταση του ενδοπλασματικού δικτύου φυλάσσεται από τη συσσώρευση μη σωστά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο μονοπάτι UPR (Unfolded Protein Response-UPR<sup>ER</sup>)<sup>39</sup>, όπου με τη διαμεσολάβηση μιας σειράς μοριακών συνοδών (BiP-Binding immunoglobulin Protein, PDI), των E3 λιγασών που εντοπίζονται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου, καθώς και του συμπλόκου p97/VCP (Valosin-Containing Protein)/Cdc48 που έχει δράση μοριακής συνοδού, το υπόστρωμα προωθείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα<sup>40-42</sup>

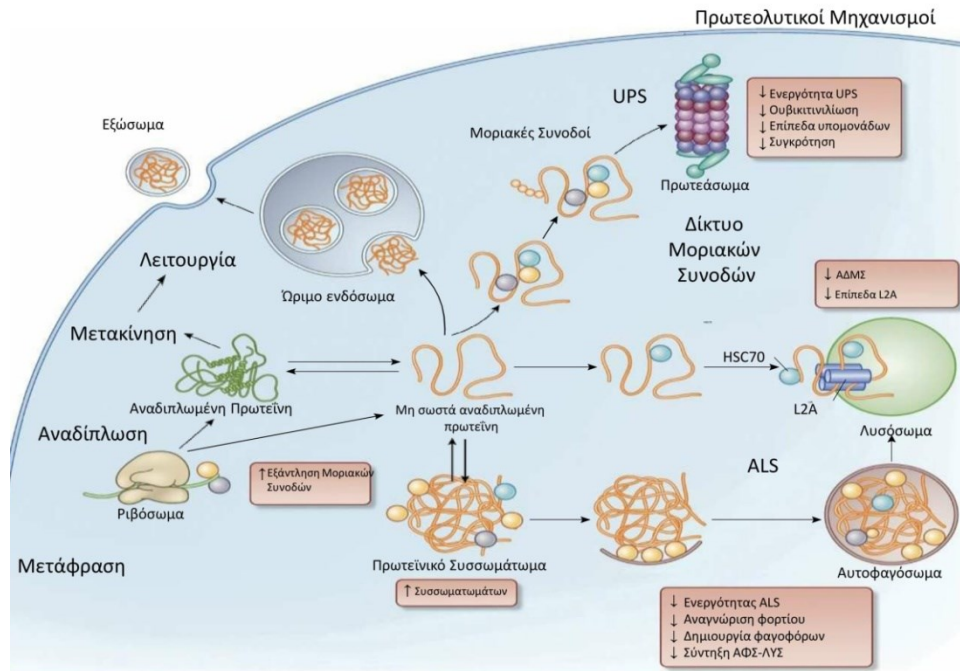
#### • Η ρύθμιση της μετακίνησης των πρωτεϊνών

Αφού ολοκληρωθεί η πρωτεϊνοσύνθεση, οι πρωτεΐνες μετακινούνται εντός του κυτταροπλάσματος μέσω των βιολογικών μεμβρανών, καθώς και μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών διαμερισμάτων. Η ενδοκυτταρική πρωτεϊνική μεταφορά και ο ποιοτικός έλεγχος του συγκεκριμένου μηχανισμού αποτελούν μία προϋπόθεση για τη σωστή κυτταρική δομή και λειτουργία καθώς εξασφαλίζουν τη σωστή διανομή των πρωτεϊνών στο κατάλληλο υποκυτταρικό διαμέρισμα και διατηρούν την εκάστοτε πρωτεΐνη στα καθορισμένα επίπεδα με μεγάλη ακρίβεια<sup>43</sup>. Η απορρύθμιση της πρωτεϊνικής μεταφοράς έχει συνδεθεί με την εκδήλωση πολλών ασθενειών. Η θέση στόχος της εκάστοτε πρωτεΐνης καθορίζεται από σινιάλα μεταφοράς (αλληλουχίες στο εσωτερικό, το καρβοξύ- ή/και το αμινο-τελικό τους άκρο) και στην περίπτωση που αυτά απουσιάζουν η νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη παραμένει στο κυτταρόπλασμα. Η μεταφορά ξεκινά από τα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος είτε παράλληλα με την πρωτεϊνοσύνθεση, σε περίπτωση που οι πρωτεΐνες ακολουθήσουν το μονοπάτι για την έκκρισή τους, όπου θα διασχίσουν το ενδοπλασματικό δίκτυο, την συσκευή Golgi και θα καταλήξουν στην κυτταρική μεμβράνη είτε αμέσως μετά τη σύνθεση στις περιπτώσεις που οι πρωτεΐνες θα αξιοποιηθούν εντός του κυττάρου, όπως στα μιτοχόνδρια, στα υπεροξειδωμάτια και το εσωτερικό του πυρήνα<sup>43</sup>.

#### • Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών

Η αποικοδόμηση των βλαβερών, πρωτεοτοξικών μορίων πραγματοποιείται μέσω πρωτεολυτικών μονοπατιών, τα οποία αποτελούν και το βασικότερο μηχανισμό διατήρησης της πρωτεόστασης. Η αποικοδόμηση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται είτε μέσω των μονοπατιών αποικοδόμησης, όπως το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος

(Ubiquitin-Proteasome Pathway- UPP) και αυτοφαγίας-λυσosώματος (Autophagy-Lysosome Pathway- ALP) ή μέσω κυτταρικών πρωτεασών<sup>44</sup>. Καθώς η συγκεκριμένη εργασία επικεντρώνεται στους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς, οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί θα αναλυθούν εκτενέστερα στη συνέχεια.



**Εικόνα 1.2: Ενδοκυτταρικά επίπεδα ποιοτικού ελέγχου πρωτεϊνών και αλλαγές στο πρωτεοστατικό δίκτυο κατά τη γήρανση.** Οι μοριακές συνοδοί και τα πρωτεολυτικά συστήματα αποτελούν τους βασικούς μηχανισμούς του κυττάρου για την εξουδετέρωση του πρωτεοστατικού στρες. Το δίκτυο των μοριακών συνοδών συμμετέχει στην de novo σύνθεση των πρωτεϊνών και στην επιδιόρθωση λανθασμένα αναδιπλωμένων μορίων. Στην περίπτωση που η βλάβη δεν μπορεί να επιδιορθωθεί, οι μοριακές συνοδοί στοχεύουν τα επιζήμια μόρια για αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος ή του λυσosώματος. Μονές υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες εισέρχονται στο λυσosώμα μέσω μεμβρανικών υποδοχών κατά την αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη μέσω μοριακών συνοδών (ΑΔΜΣ). Όταν οι λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες σχηματίσουν ολιγομερή ή μη υδατοδιαλυτά συσσωματώματα τότε το κύτταρο μπορεί να τις εξαλείψει μόνο είτε μέσω μακροφαγίας (αυτοφαγόσωμα ΑΦΣ-λυσosώμα ΛΥΣ) ή με τον εγκλεισμό τους σε κυστίδια και την αποβολή τους στον εξωκυτταρικό χώρο (μεγάλα πολυκυστιδιακά ενδοσώματα- εξωσώματα). Στα κόκκινα κουτιά αναφέρονται αλλαγές στο σύστημα πρωτεόστασης κατά τη γήρανση. (προσαρμογή από Kaushik and Cuervo, 2015).

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι η ανάγκη του κύτταρου για επιβίωση έχει οδηγήσει και σε μια δεύτερη γραμμή άμυνας σε περιπτώσεις όπου το Δ.Π. έχει αποτύχει να εξουδετερώσει αποτελεσματικά και άμεσα τη βλάβη. Συγκεκριμένα, για να ανταπεξέλθει στην συσσώρευση των επιβλαβών και συσσωματωμένων πρωτεϊνών, το κύτταρο έχει αναπτύξει την ικανότητα να απομονώνει τα τοξικά ολιγομερή και τα πρωτεϊνικά συσσωματώματα σε μεγάλα κυτταροπλασματικά έγκλειστα σε συγκεκριμένες, καλά προστατευόμενες, ενδοκυττάριας περιοχές. Η χωρική απομόνωση της βλάβης υποβοηθά την διατήρηση της πρωτεόστασης τόσο μέσω του Δ.Π. αλλά και σε ακραίες περιπτώσεις με τον ασύμμετρο διαχωρισμό των βλαβερών πρωτεϊνών κατά την κυτταρική διαίρεση, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα σε ένα γηρασμένο μητρικό κύτταρο να δημιουργήσει ένα άθικτο θυγατρικό κύτταρο με πλήρως αναζωογονημένο πρωτέωμα<sup>45</sup>.

### **1.1.3.1. Πρωτεολυτικοί μηχανισμοί**

Η πρωτεοτοξικότητα αναφέρεται στις δυσμενείς επιπτώσεις που έχουν οι λάθος αναδιπλωμένες ή κατεστραμμένες πρωτεΐνες στο κύτταρο. Οπότε κρίνεται απαραίτητο ένα σύστημα που αναγνωρίζει και αποικοδομεί τα συγκεκριμένα επιζήμια μόρια<sup>46</sup>. Καθοριστικό ρόλο, λοιπόν, στη διατήρηση της πρωτεόστασης κατέχουν οι κυτταρικοί πρωτεολυτικοί μηχανισμοί της ALP και της UPP αποικοδόμησης<sup>5</sup>. Η ενεργότητα και αποδοτικότητα των μονοπατιών πρωτεόλυσης (ALP και UPP) έχειδειχθεί ότι φθίνει κατά τη γήρανση, γεγονός που ενισχύει την πιθανότητα εμφάνισης ασθενειών του γήρατος, καθώς και ανωμαλιών στο μεταβολισμό<sup>47</sup>.

#### **1.1.3.1.1 Μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος**

##### **(Autophagy-Lysosome Pathway, ALP)**

Το μονοπάτι ALP αποικοδομεί μη λειτουργικά οργανίδια, πρωτεϊνικά συσσωματώματα και πρωτεΐνες με μεγάλο χρόνο ζωής. Διακρίνεται στη μακροαυτοφαγία, τη μικροαυτοφαγία και την αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη μέσω μοριακών συνοδών. Η μακροαυτοφαγία αποικοδομεί μεγάλα οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια, λιπосώματα, συσσωματώματα πρωτεϊνών και ξένους οργανισμούς (ιούς) με τη δημιουργία αυτοφαγοσώματων. Τα αυτοφαγοσώματα αποτελούνται από διπλή μεμβράνη και σχηματίζονται από τη συμμετοχή των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αυτοφαγία, γνωστές ως Atgs (Autophagy related proteins)<sup>48</sup>. Η μικροαυτοφαγία

αποικοδομεί μικρότερα οργανίδια και κάποιες πρωτεΐνες με τη βοήθεια της πρωτεΐνης Hsc70. Τέλος, η αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη μέσω μοριακών συνοδών, αποικοδομεί πρωτεΐνες με τη βοήθεια μοριακών συνοδών, οι οποίες αναγνωρίζουν τη μη λειτουργική πρωτεΐνη από ένα μοτίβο αναγνώρισης που αυτή φέρει. Όλα τα μη λειτουργικά οργανίδια και πρωτεΐνες καταλήγουν στο λυσοσώμα είτε με σύντηξη της μεμβράνης των αυτοφαγοσωμάτων με αυτή του λυσοσώματος είτε με εγκόλπωση ή μέσω ειδικών συμπλόκων μεταφοράς<sup>48</sup>.

#### **1.1.3.1.2 Μονοπάτι ουβικιτίνης- πρωτεασώματος (Ubiquitin-Proteasome Pathway, UPP)**

Το μονοπάτι UPP είναι ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο σύστημα που αποικοδομεί το 80-90% των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών που είτε έχουν αναδιπλωθεί λανθασμένα, είναι οξειδωμένες ή έχουν μικρό χρόνο ζωής και οι οποίες έχουν σημανθεί με την πρωτεΐνη ουβικιτίνη. Επίσης, το σύστημα αυτό συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής σηματοδότησης, του κυτταρικού θανάτου, των αποκρίσεων του ανοσοποιητικού συστήματος, του μεταβολισμού, του κυτταρικού κύκλου και της ανάπτυξης<sup>27,49</sup>. Το UPP αποτελείται από έξι βασικά συστατικά: την ουβικιτίνη (Ubiquitin-Ub), το ένζυμο που ενεργοποιεί την ουβικιτίνη (E1), μια ομάδα ενζύμων που προσδέουν την ουβικιτίνη (E2), μια μεγαλύτερη ομάδα από λιγάσες της ουβικιτίνης (E3), το πρωτεασώμα και τις αποουβικιτινάσες (DeUbiquitinases - DUBs). Η αποικοδόμηση πρωτεϊνών από το UPP είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία που εμπλέκει δύο διακριτά βήματα: i) την ουβικιτινίωση και ii) την πρωτεασωματική δράση<sup>49</sup>.

#### **• Το σύστημα της ουβικιτίνης και τα ένζυμα σύζευξης της ουβικιτίνης**

Η ουβικιτίνη (Ubiquitin-Ub) είναι μια μικρή πρωτεΐνη 76 αμινοξέων, που μπορεί να σχηματίσει διαφορετικού μήκους αλυσίδες, στις οποίες τα μόρια ουβικιτίνης μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους στις εξής θέσεις καταλοίπων λυσίνης (Lys-K) 6, 11, 27, 29, 33, 48 και 63<sup>50</sup>. Επίσης, η μεθειονίνη στο αμινοτελικό άκρο μιας ουβικιτίνης μπορεί να συνδεθεί με το μοτίβο διγλυκίνης (diglycine) στο καρβοξυτελικό άκρο μιας άλλης ουβικιτίνης. Η ουβικιτίνη προσδέεται στις πρωτεΐνες είτε ως μονομερές ή με τη μορφή μιας αλυσίδας πολουβικιτίνης, μέσω μιας ενζυματικής αντίδρασης (μια διαδικασία

γνωστή ως ουβικτινιλίωση), ρυθμίζοντας έτσι τη «μοίρα» των πρωτεϊνών τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα<sup>51</sup>.

Η σύνδεση της ουβικτινίνης στις πρωτεΐνες είναι ATP (Adenosine TriPhosphate) εξαρτώμενη και διαμεσολαβείται από μια σειρά ενζύμων. Συγκεκριμένα, η ουβικτινίνη ενεργοποιείται από την κατανάλωση ATP από το ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικτινίνης E1 και μεταφέρεται στο ενεργό κέντρο του καταλοίπου κυστεΐνης (Cys) του ενζύμου E1. Έπειτα η ενεργοποιημένη ουβικτινίνη μεταφέρεται στο ενεργό κέντρο της οικογένειας των ενζύμων σύζευξης της ουβικτινίνης E2. Τελικά, οι λιγάσες της ουβικτινίνης, γνωστές ως E3, συνδέουν την καρβοξυλική ομάδα του καρβοξυτελικού άκρου του καταλοίπου γλυκίνης της ουβικτινίνης με την ε-αμινοομάδα μιας λυσίνης του υποστρώματος-πρωτεΐνης στόχου<sup>52</sup>. Οι λιγάσες της ουβικτινίνης έχειδειχθεί ότι αλληλεπιδρούν με μοριακές συνοδούς και εμπλέκονται έτσι στη διατήρηση της πρωτεόστασης<sup>53,54</sup>, καθώς και ότι εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής ανάπτυξης και της διαφοροποίησης<sup>55</sup>. Τέλος, η ουβικτινιλίωση των πρωτεϊνών είναι μια σημαντική διεργασία και για το ενδοπλασματικό δίκτυο άλλα και για το μιτοχόνδριο προκειμένου να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που έχουν υποστεί βλάβη και βρίσκονται εσωτερικά στα συγκεκριμένα οργανίδια (θα αναφερθεί παρακάτω).

- Η «μοίρα» των ουβικτινιωμένων πρωτεϊνών

Ο συνδυασμός των E2 και E3 ενζύμων, τα οποία καταλύουν το σχηματισμό της αλυσίδας ουβικτινίνης και αφορά είτε σε μονοουβικτινιλίωση (προσθήκη ενός μορίου ουβικτινίνης στο υπόστρωμα) ή σε πολυουβικτινιλίωση (προσθήκη αλυσίδας ουβικτινίνης στο υπόστρωμα), μαζί με τη δομή πρόσδεσης της ουβικτινίνης (Ubiquitin Binding Domain-UBD) που διαθέτουν οι πρωτεΐνες, ρυθμίζει τη «μοίρα» των πρωτεϊνών-στόχων<sup>56</sup>. Το μήκος της αλυσίδας ουβικτινίνης εμπλέκεται στον προορισμό που θα ακολουθήσει η σημασμένη πρωτεΐνη. Παρόλο που μια αλυσίδα πολλών μορίων ουβικτινίνης (πολυουβικτινίνης) αφορά πρωτεΐνες που προορίζονται για αποικοδόμηση από το πρωτεάσωμα, η ουβικτινιλίωση εμπλέκεται και σε άλλες κυτταρικές διεργασίες, όπως στις αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος, την ενδοκυττάρωση των πρωτεϊνών και την ενδοκυτταρική μεταφορά, τη ρύθμιση της μεταγραφής, καθώς και την επιδιόρθωση του DNA<sup>57</sup>. Η μονοουβικτινιλίωση φαίνεται να είναι από τα πρώτα σήματα για την ενδοκυττάρωση των υποδοχέων κινάσης τυροσίνης, καθώς και για την αποικοδόμηση μέσω του λυσοσώματος<sup>58</sup>, αν και έχειδειχθεί πως συμμετέχει επίσης στη ρύθμιση της μεταγραφής, καθώς και στην τροποποίηση ιστονών<sup>59</sup>.

Η πιο συχνή πρωτεϊνική σήμανση με ουβικιτίνη είναι η αλυσίδα πολλών μορίων ουβικιτίνης, τα οποία έχουν συνδεθεί μεταξύ τους στο κατάλοιπο λυσίνη 48 (K-48). Η τροποποίηση αυτή αφορά πρωτεΐνες που προορίζονται για αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος, όπως για παράδειγμα μικρού χρόνου ζωής πρωτεΐνες που παίζουν βασικό ρόλο κατά τον κυτταρικό κύκλο<sup>52</sup>. Επιπλέον, η αλυσίδα πολλών μορίων ουβικιτίνης, τα οποία έχουν συνδεθεί μεταξύ τους στο κατάλοιπο λυσίνη 11 ή 29 (K-11 ή K-29) αποτελεί τροποποίηση που στοχεύει πρωτεΐνες για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα<sup>57,60,61</sup>. Τέλος, πρόσφατα έχει βρεθεί ένας νέος τύπος αλυσίδας ουβικιτίνης, στον οποίο το καρβοξυτελικό άκρο της ουβικιτίνης συνδέεται με την α-αμινομάδα του αμινοτελικού άκρου της μεθειονίνης ενός άλλου μορίου ουβικιτίνης δημιουργώντας μια γραμμική αλυσίδα πολυουβικιτίνης<sup>62</sup>.

Η απελευθέρωση της ουβικιτίνης είναι πολύ σημαντική τόσο για την πρωτεϊνική αποικοδόμηση όσο και για τη σύνθεση της ουβικιτίνης. Ειδικά ένζυμα αποουβικιτινιλίωσης (DeUBiquitinating enzymes-DUBs) συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία, καθώς υδρολύουν αμίδια και εστέρες στο καρβοξυτελικό άκρο της ουβικιτίνης. Μερικά DUBs απελευθερώνουν την ουβικιτίνη πριν την αναγνώριση από το πρωτεάσωμα με αποτέλεσμα την αναστολή της αποικοδόμησης. Ένας ακόμη ρόλος των DUBs είναι να ρυθμίζουν τα επίπεδα της ελεύθερης ουβικιτίνης και της συζευγμένης μορφή της<sup>63,64</sup>.

- **Πρωτεάσωμα**

Το πρωτεάσωμα είναι μια μεγάλη και πολύπλοκη κυτταρική μηχανή με μοριακό βάρος της τάξης των 2.5 MDa, η οποία διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στις διαδικασίες της κυτταρικής ομοιόστασης και της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης από τα αρχαιοβακτήρια μέχρι τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από το 20S κεντρικό τμήμα και ένα ή δύο 19S ρυθμιστικά τμήματα, τα οποία συνδέονται στα άκρα του κεντρικού τμήματος<sup>65</sup>. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι ουβικιτινιλιωμένες πρωτεΐνες μικρής διάρκειας ζωής αποικοδομούνται από το 26S πρωτεάσωμα<sup>66</sup>. Αντίθετα, η δράση του 20S πρωτεασώματος εστιάζεται στην αποικοδόμηση μη αναδιπλωμένων, λανθασμένα αναδιπλωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών, καθώς και μη φυσικών πεπτιδίων<sup>67</sup>. Η πολυσύνθετη αυτή κυτταρική μηχανή, έχει δείχθει ότι υπόκειται στη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα απόκρισης στο στρες, NRF2<sup>67</sup>.



- 20S κεντρικό τμήμα

Η δομή του 20S κεντρικού τμήματος του πρωτεασώματος είναι κυλινδρική, ομοιάζει με βαρέλι, και περιέχει έναν πυρήνα από 4 δακτυλίους που σχηματίζουν έναν κεντρικό πόρο. Κάθε δακτύλιος αποτελείται από επτά μεμονωμένες πρωτεϊνικές υπομονάδες<sup>68</sup>. Οι δύο εσωτερικοί δακτύλιοι δομούνται από επτά β-υπομονάδες που περιέχουν τρία με επτά ενεργά κέντρα πρωτεασών. Τα ενεργά αυτά κέντρα εδράζονται στην εσωτερική πλευρά των δακτυλίων, ούτως ώστε η πρωτεΐνη στόχος να εισέλθει στον κεντρικό πόρο του πρωτεασώματος για να επιτευχθεί η αποικοδόμησή της. Οι δύο εξωτερικοί δακτύλιοι δομούνται από επτά α-υπομονάδες, των οποίων η λειτουργία είναι ρυθμιστική και βασίζεται στον σχηματισμό και τη διατήρηση μιας πύλης εισόδου των αποουβικιτινιωμένων πρωτεϊνικών υποστρωμάτων στο κύριο πρωτεολυτικό τμήμα του πρωτεασώματος. Η πύλη αυτή σχηματίζεται από την ένωση των αμινοτελικών περιοχών των α-υπομονάδων<sup>69</sup>.

Στα θηλαστικά, η κύρια πρωτεολυτική δραστηριότητα μεσολαβείται από τρεις β υπομονάδες, τις β1, β2 και β5, που είναι καταλυτικές και φέρουν ενεργότητες πεπτιδασών. Συγκεκριμένα, η β1 υπομονάδα έχει ενεργότητα κασπάσης και πρωτεολύει όξινα αμινοξικά κατάλοιπα. Η β2 φέρει ενεργότητα θρυψίνης και πρωτεολύει βασικά κατάλοιπα, ενώ η β5 υπομονάδα παρουσιάζει ενεργότητα χυμοθρυψίνης και πρωτεολύει υδρόφοβα αμινοξέα<sup>70</sup>.

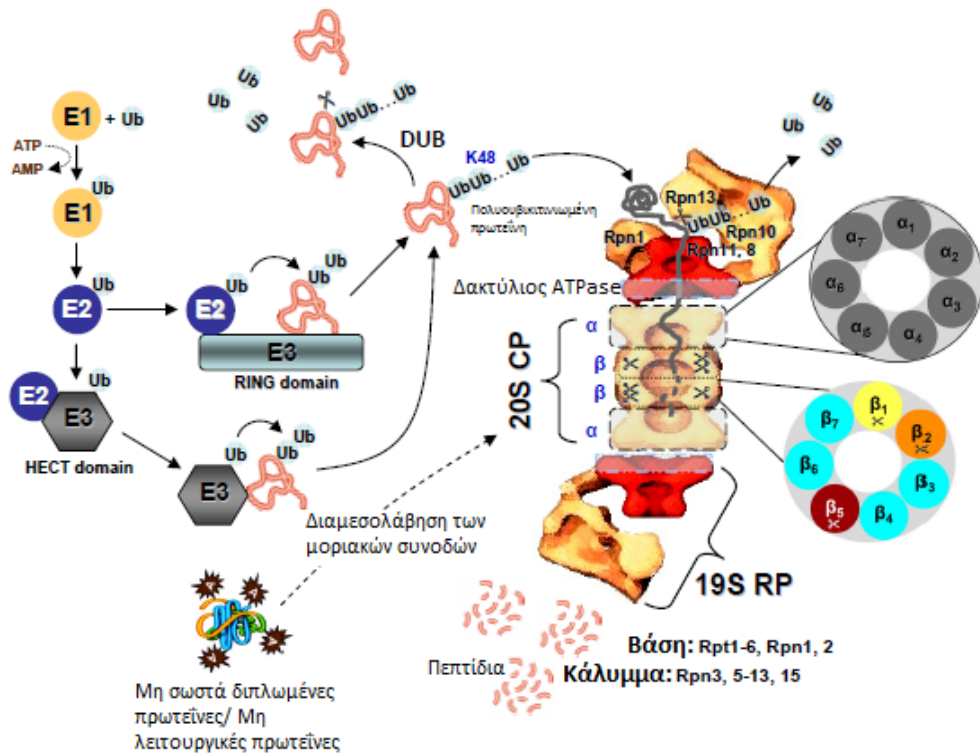
- 19S ρυθμιστικό τμήμα

Το 19S τμήμα αναγνωρίζει τη σημασμένη με ουβικιτίνη πρωτεΐνη-στόχο και τη μεταφέρει στον καταλυτικό πυρήνα. Αποτελείται από δύο υποσύμπλοκα που καλούνται βάση και κάλυμμα<sup>71</sup>. 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<sup>72</sup>. Το κάλυμμα αποτελείται από εννέα υπομονάδες που δεν ανήκουν στις ATPάσες με διακριτή αλληλουχία, δομή και λειτουργία, τις Rpn3, Rpn5-9, Rpn11, Rpn12 και Rpn15. Η βάση και το κάλυμμα συνδέονται με την βοήθεια του μορίου Rpn10, σχηματίζοντας έτσι το 19S ρυθμιστικό τμήμα. Οι υπομονάδες Rpn13 και Rpn10 δρουν ως υποδοχείς πολυουβικιτίνης, ενώ η υπομονάδα Rpn11 φέρει ενεργότητα αποουβικιτινάσης<sup>73</sup>. Το 26S πρωτεάσωμα καταστρέφει κυρίως πρωτεΐνες που έχουν σημανθεί με ουβικιτίνη. Η επιλογή αυτών γίνεται από το ένα εκ των δύο 19S τμημάτων<sup>74</sup>. Αντίθετα, ο ATP-ανεξάρτητος πρωτεολυτικός μηχανισμός λειτουργεί χωρίς τη διαμεσολάβηση της ουβικιτίνης και φαίνεται να συμμετέχει στην αποικοδόμηση οξειδωμένων πρωτεϊνών<sup>75</sup>.

Η σχέση μεταξύ μακροβιότητας και πρωτεολυτικών μηχανισμών έχει μελετηθεί τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, αποδεικνύοντας τη σημασία τους στην ομοίωση του οργανισμού. Η επαγόμενη σύνθεση κυτοσολικών και οργανο-ειδικών μοριακών συνοδών υπό στρεσογόνες συνθήκες παρουσιάζει σημαντικές βλάβες κατά τη γήρανση<sup>76</sup>. Πειράματα σε διάφορα ζώϊκά μοντέλα υποστηρίζουν πως η μείωση των μοριακών συνοδών έχει αντίκτυπο στην μακροβιότητα<sup>77</sup>. Ατέλειες τόσο σε ρυθμιστικούς και δομικούς παράγοντες όσο και στη λειτουργία του πρωτεασώματος, όπως επίσης αλλαγές στο σύστημα ουβικιτίνης επηρεάζουν την ποιότητα και το προσδόκιμο ζωής των οργανισμών.

Χαρακτηριστικά έχειδειχθεί ότι η ενεργότητα του πρωτεασώματος μειώνεται με το πέρασ της ηλικίας στους διάφορους ιστούς, ωστόσο η αιτία της μείωσης της ενεργότητας του πρωτεασώματος πιθανά να διαφέρει από ιστό σε ιστό<sup>78</sup>. Για παράδειγμα, η μειωμένη έκφραση των πρωτεασωμικών, τα μη ισορροπημένα επίπεδα α και β καταλυτικών υπομονάδων<sup>79</sup>, η έκφραση ελαττωματικών ρυθμιστικών υπομονάδων<sup>80</sup> και οι επιβλαβείς μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις<sup>81</sup> αποτελούν όλα πιθανούς παράγοντες που οδηγούν σε άμεση μείωση της απόδοσης του συστήματος. Επιπλέον, υπάρχουν παράγοντες που φαίνεται να επηρεάζουν έμμεσα την πρωτεασωμική ενεργότητα στα γηρασμένα κύτταρα. Για παράδειγμα, η μειωμένη κυτταρική διαθεσιμότητα σε ATP σε γερασμένα έντομα του γένους *D.melanogaster* μπορεί να αιτιολογήσει την ελαττωματική συναρμολόγηση του 26S πρωτεασώματος<sup>82</sup>. Αντίστοιχα, η έντονη οξειδωση και η δημιουργία συσσωματωμάτων μεταξύ των πρωτεασωμικών υποστρωμάτων φαίνεται να αναστέλλει την καταλυτική δυνατότητα του συστήματος<sup>83</sup>.

Όσον αφορά το σύστημα ουβικιτίνης, η γήρανση έχει συσχετιστεί με μείωση της ελεύθερης ουβικιτίνης<sup>84</sup>, καθώς και με μείωση της μεταγραφής των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα σύζευξης της ουβικιτίνης<sup>85</sup> και την E3 λιγάση<sup>86</sup> σε συγκεκριμένους ιστούς. Αντιθέτως, σε άλλους ιστούς γηρασμένων οργανισμών, έχει παρατηρηθεί αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων αυτών, χωρίς όμως αυτή να μεταφράζεται σε αύξηση της ενεργότητας του συστήματος<sup>87</sup>. Ακόμη το αυξανόμενο ποσοστό μεταλλαγμένων μορφών ουβικιτίνης κατά την γήρανση εξαιτίας λαθών κατά την διαδικασία της έκφρασης θα μπορούσε επίσης να βρίσκεται πίσω από την μη αποδοτική αποικοδόμηση των πολυ-ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών<sup>88</sup>.



**Εικόνα 1.3.: Τα δομικά συστατικά του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Ubiquitin-Proteasome Pathway-UPP).** Το UPP αποτελείται από το ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικιτίνης (Ubiquitin-ουβικιτίνη) E1, το οποίο μεταφέρει την ουβικιτίνη στην καταλυτική θέση του ενζύμου σύζευξης της ουβικιτίνης E2. Τελικά, η λιγάση της ουβικιτίνης E3 (που μπορεί να είναι είτε τύπου HECT είτε τύπου RING domain) συνδέει την ουβικιτίνη με ένα εσωτερικό κατάλοιπο λυσίνης (Lys) στην πρωτεΐνη-στόχο. Η πολυουβικιτινωμένη πρωτεΐνη (όπου συνήθως τα μόρια ουβικιτίνης έχουν συνδεθεί μεταξύ τους στα κατάλοιπα λυσίνης 48) μπορεί να αναγνωριστεί από το πρωτεάσωμα και τελικά να αποικοδομηθεί. Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από το καταλυτικό κέντρο 20S (Core Particle-CP) και από ένα ή δύο ρυθμιστικά μόρια 19S (Regulatory Particles-RP), τα οποία προσδένονται στα άκρα του. Το 19S RP περιέχει ~20 υπομονάδες, η δράση του οποίου εξαρτάται από ATP και από την ουβικιτίνη και οργανώνεται σε δύο υποσύμπλοκα, γνωστά ως βάση (όπου εντοπίζεται και ο δακτύλιος ATPase) και κάλυμμα. Τα πολυουβικιτινωμένα υποστρώματα αναγνωρίζονται από τις υπομονάδες του 19S πρωτεασώματος (Rpn1 και Rpn13) που φέρουν μοτίβα αναγνώρισης της ουβικιτίνης. Στη συνέχεια, ακολουθεί η απελευθέρωση της ουβικιτίνης και η πρωτεΐνη που πρόκειται να αποικοδομηθεί εισέρχεται στο 20S CP, όπου και αποικοδομείται. Το 20S καταλυτικό κέντρο (στα ευκαρυωτικά κύτταρα) αποτελείται από 28 υπομονάδες, α και β τύπου, που δημιουργούν τέσσερις δακτυλίους. Οι τρεις ενζυματικές ενεργότητες του πρωτεασώματος εντοπίζονται στις υπομονάδες β1, β2 και β5. Πέρα από την αποικοδόμηση των ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών, το 20S τμήμα φαίνεται να αποικοδομεί με τη διαμεσολάβηση μοριακών συνοδών και μη σωστά διπλωμένες, οξειδωμένες ή μη λειτουργικές πρωτεΐνες<sup>67</sup>.

### 1.1.4 Μιτοχονδριακή Δυσλειτουργία

Το μιτοχόνδριο είναι ένα υποκυτταρικό οργανίδιο, το οποίο περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη. Τα μιτοχόνδρια απαντώνται μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα και εμπλέκονται στη διαδικασία του αερόβιου μεταβολισμού με τελικό στόχο την παραγωγή ενέργειας, στη β-οξειδωση λιπαρών οξέων καθώς και στη σύνθεση ομάδων Fe-S. Έχουν επίμηκες, σφαιρικό ή ωοειδές σχήμα. Περιβάλλονται από δύο μεμβράνες, την εξωτερική και την εσωτερική που αποτελούνται από διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων και διάφορες πρωτεΐνες<sup>89</sup>. Τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) και ο άμεσος στόχος τους εντός του κυττάρου<sup>90</sup>. Η κύρια μιτοχονδριακή μορφή των ROS είναι η δραστική ρίζα υπεροξειδίου, αλλά μόνο το υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να διασχίσει τις μιτοχονδριακές μεμβράνες<sup>91</sup>.

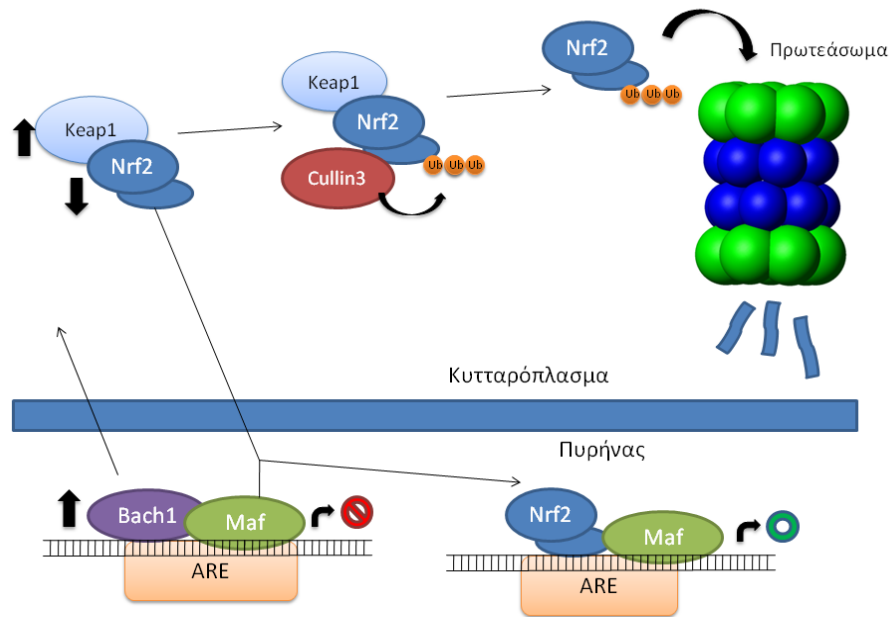
Σύμφωνα με μια από τις θεωρίες της γήρανσης υποστηρίζεται πως η διάρκεια ζωής του εκάστοτε οργανισμού καθορίζεται από το ποσοστό βλάβης που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες στο επίπεδο των κυττάρων και ιστών<sup>91</sup>. Παρόλο που το οξειδωτικό φορτίο αυξάνεται με την ηλικία, δεν υπάρχουν αρκετές αποδείξεις για τον ακριβή ρόλο των ROS στην πρόκληση της γήρανσης. Δεδομένα από διάφορα πειραματικά μοντέλα, έδειξαν ότι ακόμη και σε συνθήκες σοβαρής διαταραχής της αναπνευστικής αλυσίδας είναι δύσκολο να ανιχνευθεί μια πολύ υψηλή οξειδωτική βλάβη<sup>92</sup>.

Δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια μπορούν να συμβάλλουν στην γήρανση ανεξάρτητα από την παραγωγή ROS<sup>93,94</sup>. Ελαττωματικά μιτοχόνδρια μπορεί να επηρεάσουν το αποπτωτικό μονοπάτι, καθώς η αυξημένη διαπερατότητα των μιτοχονδρίων, ως απόκριση στο στρες<sup>95</sup>, προκαλεί σε τελικό στάδιο φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Επίσης, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία μπορεί να έχει άμεσο αντίκτυπο στην κυτταρική σηματοδότηση<sup>89,96</sup>. Η λανθασμένη σύνθεση μιτοχονδρίων και κατ'επέκταση τα μειωμένα ποσά βιοενέργειας μπορεί να προκύψουν από μεταλλάξεις και ελλείψεις στο mtDNA, οξειδωση των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, αποσταθεροποίηση των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας, αλλαγές στη λιπιδική σύσταση των μιτοχονδριακών μεμβρανών, αλλαγές στο μιτοχονδριακό δυναμικό ως αποτέλεσμα των μη ισορροπημένων γεγονότων σχάσης και σύντηξης και ανεπαρκούς μιτοφαγίας, μια ειδική μορφή της αυτοφαγίας για οργανίδια, που στοχεύει τα μη λειτουργικά μιτοχόνδρια για πρωτεολυτική αποικοδόμηση<sup>97</sup>. Ο συνδυασμός των αυξανόμενων βλαβών και της μειωμένης ανάκαμψης των μιτοχονδρίων, εξαιτίας του χαμηλού ρυθμού βιογένεσης και της μειωμένης αποικοδόμησής τους πιθανόν να συνεισφέρει στη διαδικασία της γήρανσης<sup>17</sup>.

### 1.1.5 Το αντιοξειδωτικό μονοπάτι NRF2/Keap1

Το οξειδωτικό στρες αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ROS και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου βλάπτουν όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και του DNA<sup>98</sup>. Συνεπώς, η αποδοτική αντιοξειδωτική απόκριση του κυττάρου είναι ζωτικής σημασίας στη διατήρηση της ομοιοστασίας του οργανισμού και κατ' επέκταση της πρωτεόστασης.

Το κύριο αντιοξειδωτικό μονοπάτι είναι το μονοπάτι NRF2/Keap1<sup>99</sup> (Εικόνα 1.4). Η πρωτεΐνη Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein-1), πρωτεΐνη που έχει δομή πρόσδεσης στην ακτίνη, διαθέτει ένα μοτίβο για την πρόσδεση της E3 λιγάσης cullin 3 (cullin 3-dependent E3 ligase-Cul3) και του μεταγραφικού παράγοντα NRF2, αντίστοιχα<sup>100</sup>. Απουσία οξειδωτικού στρες, η πρωτεΐνη Keap1 είναι προσδεσμένη τόσο με τη λιγάση Cul3 όσο και με το μεταγραφικό παράγοντα NRF2. Έτσι, η λιγάση Cul3 ουβικιτινώνει τον NRF2, ο οποίος οδηγείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα. Το σύμπλοκο Keap1/Cul3 εντοπίζεται στο κυτοσόλιο και στον πυρήνα, καθώς η πρωτεΐνη Keap1 διαθέτει σήμα εξόδου από τον πυρήνα, NES<sup>101</sup>. Η πρωτεΐνη Keap1 είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στο οξειδωτικό στρες, καθώς διαθέτει μια σειρά από κατάλοιπα κυστεΐνης που δρουν ως αισθητήρες σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες<sup>102</sup>. Έτσι, παρουσία οξειδωτικού στρες, ο NRF2 ενεργοποιείται και συσσωρεύεται στον πυρήνα, όπου διμερίζεται με την πρωτεΐνη Maf. Το διμερές NRF2-Maf, όπως προαναφέρθηκε, προσδέεται σε στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (AREs) και ενεργοποιεί την έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, καθώς και των ενζύμων αντιοξειδωτικής απόκρισης. Ο NRF2 μπορεί επίσης να ενεργοποιηθεί μέσω φωσφορυλίωσης, καθώς έχει δείχθει ότι η κινάση PKR-like endoplasmic reticular (PERK) φωσφορυλιώνει τον NRF2 παρουσία στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο<sup>103</sup>, ενώ η κινάση protein kinase C (PKC) φωσφορυλιώνει τον NRF2 στη σερίνη 40 προωθώντας έτσι την ενεργοποίησή του<sup>104</sup>. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο NRF2 επάγει την ενεργοποίηση της έκφρασης του πρωτεασώματος παρουσία οξειδωτικού στρες και έτσι, θεωρείται υπονήφιος μεταγραφικός παράγοντας ρύθμισης της έκφρασης των πρωτεασωματικών γονιδίων. Επιπρόσθετα, ο NRF2 έχει δείχθει πως δυσλειτουργεί κατά τη γήρανση χωρίς να είναι γνωστός ο μηχανισμός, παρά το υψηλό οξειδωτικό φορτίο στα κύτταρα κατά τη γήρανση<sup>105,106</sup>.



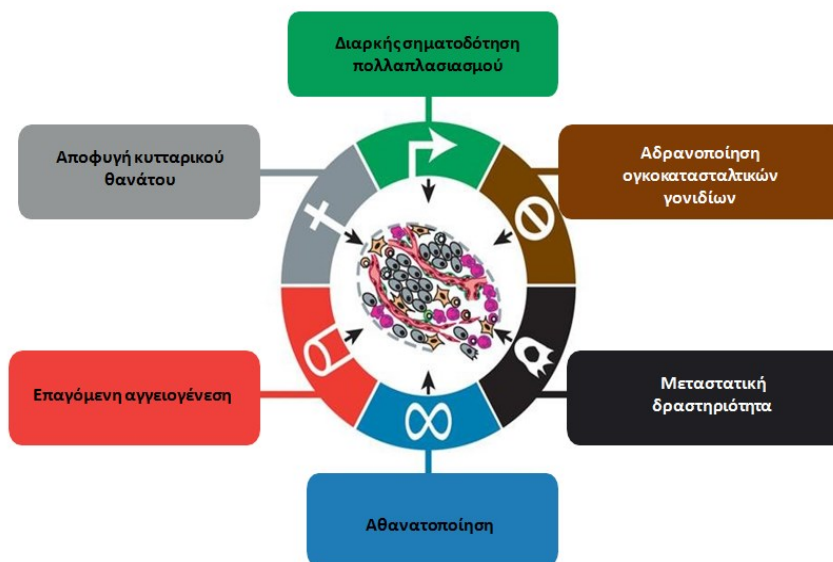
**Εικόνα 1.4.: Η ρύθμιση του μονοπατιού αντιοξειδωτικού μονοπατιού Keap1-NRF2.** Σε φυσιολογικές συνθήκες ο NRF2 δεσμεύεται από τον παράγοντα Keap1, πολυουβικτινιλιώνεται με την βοήθεια του παράγοντα Cullin3 και προωθείται για αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος. Τα γονίδια της αντιοξειδωτικής απόκρισης είναι ανενεργά ενώ στους ενισχυτές των στοιχείων ARE βρίσκονται δεσμευμένα μικρά διμερή της πρωτεΐνης Maf ή άλλοι ανασταλτικοί παράγοντες όπως η Bach1. Οξειδωτικά, ηλεκτρονιόφιλα, χημειοπροστατευτικοί παράγοντες και άλλοι ενεργοποιητές αναστέλλουν την αποικοδόμηση του NRF2. Με αυτό τον τρόπο ο NRF2 μεταφέρεται στον πυρήνα και ύστερα από την δημιουργία συμπλόκου με τις μικρές πρωτεΐνες Maf προσδένεται στα στοιχεία ARE προωθώντας την μεταγραφή των γονιδίων της αντιοξειδωτικής απόκρισης. Με αυτό τον τρόπο αποκαθίσταται η ισορροπία και μειώνεται η οξειδωτική βλάβη των κυτταρικών συστατικών (προσαρμογή από Sykiotis και Bohmann, 2010).

## 1.2 Καρκίνος

Ο καρκίνος ορίζεται συχνά ως μία ασθένεια του γήρατος<sup>107</sup>. Η συχνότητα εμφάνισης των περισσότερων κακοηθειών αυξάνεται δραματικά με την ηλικία ενώ επίσης έχει αποδειχθεί ότι ο καρκίνος αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες ηλικίας 60-79 ετών. Η πιθανότητα εμφάνισης μεταστατικού καρκίνου σε ασθενείς άνω των 60 ετών είναι διπλάσια από αυτήν των νεότερων ασθενών, με μέση ηλικία διάγνωσης στα 65 έτη και μέση ηλικία θανάτου στα 74 έτη<sup>108-110</sup>. Επίσης, σύμφωνα με τα δεδομένα του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου των Ηνωμένων Πολιτειών

της Αμερικής, το 43% των ανδρών και το 38% των γυναικών θα αναπτύξουν κακοήθη καρκίνο κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Ανάμεσα σε αυτούς, το 23% των ανδρών και το 19% των γυναικών θα πεθάνουν<sup>111</sup>.

Οι μοριακοί μηχανισμοί τόσο της επιταχυνόμενης γήρανσης όσο και της καρκινογένεσης είναι άμεσα εξαρτώμενοι από την προοδευτική συσσώρευση κυτταρικής βλάβης με το πέρασμα της ηλικίας του ατόμου. Παρά την πρωταρχική αντίληψη πως πολλά γνωρίσματα του καρκίνου (υπερπολλαπλασιασμός και αυξημένη κυτταρική επιβίωση) είναι αντίθετα συγκριτικά με αυτά της γήρανσης (έκπτωση λειτουργιών και αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης παθολογικών διαταραχών), μελέτες επισημαίνουν ότι πολλά από τα ορόσημα της γήρανσης παρουσιάζονται και στον καρκίνο<sup>19</sup>. Αυτά περιλαμβάνουν επιγενετικές αλλαγές, αλλοιωμένη ενδοκυτταρική επικοινωνία, αλλαγές στην πρωτεόσταση, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και κυτταρική γήρανση. Αυτή η σχέση μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η πλειονότητα των μορφών καρκίνου εμφανίζεται σε ηλικιωμένα άτομα. Επομένως, τα ορόσημα της γήρανσης αποτελούν μέρος του φαινοτύπου των καρκινικών κυττάρων<sup>112</sup>. Οι Hanahan και Weinberg (2001) έχουν προτείνει έξι ορόσημα που συνιστούν την αρχή για την κατανόηση του πολυμορφισμού και της πολυπλοκότητας του καρκίνου όπως αναγράφονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1.5).



**Εικόνα 1.5: Τα ορόσημα του καρκίνου.** Παρουσιάζονται τα έξι ορόσημα που προτάθηκαν επισήμως το 2000. Την περασμένη δεκαετία έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την κατανόηση των μηχανισμών που κρύβονται πίσω από κάθε ορόσημο ξεχωριστά<sup>113</sup>.

Αυτά τα έξι ορόσημα του καρκίνου με τις ξεχωριστές και συμπληρωματικές τους ιδιότητες συμβάλλουν στην καρκινογένεση με την επακόλουθη, σε ορισμένες περιπτώσεις, μεταστατική συμπεριφορά και αποτελούν τη βάση για την κατανόηση του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα:

- **Ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός**

Πρόκειται για το πιο βασικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων. Περιλαμβάνει την ικανότητά τους να διατηρούν χρόνια την πολλαπλασιαστική τους ιδιότητα<sup>114</sup>. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα που ελέγχουν την παραγωγή και την απελευθέρωση αυξητικών σημάτων για την είσοδο τους στον κυτταρικό κύκλο, διασφαλίζοντας έτσι την ιστική αρχιτεκτονική και λειτουργία σε φυσιολογικά επίπεδα, στα καρκινικά κύτταρα παρατηρείται η απορρυθμισμένη και μη ελεγχόμενη δράση αυξητικών παραγόντων. Αναλύσεις έχουν δείξει την ύπαρξη σωματικών μεταλλαγών που σχετίζονται με τη συνεχή ενεργοποίηση των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων. Βλάβες έχουν σημειωθεί και σε μηχανισμούς αρνητικής ανάδρασης που ρυθμίζουν την σταδιακή μείωση τέτοιων μονοπατιών<sup>114-117</sup>.

- **Αδρανοποίηση καταστολέων ανάπτυξης**

Προκειμένου να συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να παρακάμψουν ειδικά σήματα που ρυθμίζουν αρνητικά τον πολλαπλασιασμό τους. Πολλά από αυτά τα σήματα εξαρτώνται από την δράση ογκοκατασταλτικών γονιδίων<sup>118</sup>. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποφύγουν ογκοκατασταλτικά σήματα είτε με γενετικούς ή με επιγενετικούς μηχανισμούς. Δεκάδες ογκοκατασταλτικά γονίδια έχουν ανακαλυφθεί μέσω της απενεργοποίησής τους σε πολλούς τύπους καρκίνου τόσο σε ζωικά πρότυπα όσο και στον ίδιο τον άνθρωπο. Δύο κοινά ογκοκατασταλτικά γονίδια κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες RB (που σχετίζονται με το ρετινοβλάστωμα) και TP53<sup>108</sup>.

- **Αποφυγή κυτταρικού θανάτου**

Σύμφωνα με μελέτες, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος μέσω της απόπτωσης αποτελεί ένα φραγμό στην ανάπτυξη κακοηθειών<sup>118-120</sup>. Υπάρχουν πολλοί τρόποι με τους οποίους ένα καρκινικό κύτταρο μπορεί να επιτύχει μείωση της απόπτωσης ή αύξησης της αντίστασης στην απόπτωση. Γενικά, οι κυτταρικοί μηχανισμοί που χαρακτηρίζουν την αποφυγή της απόπτωσης μπορούν χωριστούν σε: **1)** διαταραγμένη ισορροπία προ-αποπτωτικών και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, **2)**



μειωμένη λειτουργία της πρωτεΐνης κασπάσης και **3)** μειωμένη σηματοδότηση μέσω υποδοχέων κυτταρικού θανάτου<sup>119</sup>.

Πολλές πρωτεΐνες έχει αναφερθεί να έχουν προ- ή αντι-αποπτωτική δράση. Δεν είναι η απόλυτη ποσότητα αλλά μάλλον η αναλογία αυτών των προ και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών που παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου<sup>121</sup>. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές ώστε να παρακάμψουν την απόπτωση. Ανάμεσα σε αυτές είναι η απώλεια της λειτουργίας μοριακών αισθητήρων που ανιχνεύουν τις βλάβες, η αύξηση αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, η μείωση των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών καθώς και βλάβες στη εξωκυτταρική σηματοδότηση που εμπλέκεται στην εκκίνηση της απόπτωσης<sup>119</sup>.

Η νέκρωση αποτελεί μια διαδικασία που λειτουργικά αντιτίθεται στην απόπτωση αφού τα κύτταρα απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους στο μικροπεριβάλλον<sup>95</sup>. Ανάμεσα στους παράγοντες που απελευθερώνονται βρίσκονται και προφλεγμονώδη σήματα, που μέσω της φλεγμονώδους αντίδρασης στρατολογούν το ανοσοποιητικό σύστημα, ώστε να ελεγχθούν οι βλάβες στον ιστό και να απαλειφθούν. Σε νεοπλασίες, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που σχετίζονται με την φλεγμονώδη αντίδραση επάγουν και την ογκογένεση καθώς ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αγγειογένεση ή σε άλλη περίπτωση τα νεκρωτικά κύτταρα εκκρίνουν ουσίες όπως είναι η ιντερλευκίνη 1α (IL-1α), που επάγει τον πολλαπλασιασμό των γειτονικών κυττάρων<sup>95,122,123</sup>.

- **Αθανατοποίηση**

Τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από απεριόριστη αναπαραγωγική ικανότητα, σε αντίθεση με τα φυσιολογικά, όπου ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων φτάνει σε ένα πλατό και τελικά καταλήγουν σε θάνατο<sup>124</sup>. Τα τελομερή, όπως προαναφέρθηκε, βρίσκονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων και αποτελούν επαναλαμβανόμενες εξανουκλεοτιδικές αλληλουχίες που σταδιακά μειώνονται σε μήκος λόγω της έλλειψης του ενζύμου τελομεράσης<sup>125</sup>. Σε περίπου 90% των αθανατοποιημένων κυττάρων έχει βρεθεί πως αυτό το ένζυμο υπάρχει σε λειτουργικά επίπεδα, όπως και σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου<sup>124,125</sup>.

- **Επαγόμενη αγγειογένεση**

Τα καρκινικά κύτταρα και κατ'επέκταση ο αναπτυσσόμενος όγκος, απαιτεί για τη διατήρησή του τη συνεχή παροχή θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου με παράλληλη απομάκρυνση των μεταβολικών αποβλήτων και του διοξειδίου του άνθρακα<sup>126</sup>. Μάλιστα

έχει δειχθεί πως στα κακοήθη κύτταρα είναι σχεδόν πάντα ενεργοποιημένοι οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αγγειογένεση και έτσι διατηρείται η συνεχής ανάπτυξη των όγκων<sup>126</sup>. Οι όγκοι μπορούν να αιματωθούν είτε μέσω του υπάρχοντος αγγειακού συστήματος, είτε διεγείροντας το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων μέσω μιας ποικιλίας μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών<sup>127</sup>.

- **Μετάσταση και ενεργητική διείσδυση**

Η εισβολή των καρκινικών κυττάρων σε κοντινούς ιστούς και η ενσωμάτωσή τους στο παρέγχυμα απομακρυσμένων ιστών που προκαλεί μεταστάσεις, παραμένει ένα χαρακτηριστικό ορόσημο της καρκινογένεσης. Τα κύτταρα αυτά εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, είτε απευθείας είτε μέσω του λεμφικού συστήματος<sup>128</sup>. Κακοήθη κύτταρα χαρακτηρίζονται από αλλαγές στο σχήμα τους καθώς και αλλαγές στη σύσταση της εξωκυττάριας ουσίας τους, όπως για παράδειγμα η έλλειψη της E-καδερίνης που είναι απαραίτητη για την διακυτταρική επικοινωνία και προσκόλληση των κυττάρων με αποτέλεσμα την τοπική τους διείσδυση<sup>129,130</sup>.

Η σύνθεση και η έκκριση πολλών προ-αγγειογόνων παραγόντων από τα κύτταρα του όγκου αλλά και του ξενιστή, όπως και η απουσία αντι-αγγειογόνων παραγόντων, παίζουν βασικό ρόλο στη δημιουργία ενός τριχοειδικού δικτύου από τον περιβάλλοντα ιστό του ξενιστή. Μόνο λίγα κύτταρα σε έναν πρωτογενή όγκο είναι ικανά να προκαλέσουν μετάσταση. Η είσοδος των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία είναι συνηθισμένη και περισσότερα από ένα εκατομμύριο κύτταρα ανά γραμμάριο πρωτογενούς όγκου μπορούν να εισέρχονται στην κυκλοφορία καθημερινά<sup>131</sup>. Αν και τα μεταστατικά κύτταρα μπορούν να φτάσουν σε όλα τα όργανα, σε λίγα θα υπάρξει ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου. Έτσι, η παρουσία καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία δεν προβλέπει απαραίτητα ότι θα υπάρξει και μετάσταση της κακοήθειας<sup>131</sup>.

Πέραν των κύριων ορόσημων του καρκίνου, έρχονται να προστεθούν ακόμα δύο, τα οποία βρίσκονται υπό μελέτη<sup>132</sup>. Πρόκειται για τον επαναπρογραμματισμό του κυτταρικού ενεργειακού μεταβολισμού για να εξασφαλιστεί η συνεχής ανάπτυξη και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Τέλος, γίνεται λόγος και για την ενεργητική διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος που ανταγωνίζεται και ταυτόχρονα υποβοηθά την ογκογένεση<sup>132</sup>.

### **1.2.1 *Drosophila melanogaster*: Μοντέλο για καρκινική μελέτη**

Το έντομο *Drosophila melanogaster* αποτελεί ένα σημαντικό μοντέλο-πρότυπο στην έρευνα του καρκίνου. Τα στοιχεία δείχνουν ότι το 68% των ανθρώπινων γονιδίων που

εμπλέκονται στον καρκίνο έχουν ομόλογα στη *Drosophila*. Παρόλο που υπάρχουν κάποιες διαφορές, όπως η έλλειψη αγγειακού συστήματος, πολλές βιολογικές διεργασίες σχετικές με τη δημιουργία όγκων και τη μεταστατική τους ικανότητα είναι αρκετά καλά συντηρημένες<sup>133</sup>. Η *Drosophila melanogaster* εμφανίζει τα κλασικά ορόσημα του καρκίνου, όπως η αποφυγή της απόπτωσης, ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός κ.ά. Έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για την διερεύνηση και ανάδειξη σηματοδοτικών μηχανισμών για διάφορους ανθρώπινους τύπους καρκίνου (εγκέφαλος, θυρεοειδής, έντερο, προστάτης, ωοθήκες, δέρμα) και για την ανεύρεση πιθανών αντικαρκινικών θεραπειών<sup>134-136</sup>. Τέλος, το έντομο *Drosophila melanogaster* είναι εύκολα διαχειρίσιμο σε προκλινικές μελέτες, μια απαραίτητη προϋπόθεση για την επιλογή του ως πειραματικό μοντέλο σχετικά με την ανεύρεση και την ανάπτυξη θεραπειών<sup>133</sup>.

### 1.2.2 Το ογκογονίδιο *Ras*

Το 1982, ενεργά, μεταλλαγμένα γονίδια *RAS* ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς με καρκίνο, σηματοδοτώντας την πρώτη ανακάλυψη γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη κακοηθειών<sup>137</sup>. Στον άνθρωπο, υπάρχουν τρία γονίδια *RAS* που κωδικοποιούν τέσσερα διακριτά, αλλά με υψηλή ομολογία, πρωτεϊνικά μόρια μοριακού βάρους περίπου 21 kDa, τα HRAS, NRAS, KRAS4A, KRAS4B, τα οποία λειτουργούν ως ενδοκυττάριο μεταγωγείς σημάτων που λαμβάνουν από ειδικούς υποδοχείς της κυτταροπλασματικής επιφάνειας. Οι φυσιολογικές ιδιότητες της πρωτεΐνης RAS είναι αυτές μιας μικρής GTPάσης που εναλλάσσεται μεταξύ μιας ενεργούς GTP-δεσμευμένης διαμόρφωσης και μιας ανενεργούς GDP-δεσμευμένης διαμόρφωσης. Η εναλλαγή αυτή διευκολύνεται μερικώς από την υδρόλυση του νουκλεοτιδίου GTP μέσω πρωτεϊνών με ενεργότητα GTPάσης (GTP-Activating Proteins, GAPs). Η οικογένεια των RAS GTPασών ελέγχει διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως είναι η πορεία του κυτταρικού κύκλου, η κυτταρική ανάπτυξη, οι κυτταροσκελετικές αλλαγές, η απόπτωση και η γήρανση<sup>138</sup>. Η επικοινωνία μεταξύ των μονοπατιών που ελέγχονται από διάφορα σηματοδοτικά μόρια, δημιουργεί μοριακά δίκτυα των οποίων η ισορροπία είναι κρίσιμης σημασίας, για να συμβούν οι απαραίτητες κυτταρικές αποκρίσεις<sup>139</sup>. Ανάμεσα στα διάφορα δίκτυα σηματοδότησης, η συμμετοχή των HRAS, KRAS, NRAS στο μονοπάτι Ras-Raf-MAPK έχει αποδειχθεί βασική για τον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της επιβίωσης των ευκαρυωτικών κυττάρων<sup>140-142</sup>.

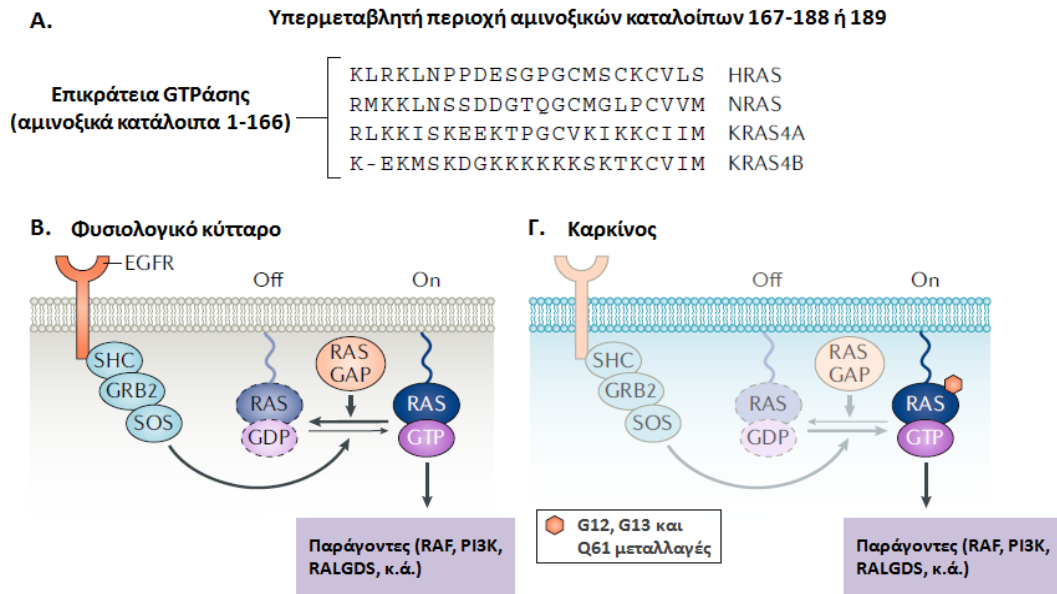
Όταν οι πρωτεΐνες RAS ενεργοποιούνται από μεταλλαγές, η μειωμένη αλληλεπίδρασή τους με τις GAPs ευνοεί τη μόνιμη παρουσία της GTP διαμόρφωσής τους<sup>143</sup>. Οι μεταλλαγές στο γονίδιο *RAS* αποτελούν γενετικά γεγονότα που συμβαίνουν στα αρχικά στάδια της πορείας της ογκογένεσης. Πολυάριθμα, γενετικά τροποποιημένα

μοντέλα RAS-κατευθυνόμενων καρκίνων σε ποντίκια, έχουν δείξει την πιθανή δράση των μεταλλάξεων RAS στην επαγωγή του καρκίνου<sup>144,145</sup>.

Το KRAS είναι η πιο συχνή μεταλλαγμένη ισομορφή (σε 86% των RAS-κατευθυνόμενων καρκίνων), ακολουθεί το NRAS (σε 11% των RAS-κατευθυνόμενων καρκίνων) και πιο σπάνια το HRAS (3% των RAS-κατευθυνόμενων καρκίνων). Γενικά, μεταλλαγές στο *RAS* έχουν ανιχνευθεί στο 9-30% όλων των δειγμάτων όγκων που έχουν αλληλουχηθεί (στατιστικά στοιχεία από σχετικές βάσεις δεδομένων), με την ισομορφή RAS να διαφέρει ανάλογα με την μορφή καρκίνου<sup>146</sup>. Τα γονίδια *RAS* που σχετίζονται με τον καρκίνο χαρακτηρίζονται από μονονουκλεοτιδικές μεταλλαγές, το 98% των οποίων ανιχνεύεται σε κατάλοιπα G12, G13 ή Q61. Ενώ οι G12 μεταλλαγές είναι κυρίαρχες στο γονίδιο *KRAS* και *HRAS*, οι μεταλλαγές Q61 είναι κυρίαρχες στο γονίδιο *NRAS*<sup>146</sup>.

Τέλος, οι μεταλλαγές στο γονίδιο *Ras* επάγουν αλλαγές σε διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις αλλά και μεταβολές στην αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την τροποποίηση του συμπλέγματος E-καδερίνης και της κυτταροπλασματικής B-κατενίνης. Σε πολλές περιπτώσεις έχει εντοπιστεί μείωση και άλλων συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, όπως είναι η ιντεγκρίνη και η ακτίνη, δημιουργώντας έτσι όλες τις απαραίτητες προϋποθέσεις για διασπορά του όγκου σε νέους ιστούς και όργανα<sup>147</sup>. Επιπλέον, επάγεται η διαδικασία της αγγειογένεσης, μέσω των ειδικών παραγόντων VEGFA, FGF2, με σκοπό την παροχή ολοένα και περισσότερων θρεπτικών συστατικών αλλά και οξυγόνου στο περιβάλλον των αναπτυσσόμενων όγκων<sup>148,149</sup>.

Το ογκογονίδιο *Ras* (γνωστό ως *Ras85D*) στο έντομο *Drosophila melanogaster* εμφανίζει μεγαλύτερη ομολογία με το ανθρώπινο γονίδιο *HRAS* και γενικά χαρακτηρίζεται από την υψηλά συντηρημένη αλληλουχία ανάμεσα στα διάφορα είδη. Συμβάλλει στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της αύξησης των ιστών<sup>150</sup>. Εκφράζεται σε πολλούς ιστούς του ενήλικου ατόμου, στον εγκέφαλο κατά τα στάδια της εμβρυογένεσης και της λάρβας, σε κύτταρα της γαμετικής σειράς καθώς και στον οπτικό δίσκο. Όταν επάγεται η συνεχής ενεργοποίηση του γονιδίου, όπως στην περίπτωση του μεταλλαγμένου γονιδίου *Ras85D*<sup>v12</sup>, όπου το κωδικόνιο της θέσης 12 που φυσιολογικά αντιστοιχεί στο αμινοξύ γλυκίνη έχει αντικατασταθεί από το κωδικόνιο που κωδικοποιεί το αμινοξύ βαλίνη, προκαλεί μεταξύ άλλων αναπτυξιακές ανωμαλίες και υπερπλασίες στους ιστούς προσομοιάζοντας διάφορες μορφές καρκίνου στον άνθρωπο<sup>150</sup>. Το συγκεκριμένο στέλεχος *Ras85D*<sup>v12</sup> χρησιμοποιείται σε αυτή την εργασία για τη μελέτη της πρωτεόστασης και της μιτοχονδριακής λειτουργίας κατά τη γήρανση και τον καρκίνο.



**Εικόνα 1.6: Σύνοψη των RAS ισομορφών και σηματοδότησης.** Α) Απεικόνιση των στοιχισμένων καρβοξυτελικών περιοχών των τεσσάρων RAS ισομορφών. Οι ισομορφές RAS είναι υψηλά συντηρημένες (~90%) σε όλη την αμινοτελική επικράτεια της GTPάσης (αμινοξικά κατάλοιπα 1-166), που περιέχουν την GTP-GDP θέση δέσμησης και τις θέσεις αλληλεπίδρασης με τα μόρια-τελεστές, αλλά διαφέρουν στην καρβοξυτελική τους περιοχή που ορίζεται ως υπερμεταβλητή περιοχή. Β) Σχηματική αναπαράσταση του σηματοδοτικού μονοπατιού RAS σε φυσιολογικά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες RAS αρχικά βρίσκονται στην κυττοσολική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης, μέσω πρόσδεσης λιπιδικών μορίων που προστίθενται στην καρβοξυτελική περιοχή. Η ενεργοποίηση από υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (όπως ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)), παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEFs) όπως ο παράγοντας SOS, στρατολογούνται στην πλασματική μεμβράνη και προωθούν την εναλλαγή GDP σε GTP στην RAS πρωτεΐνη (ενεργή GTP διαμόρφωση). Πρωτεΐνες με ενεργότητα GTPάσης (GAPs) επιταχύνουν την ενεργότητα GTPάσης της RAS, επαναφέροντας την RAS πρωτεΐνη στην ανενεργή GDP διαμόρφωση. Γ) Ογκογενείς μεταλλαγές στις RAS πρωτεΐνες τείνουν να κάνουν την πρωτεΐνη πιο ενεργή, τόσο που χρονικά δεσμεύεται και ενεργοποιεί πολλαπλά μόρια-τελεστές<sup>151,146</sup>.

### 1.2.3 Το γονίδιο *Cdc6* (Cell cycle division 6)

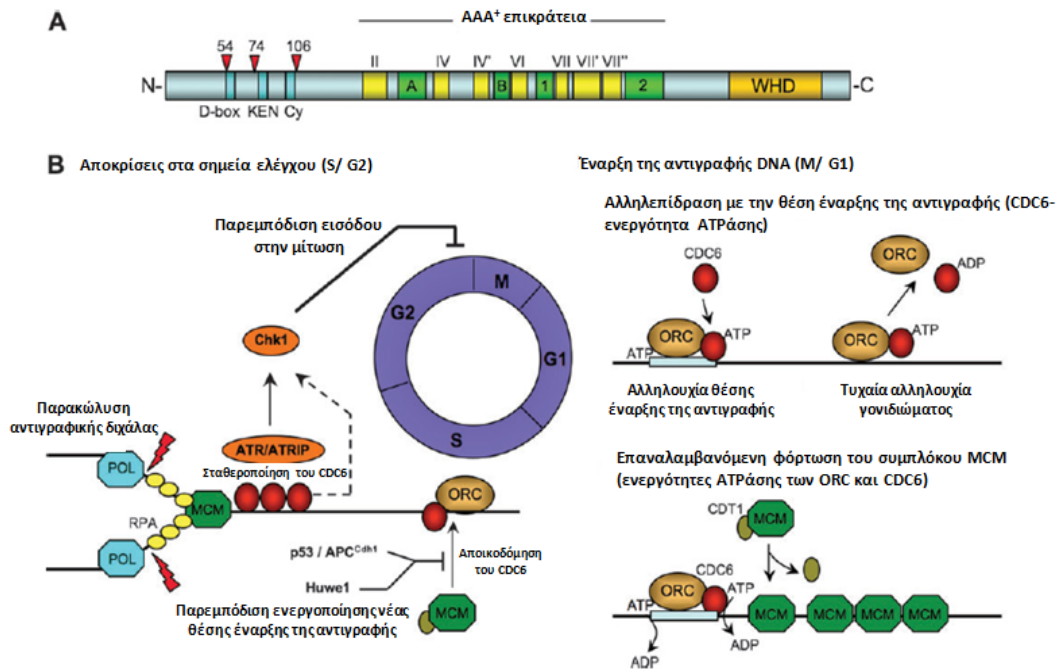
Η πρωτεΐνη CDC6 ανήκει στην AAA<sup>+</sup> οικογένεια ΑΤΡασών, με ενεργότητες παρόμοιες των σαπερονών που σχετίζονται με τη συναρμολόγηση, ενεργοποίηση και αποσυναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων<sup>152</sup>. Το γονίδιο *CDC6* είναι αρκετά συντηρημένο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς ενώ ο μηχανισμός πρόσδεσης της ελικάσης στο γενετικό υλικό των βακτηρίων προτείνει ότι αυτή η διαδικασία έχει διατηρηθεί εξελικτικά εδώ και εκατομμύρια χρόνια<sup>153</sup>.

Η δράση του *CDC6* εντοπίζεται κυρίως από το τέλος της μίτωσης (φάση Μ), έως το τέλος της φάσης G1, λίγο πριν την αντιγραφή του DNA. Συμμετέχει στο σχηματισμό του προαντιγραφικού συμπλόκου (pre-RC)<sup>154</sup>. Δύο λειτουργίες της *CDC6* πρωτεΐνης συνδέονται με την ενεργότητα ΑΤΡάσης που τη χαρακτηρίζει. Η πρώτη σχετίζεται με την ειδική σύνδεση του συμπλόκου αναγνώρισης της θέσης έναρξης αντιγραφής (ORC), σε κατάλληλες θέσεις του γενετικού υλικού μέχρι τη φόρτωση του συμπλέγματος της ελικάσης MCM2-7<sup>155</sup> και η δεύτερη με την ίδια τη φόρτωση του συμπλέγματος MCM2-7. Οι πρωτεΐνες MCM μαζί με τον παράγοντα CDT1 προσδέονται στο σύμπλοκο ORC-CDC6 στη θέση έναρξης της αντιγραφής και το σύστημα παραμένει σε ανενεργή κατάσταση μέχρι την αυστηρά ελεγχόμενη ενεργοποίησή του<sup>156</sup>. Αυτή περιλαμβάνει την απομάκρυνση και αποικοδόμηση του παράγοντα CDT1<sup>157</sup> καθώς και τη φωσφορυλίωση και αποικοδόμηση του παράγοντα *CDC6*<sup>158</sup>. Η ελικάση MCM είναι σε θέση να ξεκινήσει τη δράση της και την εκτύλιξη της δίκλωνης έλικας DNA<sup>159</sup>. Η ρύθμιση που περιλαμβάνει την υδρόλυση ΑΤΡ του *CDC6* και τη φωσφορυλίωση του συμπλόκου pre-RC είναι σημαντική για να αποφευχθεί η επαναλαμβανόμενη εκκίνηση της αντιγραφής κατά τη διάρκεια του ίδιου κυτταρικού κύκλου συμβάλλοντας στη διατήρηση της γενωμικής ακεραιότητας<sup>160</sup>.

Η απορρύθμιση της αντιγραφής μπορεί να δημιουργήσει τις συνθήκες που θα επιφέρουν αντιγραφικό στρες προκαλώντας γενωμική αστάθεια που όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως αποτελεί ένα από τα ορόσημα του καρκίνου<sup>161</sup>. Τα τελευταία χρόνια έχει δειχθεί ότι το γονίδιο *CDC6* σχετίζεται με την ανάπτυξη του καρκίνου αφού σε πολλούς κυτταρικούς τύπους ανιχνεύονται αυξημένα επίπεδα των πρωτεϊνών *CDC6* και *CDT1*<sup>162</sup>. Πιο συγκεκριμένα, η δράση του γονιδίου *CDC6* έχει συσχετιστεί με την αρνητική μεταγραφική ρύθμιση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως είναι τα *INK4/ARF*<sup>163</sup>. Τέλος, η αλληλεπίδραση του *CDC6* με ογκογονίδια, όπως τα *RAS*, *MOS* και *C-MYC* προκαλεί αντιγραφικό στρες, συμβάλλοντας στην αύξηση των βλαβών του γενετικού υλικού και στη χρωμοσωμική αστάθεια<sup>164,165</sup>.

Το γονίδιο *Cdc6* στο έντομο *Drosophila melanogaster* εμφανίζει υψηλή ομολογία στην αλληλουχία αλλά και στη δράση του με το αντίστοιχο ομόλογο γονίδιο στον άνθρωπο. Έχουν δημιουργηθεί κυτταρικές σειρές στον συγκεκριμένο οργανισμό που εκφράζουν το γονίδιο *Cdc6* σε υψηλά επίπεδα καθοδικά επαγώγιμου υποκινητή. Σε αυτά

τα στελέχη, ωστόσο, δεν έχει διαπιστωθεί υπερπολλαπλασιασμός της χρωματινής αλλά μικρή καθυστέρηση στη μετάβαση από τη φάση G2 στην φάση M της μίτωσης του κυτταρικού κύκλου<sup>166</sup>.



**Εικόνα 1.7: Οι λειτουργίες του CDC6 στην αντιγραφή του DNA και στην ενεργοποίηση των σημείων ελέγχου στον κυτταρικό κύκλο.** A) Οι κύριες συντηρημένες περιοχές της πρωτεΐνης CDC6 στον άνθρωπο. Οι θέσεις των τριών καταλοίπων σερίνης που φωσφορυλιώνονται από τις CDKs υποδεικνύονται με τα κόκκινα βέλη. Οι περιοχές D-box και KEN αποτελούν τα μοτίβα της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης. Με κίτρινο χρώμα φαίνονται τα διάφορα συντηρημένα μοτίβα της επικράτειας AAA<sup>+</sup>. B) Σχηματική αναπαράσταση των πιθανών λειτουργιών του παράγοντα CDC6 σε διάφορα στάδια κατά τον κυτταρικό κύκλο από διαφορετικά πειραματικά συστήματα.

### 1.3 Σκοπός

Η παρούσα εργασία αφορά τη μελέτη των μιτοχονδρίων και των μηχανισμών της πρωτεόστασης κατά τη γήρανση αλλά και σε ασθένειες του γήρατος ύστερα από την υπερέκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά έντομα που υπερεκφράζουν μία μεταλλαγμένη μορφή του ογκογονιδίου *Ras*, καθώς και έντομα που υπερεκφράζουν το γονίδιο *Cdc6*, το οποίο εμπλέκεται στον κυτταρικό κύκλο. Επιπλέον μελετήθηκαν διαγονιδιακά έντομα στα υπερεκφράζονται τα υπο μελέτη γονίδια σε συνδυασμό με τον αντιοξειδωτικό μεταγραφικό παράγοντα *cncC*.



## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Υλικά

#### 2.1.1 Μηχανήματα

Συσκευή	Εταιρεία
Στερεοσκόπιο με ψηφιακή κάμερα (Breukhoven microscopy systems/3 MB)	BMS, 74958
Συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (Confocal Laser Scanning Microscopy-CLSM).	
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	Biofugestratus

#### 2.1.2 Χημικά Αντιδραστήρια

Χημικά αντιδραστήρια	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
APS (Ammoniumpersulfate)	ResearchOrganics	9530A
ATP (Adenosine Triphosphate)	Sigma-Aldrich	A1852
Biorad protein assay	Biorad	500-0006

Clarity™ and Clarity Max™ Western ECL Blotting Substrates	Biorad	Sc-2048
Coomassie brilliant blue R- 250	Fluka	27816
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
Fixer Fix-100	Agfa	G382B
Hepes	Sigma-Aldrich	H-0891
Mifepristone	Sigma	M8046
NaCl	Merck	1.06405.1000
NaHCO <sub>3</sub>	Fluka	24610-250G
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich	S8282
NP-40		
OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit	Chemicon	S7150
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich	P4417
Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)	Sigma-Aldrich	P-1379
RNAzol	Molecular Research Center, Inc	RN190-100
Ros Dye (CM-H2DCFDA)	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
Κιταπομόνωσης RNA (NucleoSpin® RNA)	Macherey Nagel	740955.250
Κιτ σύνθεσης cDNA (cDNAsynthesisKitforRT-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
Προπιονικό οξύ	Merck	8.00605.1000
Υδροχλωρικό οξύ (HCl) 37%	Merck	K37471017
Φιλμ αυτοραδιογραφίας	Santa Cruz Biotechnology	Sc-201697

Φορμαλδεύδη 16%	Polysciences	18814-20
Χαρτιά Whatman	Sigma-Aldrich	Z241768

### 2.1.3 Αντισώματα

Αντισώματα	Εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
<b>Πρωτογενή αντισώματα ειδικά για τη <i>Drosophila melanogaster</i></b>		
Ubiquitin (P4D1)	SANTA CRUZ	8017
Histone H2AvD	ROCKLAND	600-401- 914
Anti-GAPDH	SIGMA	G9545
26S Proteasome p54 (28)	Santa Cruz	sc-65748
26S proteasome p42A (123) (Rpn7)	Santa Cruz	65750
26S proteasome $\alpha$ (IIG7)	Santa Cruz	65755
DNP		
Anti-ATP5PF/complex V ubunit-ATP5F1A	abcam	ab14748
2,4- dinitrophenylhydrazone (DNP-hydrazone)	Millipore	s7150
DAPI	Molecular probes TM- TFS	D1306
<b>Δευτερογενή αντισώματα</b>		
Anti-Mo-IgG/HRP	Santa Cruz	Sc-2005
Anti-Rb-IgG/HRP	Santa Cruz	Sc-2004

### 2.1.4 Διαλύματα

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

Διάλυμα αντίδρασης για τη μέτρηση της πρωτεασωματικής ενεργότητας	100mM Hepes pH 7, 4 σε dH <sub>2</sub> O
Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης για τη μέτρηση της πρωτεασωματικής ενεργότητας	30mM CH <sub>3</sub> COONa 70mM CH <sub>3</sub> COOH 100mMClCH <sub>2</sub> COONa pH 5,3 σε dH <sub>2</sub> O
Διάλυμα αντίδρασης για τη μέτρηση της ενεργότητας των καθεψινών B και L	50mM οξικό νάτριο 8mM υδροχλωρική κυστεΐνη 1mM EDTA pH 5,0 σε dH <sub>2</sub> O

### 2.1.5 Real-Time PCR εκκινήτες (Real-Time PCR primers)

Ζεύγη εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην πραγματικού χρόνου Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Real-Time PCR) ειδικά για τη <i>Drosophila melanogaster</i>	
Όνομα εκκινήτη	Αλληλουχία
<i>F-cncC</i> <i>R-cncC</i>	CCA-ACG-AGG-TGG-AAA-TCG-GA ACT-TGA-CAT-TGG-TAG-CCG-CA
<i>Keap1-F</i> <i>Keap1-R</i>	GCGCTCGTCAGCCCATTTT GGATGCGCATAATTCTCTTCTT
<i>Prosa7-F</i> <i>Prosa7-R</i>	TTTTCGCCTGATGGCCGCGT ACCGGTTACCCTGCCACCAA
<i>Prosβ1-F</i> <i>Prosβ1-R</i>	CGAGTCCTGCACCATCGGCG TGCCAATGCGCACCACACCA

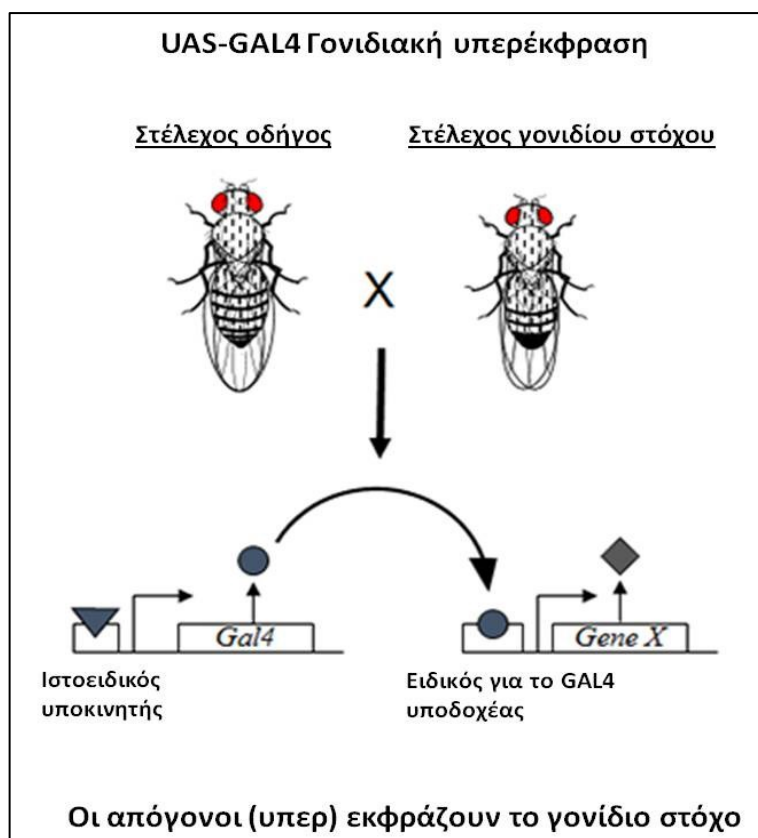
<i>Prosβ5-F</i>	TGGCTGCTCCGCCATTTCGAG
<i>Prosβ5-R</i>	CCGGCCAGCATCATGCCCAT
<i>Rp49-F</i>	AGCACTTCATCCGCCACC
<i>Rp49-R</i>	ATCTCGCCGCAGTAAACG
<i>Cdc6-F</i>	GCC-AAG-GAA-AAG-CAA-GAC-
<i>Cdc6-R</i>	ACT-C ACC-GTA-GAC-CTT-GTT-CAG- CAC
<i>RasV12-F</i>	ATTTCTGTGGACGAGTACGAC
<i>RasV12-R</i>	GTCCGCATATACTGATCCCG

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

### 2.1.6 Διαγονιδιακά στελέχη *Drosophila melanogaster*

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

- Διαγονιδιακά έντομα που υπερεκφράζουν την μεταλλαγμένη μορφή του ογκογονιδίου *Ras85D<sup>v12</sup>* υπό τον έλεγχο του συστήματος UAS. Η μεταλλαγή αντικαθιστά το αμινοξύ γλυκίνη με το αμινοξύ βαλίνη στη θέση 12, κάνοντας το *Ras* μόνιμα ενεργό. Διαγονιδιακά έντομα που υπερεκφράζουν το γονίδιο *Cdc6* (*cell division cycle 6*), υπό τον έλεγχο του συστήματος UAS.
- Διαγονιδιακά έντομα που εκφράζουν καθολικά τον επαγόμενο, μέσω της ουσίας RU486, μεταγραφικό παράγοντα GAL4 υπό τον έλεγχο του υποκινητή της τουμπουλίνης (driver).
- Διπλά διαγονιδιακά έντομα που εκφράζουν καθολικά τον επαγόμενο, μέσω RU486, μεταγραφικό παράγοντα GAL4 υπό τον έλεγχο του υποκινητή της τουμπουλίνης (driver), ενώ ταυτόχρονα υπερεκφράζουν και το μεταγραφικό παράγοντα που εμπλέκεται στην αντιοξειδωτική απόκριση, *cncC*.



**Εικόνα 2.1:** 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.  
(πηγή: <https://smallscienceworks.com/tag/uas-gal4/>).

Τα έντομα καλλιεργήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες καλλιέργειας (*Bioline, 17101*). Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 23-25°C, με υγρασία 60% και με δωδεκάωρη εναλλαγή φωτισμού. Η επαγωγή της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 έγινε έπειτα από διάλυση της ουσίας RU486 στην τροφή των εντόμων σε συγκέντρωση 320μM με στόχο να πραγματοποιηθεί έκφραση του γονιδίου-στόχου. Δεδομένου ότι η ορμόνη διαλύεται σε EtOH (80%), στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας πληθυσμός των εντόμων που καλλιεργήθηκε σε τροφή που περιείχε 80% EtOH.

Δεδομένα από τη μακροβιότητα των εντόμων αναφορικά με την έκφραση του κάθε μελετούμενου γονιδίου όρισαν το χρονικό διάστημα στο οποίο τα πειραματόζωα θα ήταν εκτεθειμένα στη συγκεκριμένη ουσία. Έτσι, τα διαγονιδιακά έντομα που υπερεκφράζουν το γονίδιο *Ras85D<sup>v12</sup>* είτε μόνο του ή σε συνδυασμό με το γονίδιο *encC* τρέφονταν με



RU486 για τρεις ημέρες και έπειτα μελετούνταν πειραματικά. Τα διαγονιδιακά έντομα που υπερεκφράζουν το γονίδιο *Cdc6* και το *Cdc6* σε συνδυασμό με το γονίδιο *cncC* καλλιεργούνταν με RU486 για επτά ημέρες.

### 2.1.7 Η τροφή των εντόμων

Η κανονική τροφή (standardmedium) 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 H<sub>2</sub>O βρύσης

Ογκομετρούμε 450 ml H<sub>2</sub>O. Σε μικρή ποσότητα νερού από τα 450ml διαλύουμε τη μαγιά και τον τοματοπολτό. Έπειτα, βράζουμε το υπόλοιπο H<sub>2</sub>O 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.

## 2.2 Μέθοδοι

### 2.2.1 Μοριακές Τεχνικές

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

Ολικό RNA από σωματικούς ιστούς εντόμων απομονώθηκε με τη χρήση RNAzol (Molecular Research Center, Inc). Στη συνέχεια, συντέθηκε cDNA από 1 µg ολικού RNA με τη χρήση του One script cDNA Synthesis Kit της ABM GOOD. Η αντίδραση Q-RT-PCR πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή PikoReal Real-Time (Thermo Scientific) σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου 5x HOT FIRE Pol Eva green qPCR Mix Plus. Οι καμπύλες τήξης (Melting curves) εξετάστηκαν μετά το στάδιο του πολλαπλασιασμού του προϊόντος της PCR για την επιβεβαίωση μοναδικών ειδικών προϊόντων. Επίσης για κάθε ζεύγος εκκινητών (primers) πραγματοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη για να βρεθεί η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης τους.

Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε είναι το εξής:

-95°C για 10'	}	x 40
-95°C για 15''		
-60°C για 30''		
-72°C για 30''		

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

#### 2.2.1.2 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.

### **2.2.1.3 Μέτρηση ενζυμικής ενεργότητας πρωτεασώματος**

Οι ιστοί συλλέχθηκαν (συνολικά 5-6 άτομα ανά δείγμα) στο διάλυμα λύσης 26S για τη μέτρηση της ενεργότητας του 26S πρωτεασώματος. Με τη χρήση του παραπάνω διαλύματος απομονώθηκαν ενεργά πρωτεασώματα. Ακολουθήθηκε ομογενοποίηση, φυγοκέντρηση στα 19,000 x g (4°C) για 10 λεπτά, συλλογή υπερκειμένου και ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου με τη μέθοδο Bradford. 20 μg πρωτεΐνης επώστηκαν για 30 λεπτά (37°C) στο διάλυμα αντίδρασης (100 mM HEPES, pH 7.4) ξεχωριστά με κάθε ένα από τα δύο φλουροοπεπτίδια CT-L (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC-LLVY) και C-L (Z-Leu-Leu-Glu-AMC-LLE), τα οποία είναι ειδικά για κάθε μια πρωτεασωματική υπομονάδα, β5 και β1, αντίστοιχα. Κατά τη διαδικασία της επώασης, το κάθε φλουροοπεπτίδιο αναγνωρίστηκε από την αντίστοιχη ενζυματική ενεργότητα του πρωτεασώματος (το φλουροοπεπτίδιο LLVY από την ενεργότητα χυμοθρυψίνης που εδράζεται στην υπομονάδα β5 και το LLE από την ενεργότητα κασπάσης που εδράζεται στην υπομονάδα β1). Το φλουροοπεπτίδιο αποικοδομήθηκε και παράχθηκε φθορισμός. Μετά την επώαση προστέθηκε διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης και ο παραγόμενος φθορισμός καταγράφηκε στο φθορισμόμετρο (φίλτρο διέγερσης, 350 nm / φίλτρο εκπομπής, 440 nm; VersaFluor™ Fluorometer System, Biorad).

### **2.2.1.4 Μέτρηση ενεργότητας λυσοσώματος**

Ο έλεγχος της ενεργότητας του λυσοσώματος πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της ενζυματικής ενεργότητας των καθεψινών B και L. Η ενεργότητα των καθεψινών B και L αναλύθηκε σύμφωνα με τους Grimm και συν.<sup>167</sup> με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, σωματικοί ιστοί ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα λύσης και ακολουθήθηκε φυγοκέντρηση για 20 λεπτά, 15.000 xg (4°C). Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford και στη συνέχεια 20 μg πρωτεΐνης προστέθηκαν στο διάλυμα της αντίδρασης (βλέπε Πίνακα 2.5). Το μίγμα επώστηκε παρουσία του φλουροοπεπτιδίου z-FR-AMC (Enzo Life Sciences) για 30 λεπτά στους

37°C. Μετά το τέλος της επώασης καταγράφηκε ο παραγόμενος φθορισμός (φθορισμόμετρο–Versa Fluor TM Fluorometer System, Biorad) με φίλτρα μήκους κύματος διέγερσης 350 nm και μήκους κύματος εκπομπής 440 nm.

### **2.2.1.5 Μέτρηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)**

Οι ιστοί από 8-10 άτομα ανά δείγμα συλλέχθηκαν σε 200 μl PBS (εις διπλούν το κάθε δείγμα). Στη συνέχεια προστέθηκε η χρωστική DCF-DA (Invitrogen) διαλυμένη σε PBS (200 μl) σε συγκέντρωση 10 μM. Ακολουθήθηκε vortex για κάθε δείγμα και επώαση (30 λεπτά) στους 25°C για τους ιστούς στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε η χρωστική και ακολουθήθηκε επώαση για 15 λεπτά με 200 μl φρέσκο 1x PBS. Τα δείγματα πλύθηκαν δύο φορές με φρέσκο 1x PBS και ομογενοποιήθηκαν με διάλυμα λύσης NP-40 που περιείχε αναστολέα των πρωτεασών. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 19.000x g (4°C), συλλέχθηκε το υπερκείμενο και ακολουθήθηκε η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τέλος στο υπερκείμενο προστέθηκε dH<sub>2</sub>O μέχρι το 1 ml και με τη χρήση του φθορόμετρου (Versa Fluor TM Fluorometer System, Biorad) με φίλτρα μήκους κύματος διέγερσης (Excitation) στα 490 nm και μήκους κύματος εκπομπής (Emission) στα 520 nm και καταγράφηκε ο εκπεμπόμενος φθορισμός. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα που περιείχε τη χρωστική αλλά δεν είχε πρωτεΐνη. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε προς την ποσότητα της πρωτεΐνης.

### **2.2.1.6 SDS-PAGE ανοσοστύπωμα κατά Western**

Οι σωματικοί ιστοί ομογενοποιήθηκαν με διάλυμα λύσης NP-40 που περιείχε τον αναστολέα των πρωτεασών. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 19,000x g (4°C), συλλογή του υπερκειμένου και προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Έπειτα οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε ομοιογενές πήκτωμα 12 % ακρυλαμίδης, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και στη συνέχεια η μεμβράνη επώαστηκε για 50 λεπτά με διάλυμα κάλυψης των μη ειδικών θέσεων [5 % γάλα με χαμηλά λιπαρά διαλυμένο σε 1x TBS παρουσία 0.1 % Tween-20] σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρωτογενές και δευτερογενές αντίσωμα που φέρει την υπεροξειδάση του ραπανακιού (HRP) (διαλυμένα στο διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων) επώαστηκαν για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Πραγματοποιήθηκαν 3

πλυσίματα μετά τις επώσεις με τα αντισώματα με το διάλυμα 1x TBS, 0.1 % Tween-20. Η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου (πρωτεΐνη υπό μελέτη)- αντισώματος έγινε με τη μέθοδο ECL (Santa Cruz Biotechnology) και τη χρήση υπεροξειδίου (υπόστρωμα για το ένζυμο υπεροξειδάση) και λουμινόλης ως ενισχυτή χημειοφωταύγειας. Η χημειοφωταύγεια αποτυπώθηκε σε φιλμ αυτοραδιογραφίας και η εμφάνιση του φιλμ πραγματοποιήθηκε με τη μεταφορά του σε διάλυμα εμφάνισης (developer) για περίπου 1 έως 5 λεπτά. Ακολουθήθηκε ξέπλυμα σε H<sub>2</sub>O βρύσης και μονιμοποίηση σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer) για 5 έως 10 λεπτά. Τέλος, το φιλμ ξεπλύθηκε πολύ καλά με H<sub>2</sub>O βρύσης.

Η μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά αφού αφαιρεθούν τα αντισώματα μετά από επώαση της μεμβράνης με το διάλυμα απομάκρυνσης των αντισωμάτων (βλέπε Πίνακα 2.5) στους 60°C για 45 λεπτά και αφού ακολουθήσουν 3 πλυσίματα της μεμβράνης με διάλυμα 1x TBS, 0.1 % Tween 20.

Για την ανίχνευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών έγινε επεξεργασία του πρωτεϊνικού δείγματος σύμφωνα με τις οδηγίες του OxyBlot kit (Chemicon) και στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία του SDS PAGE ανοσοοστυπώματος κατά Western με τη χρήση του ειδικού αντισώματος έναντι της 2,4-Dinitrophenol (anti-DNP).

### **2.2.1.7 Μέθοδος ανοσοφθορισμού σε ενήλικα έντομα**

Για την οπτικοποίηση των μιτοχονδρίων στον μυϊκό ιστό των ενήλικων εντόμων πραγματοποιήθηκε ανατομία σε νεαρές μύγες. Οι μύγες αναισθητοποιήθηκαν μετά από σύντομη έκθεση σε αιθέρα ή CO<sub>2</sub>, στη συνέχεια τοποθετήθηκαν (με την ραχιαία πλευρά προς τα κάτω) σε τρυβλίο Petri επικαλυμμένο με λεπτό στρώμα βαζελίνης για να αποφευχθεί οποιαδήποτε κίνηση. Χρησιμοποιώντας ειδικό ψαλίδι ανατομίας, λαβίδες και κατάλληλα τριχοειδή (Vannas Spring Scissors, straight, 2,5mm) τη χρήση λαβίδας και κατάλληλων τριχοειδών (διάμετρος μικρότερη από 40μm), απομακρύνθηκε η κοιλιακή επιδερμίδα για να αποκαλυφθεί ο μυϊκός ιστός.

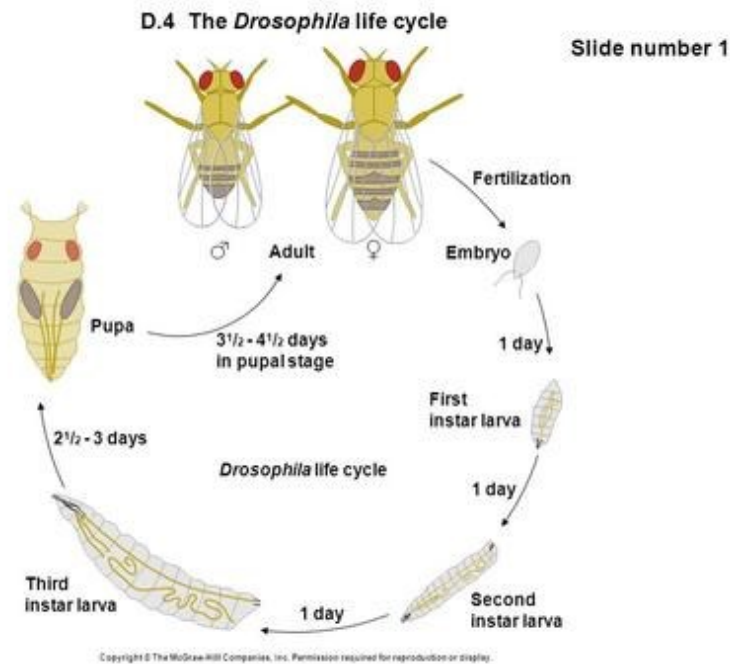
### **2.2.2 Πειραματικό μοντέλο: Το έντομο *Drosophila melanogaster***

Το κύριο πειραματικό μοντέλο της παρούσας εργασίας ήταν το δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster*. Το συγκεκριμένο έντομο αποτελεί ένα από τα πιο χρησιμοποιημένα μοντέλα γήρανσης<sup>168</sup> εξαιτίας του μικρού χρόνου γενεάς, του μικρού της μεγέθους και του σύντομου κύκλου ζωής της, ο οποίος διαρκεί περίπου 10 ημέρες στους 25°C, καθώς και του μεγάλου εύρους των γενετικών χειρισμών που είναι διαθέσιμες. Επίσης, το πειραματικό μοντέλο *D. melanogaster* είναι ιδανικό για τέτοιου

είδους μελέτες, καθώς το πρωτεάσωμα του είναι όμοιο με αυτό των θηλαστικών, επίσης διαθέτει τόσο μεταμιτωτικά όσο και μιτωτικά κύτταρα, ενώ ακόμα, πολλά μεταβολικά μονοπάτια είναι όμοια με αυτά των θηλαστικών <sup>168</sup>.

### 2.2.2.1 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 ενήλικου και τους κοιλιακούς ιστοβλάστες.



**Εικόνα 2.2: Ο κύκλος ζωής του εντόμου *Drosophila melanogaster*.** Ο κύκλος ζωής της *Drosophila melanogaster* περιλαμβάνει έξι κύρια στάδια. Μετά τη γονιμοποίηση, αναπτύσσεται από ένα έμβρυο σε περίπου 24 ώρες μία προνύμφη πρώτου σταδίου. Μετά από άλλες 24 ώρες η προνύμφη πρώτου σταδίου εκδύεται σε προνύμφη δευτέρου σταδίου. Μετά από ακόμα 24 ώρες η προνύμφη δευτέρου σταδίου εκδύεται σε τρίτου σταδίου. Σε περίπου τρεις μέρες, η προνύμφη τρίτου σταδίου μεταμορφώνεται σε νύμφη (pupa). Τρεις με πέντε μέρες αργότερα, το ενήλικο άτομο αναπτύσσεται από την ήδη υπάρχουσα νύμφη. Ο κύκλος ζωής χρειάζεται περίπου 12 ημέρες για να ολοκληρωθεί (πηγή: *Drosophila melanogaster*, 2017 Image from: [http://www.easternct.edu/~adams/Drosophila life cycle.html](http://www.easternct.edu/~adams/Drosophila%20life%20cycle.html)).

### 2.2.2.2 Ωογένεση

Κατά την αρχή της ωογένεσης, το γαμετικό κύτταρο διαιρείται τέσσερις φορές, με αποτέλεσμα το σχηματισμό 16 κυττάρων, από τα οποία το ένα γίνεται ωοκύτταρο και τα υπόλοιπα 15 τροφοκύτταρα. Ολόκληρο το σύμπλεγμα ωοκύτταρου- τροφοκυττάρων (γαμετικής προέλευσης) περιβάλλεται από τα θυλακοκύτταρα των ωοθυλακίων (σωματικής προέλευσης), σχηματίζοντας μια δομή που καλείται ωοθυλάκιο. Τα θυλακοκύτταρα προέρχονται από τις γονάδες και κατά συνέπεια από τη σωματική και όχι από τη γαμετική σειρά<sup>169</sup>.

### 2.2.2.3 Εμβρυογένεση

Κατά τη γονιμοποίηση το σπερματοζώαριο 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, έπειτα το συγκυτιακό βλαστώδερμα, το οποίο μετά το διαχωρισμό των πυρήνων, θα δώσει το κυτταρικό βλαστώδερμα. Ακολούθως, ξεκινά η γαστριδίωση που οδηγεί στο σχηματισμό των τριών βλαστικών στιβάδων, από τις οποίες θα προκύψουν τα όργανα του εντόμου<sup>169</sup>.

### 2.2.2.4 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<sup>169</sup>.

#### **2.2.2.5 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 έμβρυα. 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 κατά την ερωτική επαφή.

#### **2.2.2.6 Καλλιέργεια του εντόμου *D. melanogaster***

Οι καλλιέργειες των εντόμων συντηρούνται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 25°C και υγρασίας 60 %, ενώ η αλλαγή του θρεπτικού πραγματοποιείται κάθε 3-4 μέρες.

#### **2.2.2.7 Έλεγχος βιωσιμότητας**

Για τον έλεγχο του προσδόκιμου ζωής των εντόμων, συλλέχθηκαν ίσα θηλυκά και αρσενικά έντομα και καλλιεργήθηκαν σε σωλήνες καλλιέργειας. Τα έντομα μεταφέρονταν 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).



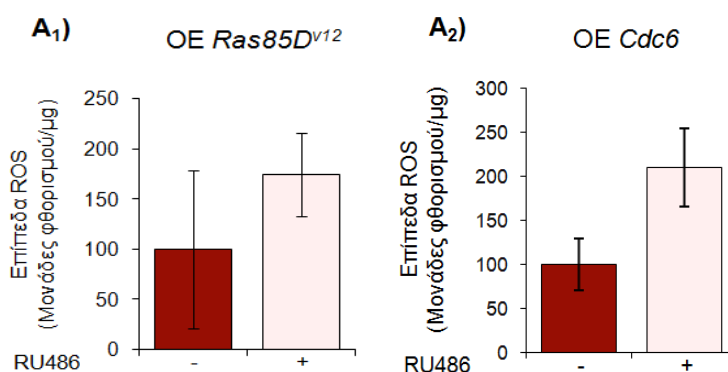
### 3. Αποτελέσματα

Η παρούσα εργασία αφορά το χαρακτηρισμό προσαρμογών στη φυσιολογία του εντόμου *Drosophila melanogaster* έπειτα από την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του καρκίνου σε σωματικούς ιστούς του εντόμου. Μελετήθηκαν μεταβολές των μοριακών μηχανισμών, καθώς και αλλαγές τόσο στη μορφολογία όσο και στη λειτουργία των μιτοχονδρίων των συγκεκριμένων εντόμων.

Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα διαγονιδιακά στελέχη που υπερεκφράζουν (που αναφέρεται ως OE) το μεταλλαγμένο *Ras85D<sup>v12</sup>* και το γονίδιο *Cdc6*. Η έκφραση των γονιδίων γίνεται καθοδικά επαγωγίμου υποκινητή ύστερα από τη χορήγηση της ουσίας RU486. Επιπλέον, πειράματα πραγματοποιήθηκαν και στα διπλά διαγονιδιακά έντομα που δημιουργήθηκαν από εμάς και υπερεκφράζουν τα παραπάνω γονίδια είτε σε συνδυασμό με το γονίδιο *cncC* (ομόλογο του ανθρώπινου *NRF2*) ή μεταξύ τους (*Ras85D<sup>v12</sup>*, *Cdc6*).

#### 3.1 Η υπερέκφραση των *Ras85D<sup>v12</sup>* και *Cdc6* τείνει να αυξήσει τα επίπεδα οξειδωτικού στρες στο έντομο *Drosophila melanogaster*

Σύμφωνα με πολλές θεωρίες της γήρανσης, το ποσοστό των ελεύθερων ριζών οξυγόνου αυξάνεται κατά τη γήρανση, όπως και κατά την καρκινογένεση<sup>91</sup>. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των δραστικών μορφών οξυγόνου σε έντομα που υπερεκφράζουν το *Ras85D<sup>v12</sup>*, όπως επίσης και σε διαγονιδιακά έντομα OE *Cdc6*. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως παρουσιάζεται μία τάση προς αύξηση των επιπέδων ROS και στις δύο περιπτώσεις σε σχέση με τα αντίστοιχα έντομα μάρτυρες (Εικόνα 3.1).

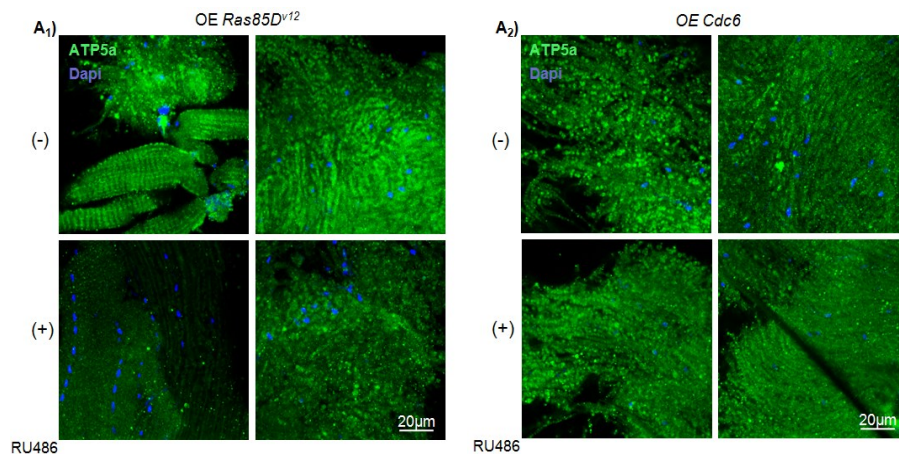


Εικόνα 3.1: Η καθολική υπερέκφραση του μεταλλαγμένου *Ras85D<sup>v12</sup>* καθώς και του γονιδίου *Cdc6* τείνει να προκαλεί μία αύξηση του οξειδωτικού στρες στον

**οργανισμό.** Α<sub>1</sub>) Σχετικά (%) επίπεδα ROS ύστερα από τρεις ημέρες υπερέκφρασης του *Ras85D<sup>v12</sup>*. Α<sub>2</sub>) Σχετικά (%) επίπεδα ROS ύστερα από επτά ημέρες υπερέκφρασης του γονιδίου *Cdc6*. Οι μπάρες των σφαλμάτων: ± SD.

### 3.2 Η αριθμός των μιτοχονδρίων μειώνεται περισσότερο στα διαγονιδιακά έντομα OE *Ras85D<sup>v12</sup>* σε σχέση με τα έντομα που υπερεκφράζουν το *Cdc6*

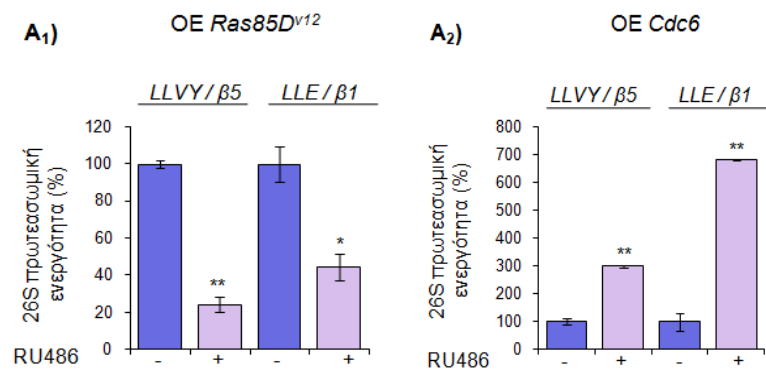
Μετά την ανίχνευση των αυξημένων επιπέδων ROS στα διαγονιδιακά έντομα OE *Ras85D<sup>v12</sup>* και OE *Cdc6* αντίστοιχα, διεξήχθη πειραματική διαδικασία για την απεικόνιση της δομής των μιτοχονδρίων μέσω ανοσοφθορισμού σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η υπερέκφραση του μεταλλαγμένου *Ras85D<sup>v12</sup>* γονιδίου συνεπάγεται με μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων σε σχέση με τα έντομα μάρτυρες. Στα διαγονιδιακά έντομα OE *Cdc6* δεν εντοπίστηκαν ιδιαίτερες μεταβολές (Εικόνα 3.2).



**Εικόνα 3.2:** Η δομή των μιτοχονδρίων σε μυϊκό ιστό εντόμων ύστερα από την καθολική υπερέκφραση του μεταλλαγμένου *Ras85D<sup>v12</sup>* καθώς και του γονιδίου *Cdc6*. Α) Απεικόνιση των μιτοχονδρίων (πράσινο χρώμα) μέσω ανίχνευσης της υπομονάδας ATP5a με ειδικό αντίσωμα προς αυτήν. Με μπλε χρώμα εντοπίζονται οι πυρήνες. Α<sub>1</sub>) Διαγονιδιακά έντομα OE *Ras85D<sup>v12</sup>* στα οποία φαίνεται η μείωση του αριθμού των μιτοχονδρίων ως προς τα αντίστοιχα έντομα μάρτυρες. Α<sub>2</sub>) Διαγονιδιακά έντομα OE *Cdc6* στα οποία δεν φαίνεται να υπάρχουν ιδιαίτερες μεταβολές όσον αφορά τον αριθμό των μιτοχονδρίων σε σύγκριση με τον πληθυσμό μάρτυρα.

### 3.3 Η καθολική υπερέκφραση των *Ras85D<sup>v12</sup>* και *Cdc6* ρυθμίζει με διαφορετικό τρόπο την ενεργότητα του 26S πρωτεασώματος

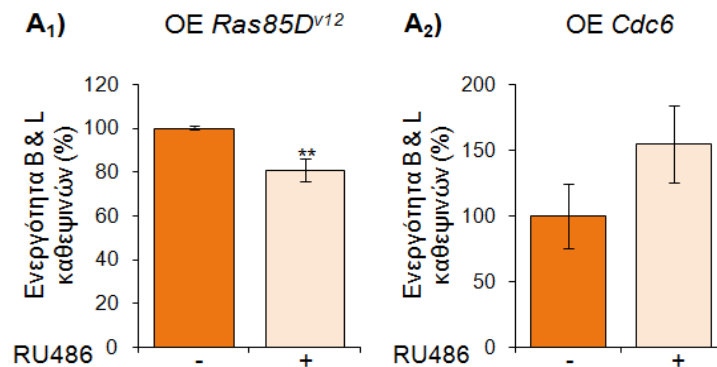
Επόμενο στάδιο αποτελεί η μελέτη του μονοπατιού ουβικιτίνης-πρωτεασώματος (Ubiquitin-proteasome pathway, UPP) που συγκαταλέγεται στους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς για τη διατήρηση της πρωτεόστασης. Δεδομένου πως η γήρανση και ο καρκίνος επιφέρουν μεταβολές στο δίκτυο πρωτεόστασης<sup>28</sup>, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε διαγονιδιακά έντομα OE *Ras85D<sup>v12</sup>* και OE *Cdc6*, που διερευνούν την λειτουργία του 26S πρωτεασώματος. Πιο συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκε η καταλυτική ενεργότητα της υπομονάδας β5 (χυμοθρυψίνης/ LLVY) και η ενεργότητα της υπομονάδας β1 (κασπάσης/ LLE). Στην υπερέκφραση του *Ras85D<sup>v12</sup>* παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση της ενεργότητας και των δύο υπομονάδων (Εικόνα 3.3 A<sub>1</sub>). Σε αντίθεση με αυτό, τα διαγονιδιακά έντομα OE *Cdc6* εμφάνισαν μια σημαντική αύξηση και των δύο ενεργοτήτων (Εικόνα 3.3 A<sub>2</sub>).



**Εικόνα 3.3:** Η καθολική υπερέκφραση του μεταλλαγμένου *Ras85D<sup>v12</sup>* οδηγεί σε έκπτωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας, ενώ η αντίστοιχη υπερέκφραση του *Cdc6* οδηγεί σε ενίσχυση της πρωτεασωμικής ενεργότητας. A<sub>1</sub>) Σχετική (%) ενεργότητα των υπομονάδων β5 και β1 του 26S πρωτεασώματος ύστερα από τρεις μέρες επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης του *Ras85D<sup>v12</sup>*. A<sub>2</sub>) Σχετική (%) ενεργότητα των υπομονάδων β5 και β1 έπειτα από επτά μέρες επαγωγής της γονιδιακής έκφρασης *Cdc6*. Οι μπάρες των σφαλμάτων: ± SD, \*, P<0.05, \*\*, P<0.01.

### 3.4 Η υπερέκφραση των *Ras85D<sup>v12</sup>* και *Cdc6* προκαλεί αντίθετη απόκριση στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος (Autophagy-Lysosome Pathway, ALP)

Στη συνέχεια, μελέτηθηκε η λειτουργία του δεύτερου κύριου μονοπατιού της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης. Πιο συγκεκριμένα, εκτιμήθηκε η ενεργότητα των B και L καθεψινών, δύο από τις πρωτεάσες που διαθέτουν τα λυσοσώματα. Στα OE *Ras85D<sup>v12</sup>* έντομα *Drosophila melanogaster*, παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση των δύο ενζυμικών ενεργοτήτων. Σε αντίθεση με το OE *Ras85D<sup>v12</sup>*, σε έντομα που υπερεκφράζουν το *Cdc6*, παρατηρήθηκε μία τάση για αύξηση της ενεργότητας των B και L καθεψινών (Εικόνα 3.4).



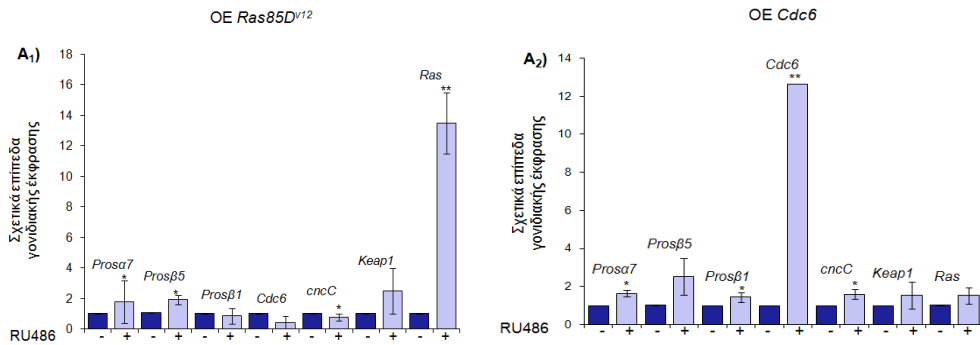
**Εικόνα 3.4:** Έντομα που υπερεκφράζουν το *Ras85D<sup>v12</sup>* παρουσιάζουν μείωση της ενεργότητας των καθεψινών B και L ενώ τα διαγονιδιακά έντομα OE *Cdc6* εμφανίζουν μία τάση προς αύξηση. A<sub>1</sub>) Σχετική (%) ενεργότητα των καθεψινών B και L σε άτομα τρεις μέρες μετά την επαγωγή του *Ras85D<sup>v12</sup>*. A<sub>2</sub>) Σχετική (%) ενεργότητα των καθεψινών B και L επτά μέρες μετά την επαγωγή του γονιδίου *Cdc6*. Οι μπάρες των σφαλμάτων: ± SD, \*, P<0.05, \*\*, P<0.01.

### 3.5 Τα διαγονιδιακά έντομα OE *Ras85D<sup>v12</sup>* όπως και τα διαγονιδιακά έντομα *Cdc6* επηρεάζουν την έκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων

Ύστερα από τα πειράματα για την εκτίμηση της ενεργότητας του 26S πρωτεασώματος, μελετήθηκε σε μοριακό επίπεδο η γονιδιακή έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων.

Ως προς τα επίπεδα της γονιδιακής τους έκφρασης αναλύθηκαν τα επίπεδα των πρωτεασωμικών υπομονάδων (*Prosa7*, *Prosβ5* *Prosβ1*), των κύριων ρυθμιστών του μονοπατιού *cncC/Keap1* και η έκφραση των δύο υπό μελέτη γονιδίων *Ras* και *Cdc6*. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η υπερέκφραση του *Ras85D<sup>v12</sup>* τείνει να αυξορρυθμίζει την έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων  $\alpha 7$  και  $\beta 5$ . Περαιτέρω, παρατηρήθηκε η μείωση της έκφρασης του γονιδίου *cncC* αλλά και του *Cdc6* στα διαγονιδικά έντομα *Ras85D<sup>v12</sup>* (Εικόνα 3.5 A<sub>1</sub>).

Σε αντίθεση με τα διαγονιδικά έντομα OE *Ras85D<sup>v12</sup>*, τα έντομα που υπερεκφράζουν το *Cdc6* εμφάνισαν αύξηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεασωμικών γονιδίων *Prosa7*, *Prosβ5*, *Prosβ1* αλλά και του ρυθμιστή τους *cncC*. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στα σχετικά επίπεδα των γονιδίων *Keap1* και *Ras* (Εικόνα 3.5 A<sub>2</sub>).



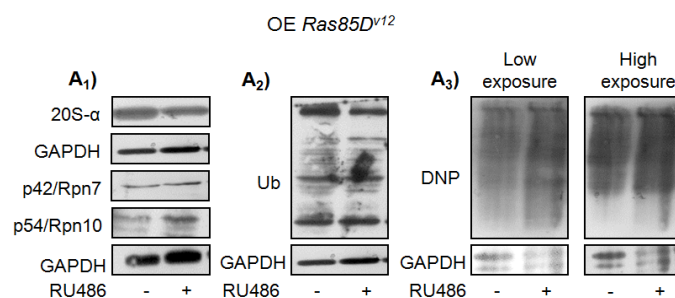
**Εικόνα 3.5: Ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης των μορίων του μονοπατιού UPP μέσω Real-Time PCR πραγματικού χρόνου σε διαγονιδικά OE *Ras85D<sup>v12</sup>* και OE *Cdc6* έντομα. A<sub>1</sub>) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ύστερα από τρεις μέρες επαγωγής της έκφρασης του μεταλλαγμένου *Ras85D<sup>v12</sup>*. A<sub>2</sub>) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ύστερα από επτά μέρες επαγωγής της υπερέκφρασης του *Cdc6*. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Οι μπάρες των σφαλμάτων:  $\pm$  SD, \*, P<0.05, \*\*, P<0.01.**

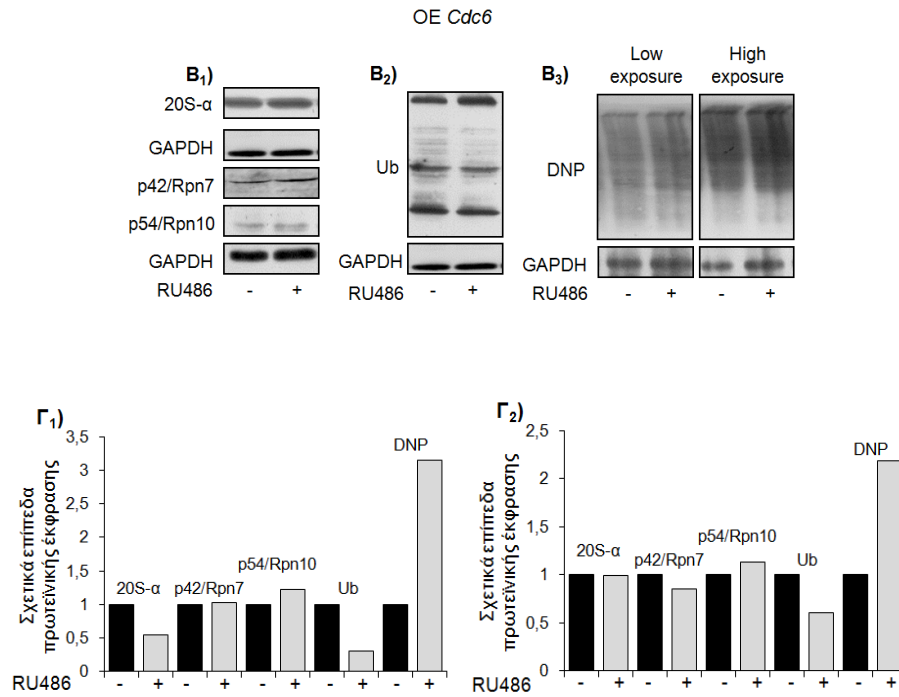
### 3.6 Η υπερέκφραση των *Ras85D<sup>v12</sup>* και *Cdc6* οδηγεί σε απορρύθμιση των πρωτεασωματικών υπομονάδων και σε συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών

Μετά την μελέτη των ενεργοτήτων του πρωτεασώματος και του λυσοσώματος που αποτελούν τους κύριους ρυθμιστές των δύο πρωτεολυτικών μονοπατιών UPP και ALP, αλλά και της γονιδιακής έκφρασης σε έντομα με το υπόβαθρο της υπερέκφρασης του *Ras85D<sup>v12</sup>* και *Cdc6*, ακολούθησε η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Από πειράματα SDS-PAGE ανοσοστυπώματος κατά Western, ανιχνεύθηκαν ημιποσοτικά τα επίπεδα έκφρασης των εξής πρωτεϊνών: της πρωτεασωματικής υπομονάδας 20S-α, της υπομονάδας p42 ή Rpn7 που βρίσκεται στο κάλυμμα του 19S ρυθμιστικού τμήματος του πρωτεασώματος, της υπομονάδας p54 ή Rpn10 που αποτελεί μόριο-συνδέτη μεταξύ καλύμματος και βάσης του 19S ρυθμιστικού τμήματος αλλά και υποδοχέα ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών, του συνόλου ουβικιτινιωμένων (Ub) και οξειδωμένων (DNP) πρωτεϊνών.

Στα διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>* έντομα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της πρωτεασωματικής υπομονάδας 20S-α αλλά αύξηση της υπομονάδας p54/Rpn10, ενώ δεν υπήρχε καμία μεταβολή στην έκφραση της υπομονάδας p42/Rpn7 (Εικόνα 3.6 A<sub>1</sub>), όπως υποδεικνύεται και από την ποσοτικοποίηση του ανοσοστυπώματος Western (Εικόνα 3.6 Γ<sub>1</sub>). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση των ολικών ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών και μια σημαντική αύξηση των επιπέδων οξειδωμένων πρωτεϊνών (Εικόνα 3.6 A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>).

Στη περίπτωση των εντόμων που υπερεκφράζουν το γονίδιο *Cdc6*, δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεασωματικής υπομονάδας 20S-α, η υπομονάδα p42/Rpn7 εμφάνισε μειωμένη έκφραση και η υπομονάδα p54/Rpn10 ήπια αύξηση (Εικόνα 3.6 B<sub>1</sub>, Γ<sub>2</sub>). Όσον αφορά τα επίπεδα των ολικών ουβικιτινιωμένων και οξειδωμένων πρωτεϊνών, τα έντομα OE *Cdc6* παρουσίασαν μία παρόμοια εικόνα με τα έντομα *Ras85D<sup>v12</sup>*, δηλαδή μείωση των ουβικιτινιωμένων και αύξηση των οξειδωμένων πρωτεϊνών (Εικόνα 3.6 B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>).





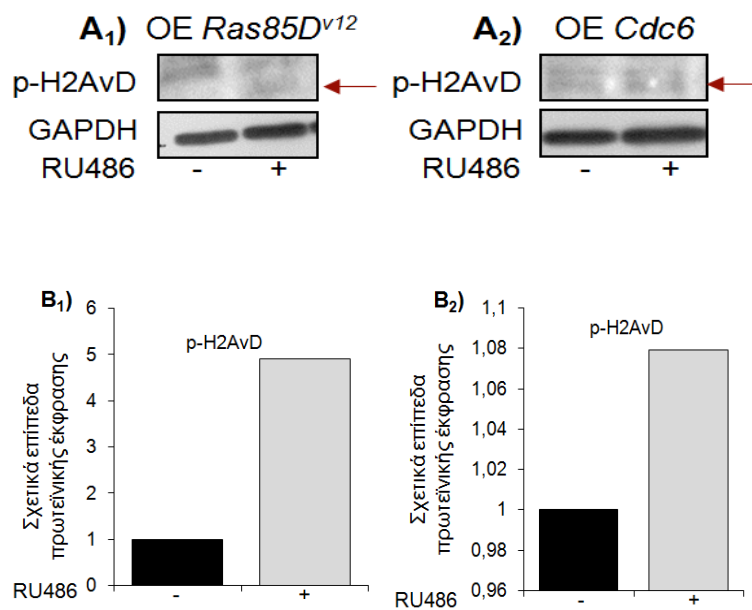
**Εικόνα 3.6:** Ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης των μορίων του μονοπατιού UPP σε διαγονιδιακά OE *Ras85D*<sup>v12</sup> και OE *Cdc6* έντομα. (A<sub>1</sub>-A<sub>3</sub>) Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western για τον προσδιορισμό των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων (A<sub>1</sub>), των ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών (A<sub>2</sub>) και των οξειδωμένων πρωτεϊνών (A<sub>3</sub>) σε διαγονιδιακά OE *Ras85D*<sup>v12</sup>. (B<sub>1</sub>-B<sub>3</sub>) Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western για τον προσδιορισμό των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης για τον προσδιορισμό των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων (B<sub>1</sub>), των ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών (B<sub>2</sub>) και των οξειδωμένων πρωτεϊνών (B<sub>3</sub>) σε διαγονιδιακά OE *Cdc6* έντομα. Γ<sub>1</sub>) Σχετικά επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης στα διαγονιδιακά OE *Ras85D*<sup>v12</sup> έντομα. Γ<sub>2</sub>) Σχετικά επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης στα διαγονιδιακά OE *Cdc6* έντομα. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

### 3.7 Η υπερέκφραση των *Ras85D*<sup>v12</sup> και *Cdc6* οδηγεί σε συσσώρευση βλαβών στο γενετικό υλικό

Η γενωμική αστάθεια αποτελεί ένα κοινό ορόσημο της γήρανσης και του καρκίνου. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι το *Ras85D*<sup>v12</sup> και το *Cdc6* εμπλέκονται στην καρκινογένεση και ιδιαίτερα το γονίδιο *Cdc6* στην αντιγραφή του DNA, θέλαμε να μελετήσουμε τις

ενδεχόμενες αλλαγές στην ακεραιότητα του γενετικού υλικού των εντόμων. Για το λόγο αυτό ανιχνεύθηκε μέσω πειραμάτων ανοσοστυπώματος Western, η έκφραση της φωσφορυλιωμένης ιστόνης  $\gamma$ -H2AX, η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύεται σε θραύσματα του γενετικού υλικού (Double Strand Breaks, DSBs). Στην *Drosophila melanogaster*, η ιστόνη αυτή γνωστή ως H2AvD είναι αρκετά συντηρημένη.

Στα διαγονιδιακά *Ras85D<sup>v12</sup>* έντομα παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της ιστόνης H2AvD σε σχέση και με τα έντομα μάρτυρες αλλά και με τα διαγονιδιακά *Cdc6*, όπου υπάρχει ελάχιστη άνοδος (Εικόνα 3.7), αποτελώντας ένδειξη της παρουσίας βλαβών στο γενετικό υλικό.

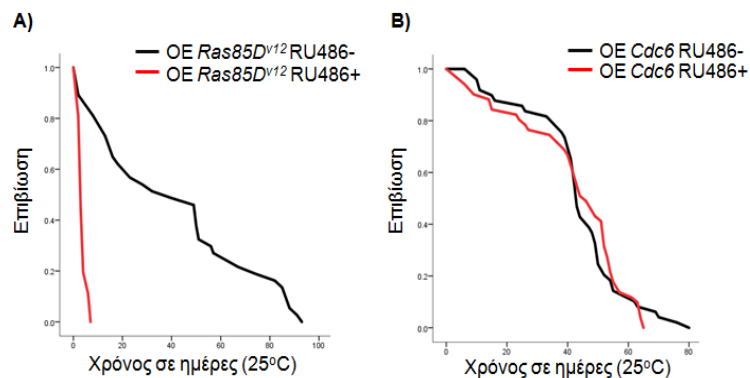


**Εικόνα 3.7: Ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H2AvD σε διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>* και OE *Cdc6* έντομα** A<sub>1</sub>) Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western τον προσδιορισμό των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης της ιστόνης H2AvD σε διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>* έντομα. A<sub>2</sub>) Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western τον προσδιορισμό των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης της ιστόνης H2AvD σε διαγονιδιακά OE *Cdc6* έντομα. B<sub>1</sub>) Σχετικά επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης στα διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>* έντομα. B<sub>2</sub>) Σχετικά επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης στα διαγονιδιακά OE *Cdc6* έντομα. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.



### 3.8 Τα αυξημένα επίπεδα του *Ras85D<sup>v12</sup>* προκαλούν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας ενώ η υπερέκφραση του *Cdc6* επηρεάζει σε μικρό βαθμό το προσδόκιμο ζωής στα έντομα *Drosophila melanogaster*

Με βάση τους πίνακες από το (Παράρτημα 1), παρατηρείται ότι στα έντομα όπου επάγεται υπερέκφραση του *Ras85D<sup>v12</sup>*, το προσδόκιμο ζωής μειώνεται δραστικά ως προς τα αντίστοιχα έντομα μάρτυρες (Εικόνα 3.8 Α). Πολλά από τα έντομα που υπερεκφράζουν το *Ras85D<sup>v12</sup>* εμφάνισαν θνησιμότητα από τις πρώτες ώρες επαγωγής του διαγονιδίου, όπως υποδεικνύεται και στην Εικόνα 3.8 Α. Τα έντομα *Ras85D<sup>v12</sup>* κατάφεραν να επιβιώσουν για ένα αρκετά περιορισμένο διάστημα των επτά ημερών συγκριτικά με τα αντίστοιχα έντομα μάρτυρες (με μέγιστο επιβίωσης τις 93 ημέρες). Όσον αφορά την υπερέκφραση του γονιδίου *Cdc6*, φαίνεται να οδηγεί σε μία ήπια μείωση του προσδόκιμου ζωής και στην υποβάθμιση της ποιότητας ζωής στα πρώτα στάδια ως προς τα έντομα μάρτυρες (Εικόνα 3.8 Β).



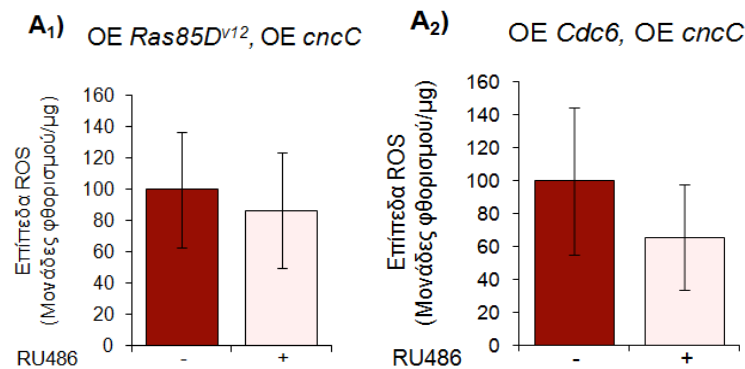
**Εικόνα 3.8: Μελέτη του προσδόκιμου ζωής σε διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>* αλλά και σε διαγονιδιακά OE *Cdc6* έντομα. Α) Καταγραφή εντόμων που υπερεκφράζουν το μεταλλαγμένο *Ras85D<sup>v12</sup>*. Β) Καταγραφή εντόμων που υπερεκφράζουν το γονίδιο *Cdc6*.**

### 3.9 Η συνδυαστική υπερέκφραση των *Ras85D<sup>v12</sup>*, *cncC* και των *Cdc6*, *cncC* στο έντομο *Drosophila melanogaster* τείνει να μειώνει το οξειδωτικό στρες

Όπως είδαμε η υπερέκφραση του *Ras85D<sup>v12</sup>* και του *Cdc6* οδήγησε σε αύξηση του οξειδωτικού φορτίου (επίπεδα ROS και σύνολο των οξειδωμένων πρωτεϊνών).

Επιλέξαμε να υπερεκφράσουμε τον παράγοντα *cncC* στο υπόβαθρο των διαγονιδιακών εντόμων *Ras85D<sup>v12</sup>* και των εντόμων που υπερεκφράζουν το *Cdc6*, εφόσον το γονίδιο *cncC* συμμετέχει στο μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης *cncC/Keap1* και είναι αρκετά συντηρημένο ως προς τη δράση του με το μονοπάτι *NRF2/KEAP1* στον άνθρωπο.

Σε αυτά τα διπλά διαγονιδιακά έντομα ανιχνεύθηκαν τα επίπεδα ROS. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η υπερέκφραση του *cncC* στα διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>* όπως και στα διαγονιδιακά έντομα OE *Cdc6* οδήγησε σε μία μείωση των επιπέδων ROS συγκριτικά με τα αντίστοιχα έντομα μάρτυρες, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.9.



**Εικόνα 3.9:** Η συνδυασμένη, καθολική υπερέκφραση των *Ras85D<sup>v12</sup>*, *cncC*, αλλά και των *Cdc6*, *cncC* τείνει να προκαλεί την μείωση των επιπέδων ROS στον οργανισμό. A<sub>1</sub>) Σχετικά (%) επίπεδα ROS ύστερα από τρεις ημέρες υπερέκφρασης των γονιδίων *Ras85D<sup>v12</sup>*, *cncC*. A<sub>2</sub>) Σχετικά (%) επίπεδα ROS ύστερα από επτά ημέρες υπερέκφρασης των *Cdc6*, *cncC*. Οι μπάρες των σφαλμάτων: ± SD.

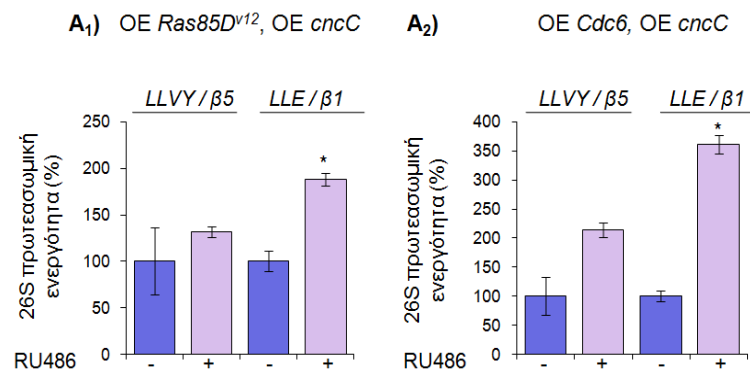
### 3.10 Τα διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>* και OE *Cdc6* παρουσιάζουν αυξημένη ενεργότητα του 26S πρωτεασώματος ύστερα από την υπερέκφραση του *cncC*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου, έχει δειχθεί ότι ο μεταγραφικός παράγοντας *cncC*, έχει ως άμεσο στόχο την έκφραση των πρωτεασωμικών γονιδίων και την αυξορρύθμιση του πρωτεασώματος<sup>67</sup>.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα για τον προσδιορισμό της λειτουργίας του 26S πρωτεασώματος ξεχωριστά σε διαγονιδιακά έντομα OE *Ras85D<sup>v12</sup>* και OE *Cdc6* που υπερεκφράζουν το *cncC*. Όπως προηγουμένως, ανιχνεύθηκε η καταλυτική ενεργότητα της υπομονάδας β5 (χυμοθρυψίνης/LLVY) και της β1 υπομονάδας (κασπάσης/LLE).

Στα διαγονιδιακά έντομα OE *Ras85D<sup>v12</sup>* που παρουσίασαν μειωμένη ενεργότητα πρωτεασώματος, παρατηρήθηκε η τάση για αύξηση της ενεργότητας χυμοθρυψίνης/LLVY της β5 υπομονάδας όπως και η στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας κασπάσης/LLE της β1 υπομονάδας ύστερα από την υπερέκφραση του *cncC* σε σύγκριση με τον πληθυσμό μάρτυρα (Εικόνα 3.10 A<sub>1</sub>).

Στα διαγονιδιακά έντομα OE *Cdc6* η υπερέκφραση του *cncC* οδήγησε σε υψηλά επίπεδα της ενεργότητας του 26S πρωτεασώματος με την τελευταία να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική αύξηση (Εικόνα 3.10 A<sub>2</sub>).



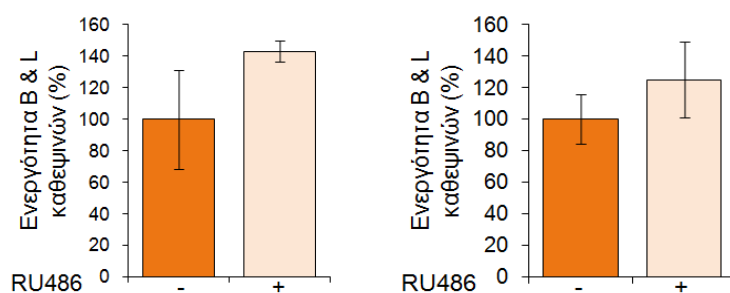
**Εικόνα 3.10: Η υπερέκφραση του *cncC* σε διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>* και σε διαγονιδιακά OE *Cdc6* οδηγεί σε αύξηση της πρωτεασωμικής ενεργότητας.** A<sub>1</sub>) (%) Επίπεδα της 26S πρωτεασωμικής ενεργότητας σε έντομα που υπερεκφράζουν το μεταλλαγμένο *Ras85D<sup>v12</sup>* σε συνδυασμό με το OE *cncC* ύστερα από τρεις ημέρες επαγωγής. A<sub>2</sub>) (%) Επίπεδα της 26S πρωτεασωμικής ενεργότητας σε έντομα που υπερεκφράζουν τα *Cdc6* και *cncC* ύστερα από επτά ημέρες επαγωγής. Οι μπάρες των σφαλμάτων: ± SD, \*, P<0.05, \*\*, P<0.01.

### 3.11 Η υπερέκφραση του *cncC* στα έντομα *Ras85D<sup>v12</sup>* και *Cdc6* τείνει να οδηγεί σε αύξηση της λυσοσωμικής τους ενεργότητας

Στη συνέχεια εξετάστηκε το μονοπάτι ALP μέσω των επιπέδων της ενεργότητας των B και L καθεψινών στα διπλά διαγονιδιακά έντομα OE *Ras85D<sup>v12</sup>*, *cncC* και OE *Cdc6*, *cncC*.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως και σε αυτή την περίπτωση η υπερέκφραση του *cncC* επέφερε μία τάση προς αύξηση της ενεργότητας των δύο καθεψινών (Εικόνα 3.11).

**A<sub>1</sub>)** OE *Ras85D<sup>v12</sup>*, OE *cncC*      **A<sub>2</sub>)** OE *Cdc6*, OE *cncC*

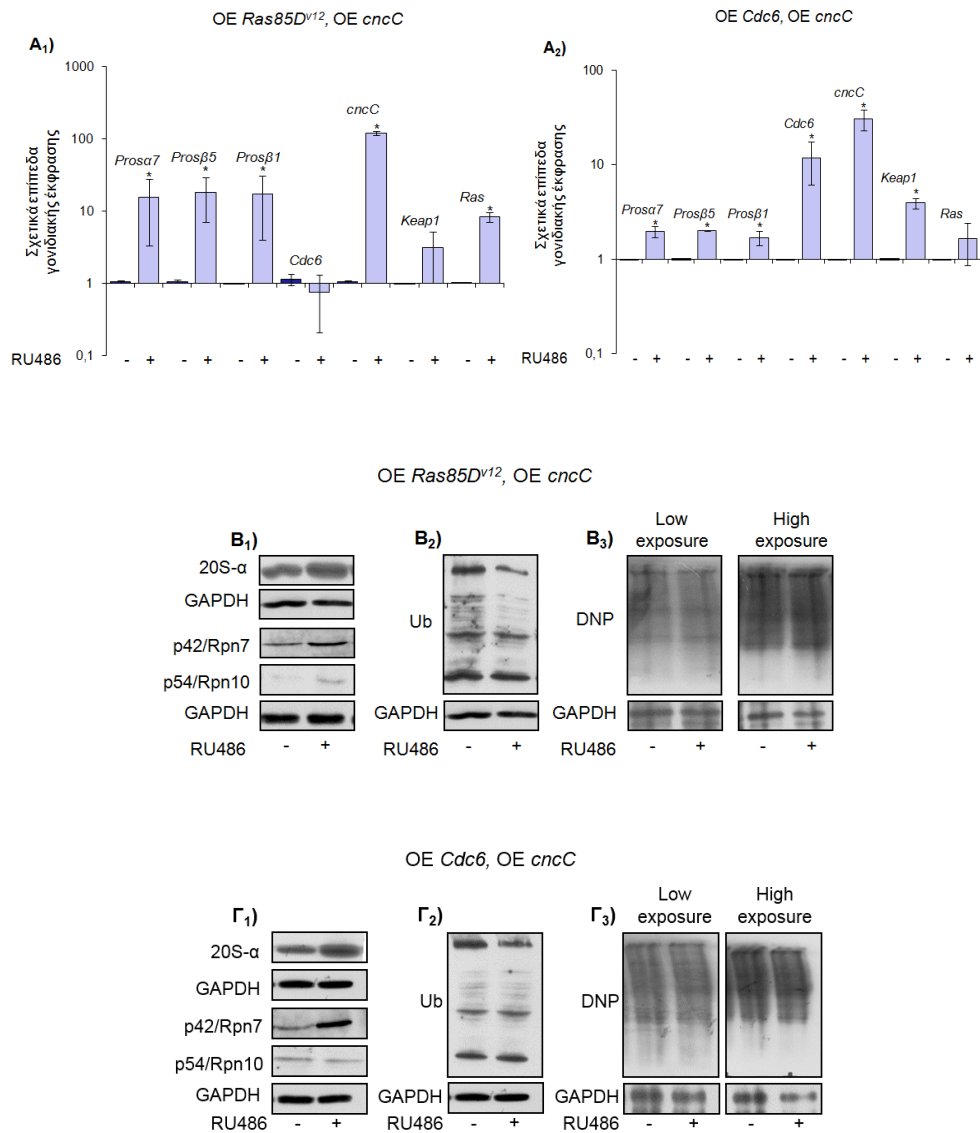


**Εικόνα 3.11:** Η υπερέκφραση του *cncC* σε διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>* και σε διαγονιδιακά OE *Cdc6* οδηγεί σε αύξηση της ενεργότητας των καθεψινών B και L. A<sub>1</sub>) (%) Επίπεδα της ενεργότητας των B και L καθεψινών σε έντομα που υπερεκφράζουν το μεταλλαγμένο *Ras* και το *cncC* ύστερα από τρεις ημέρες επαγωγής. A<sub>2</sub>) (%) Επίπεδα της ενεργότητας των B και L καθεψινών σε έντομα που υπερεκφράζουν τα γονίδια *Cdc6* και *cncC* ύστερα από επτά ημέρες επαγωγής.

### 3.12 Το *cncC* ρυθμίζει την έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων και αυξάνει τη συγκέντρωση των οξειδωμένων πρωτεϊνών στα διαγονιδιακά *Ras85D<sup>v12</sup>* και στα διαγονιδιακά *Cdc6* έντομα

Εν συνεχεία, προσδιορίστηκαν μέσω της τεχνικής q RT-PCR τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεασωμικών *Prosa7*, *Prosb5*, *Prosb1*, των *cncC*, *Keap1* και των *Ras*, *Cdc6*. Όπως απεικονίζεται και στα πιο κάτω γραφήματα, η υπερέκφραση του *cncC* και στις δύο περιπτώσεις των διπλών διαγονιδιακών εντόμων αύξησε σημαντικά την γονιδιακή έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων (Εικόνα 3.12 A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>). Παρόλα αυτά, η ενεργοποίηση του *cncC* στο υπόβαθρο των διαγονιδιακών *Ras85D<sup>v12</sup>* και *Cdc6* δεν επηρέασε την έκφραση των *Cdc6* και *Ras*. Επιπλέον, η αυξημένη έκφραση των υπομονάδων επιβεβαιώνεται και σε πρωτεϊνικό επίπεδο (Εικόνα 3.12 B<sub>1</sub>, Γ<sub>1</sub>).

Στα πλαίσια της αυξημένης έκφρασης του *cncC*, τα επίπεδα του ουβικιτινιωμένου πρωτεώματος παραμένουν χαμηλά στα διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>* ενώ στα διαγονιδιακά OE *Cdc6* δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σε σχέση με τα έντομα μάρτυρες, υποδεικνύοντας μία τάση προς αύξηση των ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών (Εικόνα 3.12 B<sub>2</sub>, Γ<sub>2</sub>). Τέλος, το οξειδωτικό φορτίο παραμένει υψηλό και στις δύο περιπτώσεις, όπως προκύπτει από την αντίχνευση του DNP (Εικόνα 3.12 B<sub>3</sub>, Γ<sub>3</sub>).



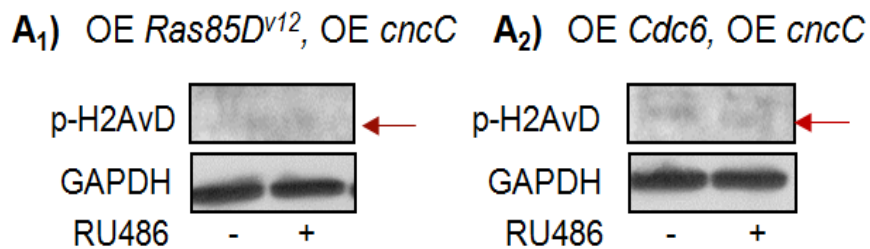
**Εικόνα 3.12:** Ανάλυση της γονιδιακής και πρωτεϊνικής έκφρασης των μορίων του μονοπατιού UPP σε διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>* και OE *Cdc6* έντομα. A<sub>1</sub>) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ύστερα από τρεις μέρες επαγωγής της συνδυαστικής υπερέκφρασης του μεταλλαγμένου *Ras85D<sup>v12</sup>* και του γονιδίου *cncC*. A<sub>2</sub>) Σχετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ύστερα από επτά μέρες επαγωγής της υπερέκφρασης του *Cdc6* και *cncC*. Το γονίδιο *rp49* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Οι μπάρες των σφαλμάτων: ± SD, \*, P<0.05, \*\*, P<0.01. (B<sub>1</sub>-B<sub>3</sub>): Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western για τον προσδιορισμό των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων (B<sub>1</sub>), των ουβικιτινιωμένων πρωτεϊνών (B<sub>2</sub>) και των οξειδωμένων πρωτεϊνών (B<sub>3</sub>) σε διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>*, *cncC* έντομα. (Γ<sub>1</sub>-Γ<sub>3</sub>): Αντιπροσωπευτικά ανοσοστυπώματα κατά Western για τον προσδιορισμό των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης για τον προσδιορισμό των επιπέδων

πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων ( $\Gamma_1$ ), των ουβικτινιλιωμένων πρωτεϊνών ( $\Gamma_2$ ) και των οξειδωμένων πρωτεϊνών ( $\Gamma_3$ ) σε διαγονιδιακά OE *Cdc6*, *cncC* έντομα. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

### 3.13 Η συνδυαστική υπερέκφραση του *cncC* στα διαγονιδιακά έντομα *Ras85D<sup>v12</sup>* και *Cdc6* τείνει να μειώνει τα επίπεδα των γενωμικών βλαβών

Όπως προαναφέρθηκε η υπερέκφραση του *Ras85D<sup>v12</sup>* και *Cdc6* οδηγεί σε συσσώρευση της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H2AvD. Σε προηγούμενες μελέτες, έχει δειχθεί πως το *cncC* εμπλέκεται στο μονοπάτι απόκρισης σε βλάβες στο DNA<sup>170,171</sup>. Συνεπώς, διερευνήθηκε στη συνέχεια η επίδραση της υπερέκφρασης του *cncC* στο αν θα μπορούσε να συμβάλλει στη μείωση των γενετικών βλαβών.

Πράγματι, όπως υποδεικνύεται και στα παρακάτω ανοσοστυπώματα, τα επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης ιστόνης μειορρυθμίζονται στα διπλά διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>*, OE *cncC* και OE *Cdc6*, *cncC* (Εικόνα 3.13). Ωστόσο, η υπερέκφραση των OE *Ras85D<sup>v12</sup>*, OE *cncC* επέφερε χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της φωσφορυλιωμένης ιστόνης, άρα και συσσώρευσης βλαβών, σε σχέση με τα διαγονιδιακά έντομα OE *Cdc6*, OE *cncC*.



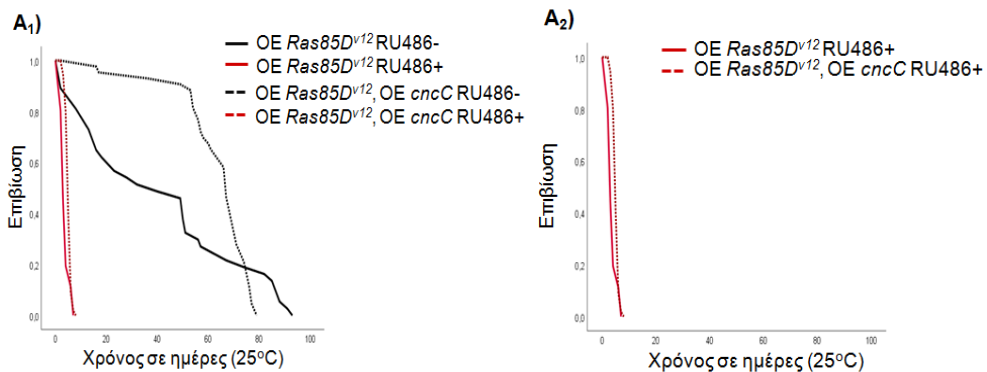
**Εικόνα 3.13:** Ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H2AvD σε διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>*, *cncC* και OE *Cdc6*, OE *cncC* έντομα A<sub>1</sub>) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα κατά Western τον προσδιορισμό των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης της ιστόνης H2AvD σε διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>*, *cncC* έντομα. A<sub>2</sub>) Αντιπροσωπευτικό ανοσοστύπωμα κατά Western τον προσδιορισμό των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης της ιστόνης H2AvD σε διαγονιδιακά OE *Cdc6*, *cncC*

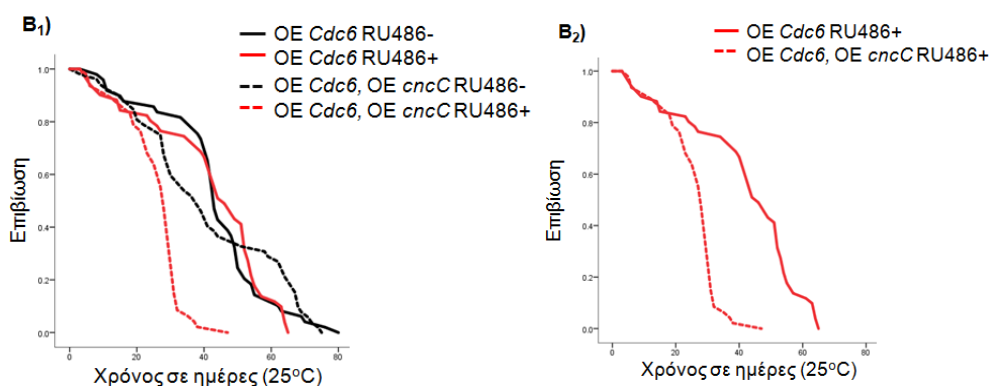
έντομα. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος.

### 3.14 Η ενεργοποίηση του *cncC* βελτιώνει την ποιότητα ζωής στα διαγονιδιακά έντομα *Ras85D<sup>v12</sup>* αλλά αυξάνει την θνησιμότητα στα διαγονιδιακά *Cdc6*

Εν συνεχεία μελετήθηκε το προσδόκιμο ζωής στα έντομα υπερέκφρασης των *Ras85D<sup>v12</sup>* και *cncC* σε σύγκριση τόσο με τα έντομα μάρτυρες, όσο και με τα έντομα στα οποία επάγεται υπερέκφραση μόνο του *Ras85D<sup>v12</sup>*. Τα αποτελέσματα από τις καμπύλες μακροβιότητας έδειξαν ότι το προσδόκιμο ζωής των διπλών διαγονιδιακών εντόμων μειώνεται απότομα συγκριτικά με τα έντομα μάρτυρες (Εικόνα 3.14 A<sub>1</sub>). Διαφορά παρατηρείται μόνο κατά τα αρχικά στάδια, όπου η ποιότητα ζωής των εντόμων που υπερεκφράζουν τα *Ras85D<sup>v12</sup>*, *cncC* βελτιώνεται συγκριτικά με τα διαγονιδιακά έντομα OE *Ras85D<sup>v12</sup>* (Εικόνα 3.14 A<sub>2</sub>).

Ομοίως, στα έντομα που υπερεκφράζουν τα *Cdc6*, *cncC* εμφανίζεται στατιστικά σημαντικό μειωμένο προσδόκιμο ζωής τόσο ως προς τα έντομα μάρτυρες (Εικόνα 3.14 B<sub>1</sub>) όσο και ως προς αυτά που επάγεται μόνο η υπερέκφραση του *Cdc6* (Εικόνα 3.14 B<sub>2</sub>). Αξίζει να σημειωθεί, ότι από μελέτες στο δικό μας εργαστήριο έχει προκύψει πως τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του *cncC* είναι τοξικά και μειώνουν το προσδόκιμο ζωής στο έντομο *Drosophila melanogaster*.





**Εικόνα 3.14: Μελέτη του προσδόκιμου ζωής σε διαγονιδιακά OE *Ras85D*<sup>v12</sup>, OE *cncC* αλλά και σε διαγονιδιακά OE *Cdc6*, OE *cncC* έντομα. Α<sub>1</sub>) Καταγραφή εντόμων που υπερεκφράζουν το μεταλλαγμένο *Ras85D*<sup>v12</sup> μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με το γονίδιο *cncC*. Β<sub>1</sub>) Καταγραφή εντόμων που υπερεκφράζουν το γονίδιο *Cdc6* είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με το γονίδιο *cncC*.**

### 3.15 Η ιστοειδική έκφραση των γονιδίων *Ras85D*<sup>v12</sup> και *Cdc6* στον οφθαλμό του εντόμου *Drosophila melanogaster* προκαλεί αλλοιώσεις στην αρχιτεκτονική της δομής του

Μελέτες έχουν δείξει πως οι μεταλλαγές στο γονίδιο *Ras85D* του εντόμου *Drosophila melanogaster* προκαλούν τη δημιουργία υπερπλασιών και ανωμαλιών σε ιστούς και όργανα όπως στον οπτικό δίσκο του εντόμου<sup>150</sup>.

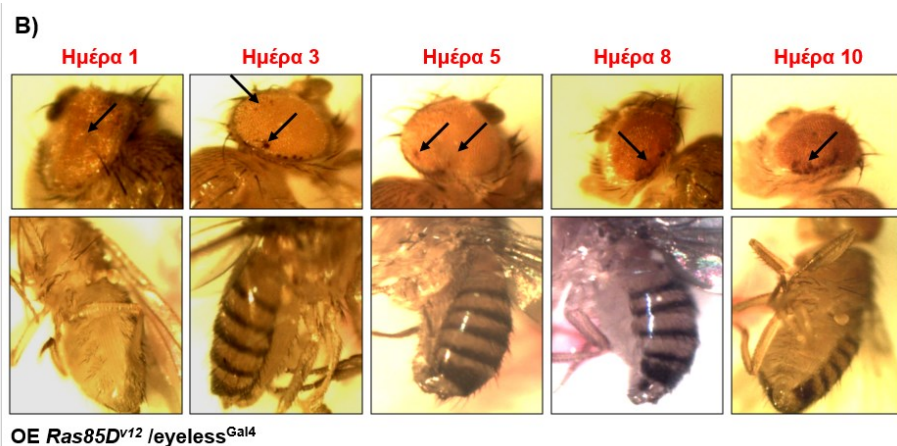
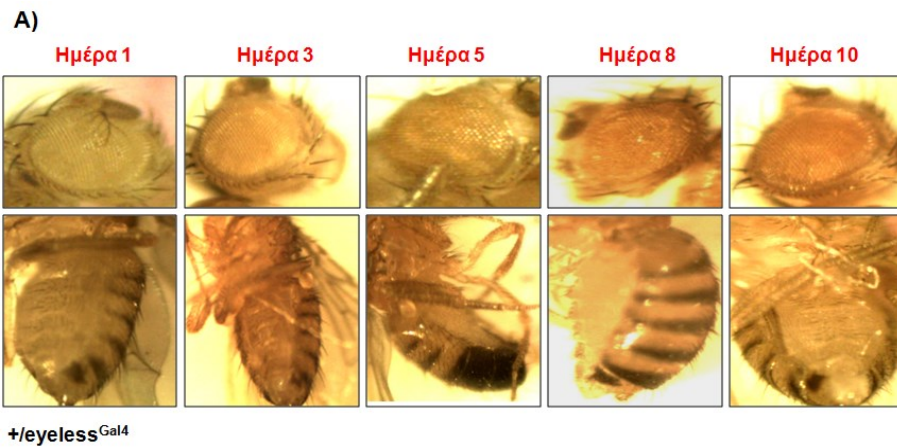
Για τη διερεύνηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των δύο γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα UAS-GAL4 καθοδικά του ειδικού υποκινητή *eyeless*<sup>Gal4</sup> που περιορίζει την έκφραση στον σύνθετο οφθαλμό της *Drosophila melanogaster*.

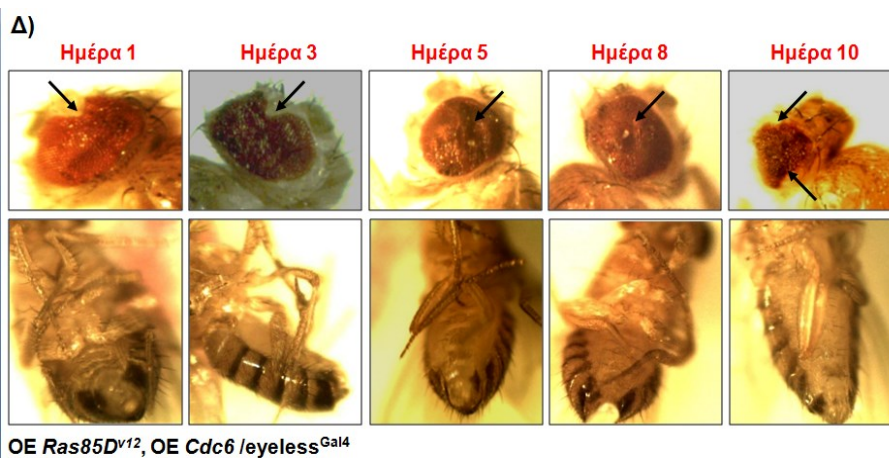
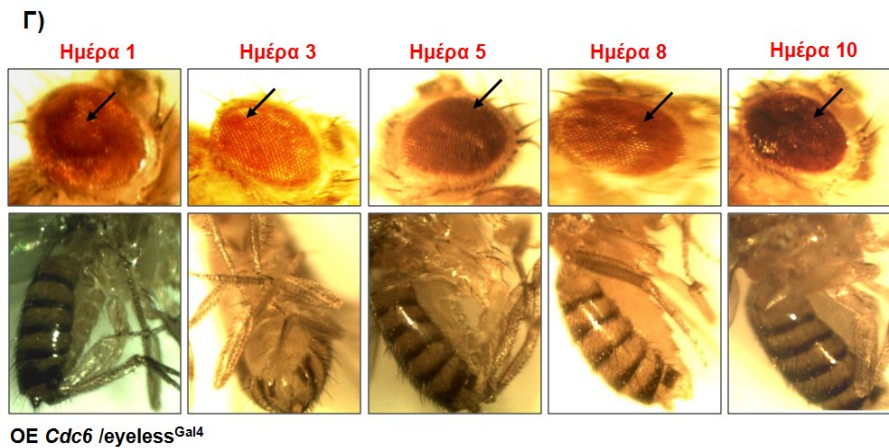
Στα έντομα που υπερεκφράζουν το *Ras85D*<sup>v12</sup>, παρατηρήθηκε αυξημένος πολλαπλασιασμός των κυττάρων των ομματιδίων (Εικόνα 3.15 Β). Επιπλέον, εντοπίστηκαν μαύρες περιοχές στην επιφάνεια του οφθαλμού, που είναι ενδεικτικές της νέκρωσης<sup>172</sup>. Αντίθετα, η υπερέκφραση του *Cdc6* είχε πιο ήπια επίδραση στον φαινότυπο του οφθαλμού (Εικόνα 3.15 Γ). Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν μια πιο ήπια πολλαπλασιαστική ικανότητα του γονιδίου *Cdc6*, ενώ επίσης δεν παρατηρήθηκε νέκρωση. Παρόλο που η έκφραση ήταν στοχευμένη στον οφθαλμό των εντόμων, τα διαγονιδιακά OE *Ras85D*<sup>v12</sup> παρουσίασαν έναν δυσμενή συστημικό φαινότυπο, όπως απεικονίζεται από τις αλλαγές του υπόλοιπου σώματος των εντόμων στο διάστημα μεταξύ τρίτης με δέκατης ημέρας (Εικόνα 3.15 Β). Στα διαγονιδιακά



έντομα OE *Cdc6*, η ιστοειδική έκφραση δεν επέφερε ιδιαίτερες μεταβολές στο υπόλοιπο σώμα (Εικόνα 3.15 Γ) σε σχέση με τα έντομα μάρτυρες.

Σύμφωνα με μελέτες, η συνεργατική δράση του *Cdc6* και διαφόρων ογκογονιδίων συμπεριλαμβανομένου του *Ras* συμβάλλει στην εκδήλωση κακοηθειών<sup>164,165</sup>. Για να επιβεβαιωθεί αυτό, δημιουργήσαμε τα διπλά διαγονιδιακά που υπερεκφράζουν τα *Ras85D<sup>v12</sup>* και *Cdc6*. Η ιστοειδική έκφραση των διαγονιδίων αυτών προκάλεσε τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό αλλά και την αλλοίωση της δομής του ματιού (Εικόνα 3.15 Δ). Αυτές οι επιδράσεις φάνηκαν να έχουν αρνητικό αντίκτυπο σε συστημικό επίπεδο και κατ'επέκταση στη μακροβιότητα των εντόμων σε σχέση με τα έντομα μάρτυρες αλλά και τα διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>*.





**Εικόνα 3.15: Φαινοτυπικές αλλοιώσεις στον σύνθετο οφθαλμό του εντόμου *Drosophila melanogaster* ύστερα από την στοχευμένη υπερέκφραση των γονιδίων *Ras85D*<sup>v12</sup> και *Cdc6*. Α). Απεικόνιση του σύνθετου οφθαλμού σε έντομα μάρτυρες +/eyeless<sup>Gal4</sup>. Β) Απεικόνιση του σύνθετου οφθαλμού και του σώματος σε στελέχη που υπερεκφράζουν το γονίδιο *Ras85D*<sup>v12</sup> μετά από μία, τρεις, πέντε, οκτώ και δέκα ημέρες επαγωγής του. Γ) Απεικόνιση του σύνθετου οφθαλμού σε διαγονιδιακά έντομα μετά από μία, τρεις, πέντε, οκτώ και δέκα μέρες επαγωγής της υπερέκφρασης του γονιδίου *Cdc6*. Δ) Απεικόνιση του σύνθετου οφθαλμού σε διαγονιδιακά έντομα μετά από μία, τρεις, πέντε, οκτώ και δέκα μέρες συνδυαστικής υπερέκφρασης των γονιδίων OE *Ras85D*<sup>v12</sup> και OE *Cdc6*.**

## Συζήτηση

Η γήρανση αποτελεί μια φυσιολογική, αναπόφευκτη διαδικασία και χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση βλαβών και την επακόλουθη έκπτωση της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων και κατ'επέκταση του οργανισμού<sup>2</sup>. Αποτελεί τον βασικό παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη πολλών ηλικιο-εξαρτώμενων παθήσεων, όπως είναι ο καρκίνος. Η γήρανση και ο καρκίνος μπορεί να φαίνεται πως αποτελούν δύο αντίθετες διαδικασίες, εντούτοις εμφανίζουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά, μεταξύ των οποίων είναι η πρωτεωμική και η γενωμική αστάθεια<sup>3</sup>. Η διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας του πρωτεώματος ενός κυττάρου ελέγχεται από το δίκτυο πρωτεόστασης (UPP και ALP πρωτεολυτικά μονοπάτια), του οποίου η λειτουργία φθίνει κατά τη γήρανση<sup>25,28</sup>. Το δίκτυο πρωτεόστασης αποτελείται από ένα σύνολο παραγόντων που διευθύνει αυστηρά τη σύνθεση, την αναδίπλωση, τη μετακίνηση και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα<sup>25</sup>.

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώθηκε στην *in vivo* μελέτη των γονιδίων *Ras* και *Cdc6* κατά την γήρναση στο έντομο *Drosophila melanogaster*. Τα συγκεκριμένα γονίδια εμπλέκονται στον καρκίνο, ένα νόσημα που σχετίζεται άμεσα με τη γήρανση του οργανισμού.

Τα έντομα που υπερεκφράζουν το *Ras85D<sup>v12</sup>* ή το *Cdc6* οδήγησαν σε αύξηση του οξειδωτικού φορτίου, ενώ τα OE *Ras85D<sup>v12</sup>* έντομα παρουσίασαν επιπλέον μειωμένο αριθμό μιτοχονδρίων. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι τα δύο αυτά γονίδια συμβάλλουν στην πρόκληση οξειδωτικού στρες, το οποίο επιβαρύνει τα οργανικά συστήματα του εντόμου.

Στη συνέχεια, η μελέτη του μονοπατιού UPP στα διαγονιδιακά έντομα έδειξε ότι το συγκεκριμένο πρωτεολυτικό μονοπάτι μειορρυθμίζεται κατά την υπερέκφραση του *Ras85D<sup>v12</sup>* ενώ αυξορρυθμίζεται έπειτα από υπερέκφραση του γονιδίου *Cdc6*. Το εξής εύρημα υποδηλώνει μια διαφορετική ρύθμιση του μονοπατιού UPP από τα υπο μελέτη γονίδια.

Πράγματι, πολλοί τύποι καρκίνου έχουν βρεθεί να εξαρτώνται από υψηλά δομικά επίπεδα των 26S πρωτεασωμάτων, όπως επίσης και ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα της πρωτεασωμικής ενεργότητας, που πιθανόν προσφέρουν προστασία έναντι των αποπτωτικών μονοπατιών, απαλλαγή από τα βλαβερά πρωτεϊνικά μόρια και τελικά σε αύξηση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων<sup>173</sup>. Η υπερέκφραση του *Cdc6* φάνηκε να επιβεβαιώνει τα παραπάνω ευρήματα αφού παρουσιάστηκε αύξηση της ενεργότητας του 26S πρωτεασώματος. Παρομοίως, τα πειράματα που στόχευαν στην διερεύνηση του ALP μονοπατιού έδειξαν μειορρύθμιση των καθεψινών B και L στα διαγονιδιακά OE *Ras85D<sup>v12</sup>* έντομα, ενώ αύξηση της ενεργότητάς τους στα έντομα που υπερεκφράζουν το

*Cdc6*. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των OE *Ras85D<sup>v12</sup>* και OE *Cdc6* επηρεάζουν την λειτουργία των δύο βασικών πρωτεολυτικών μηχανισμών.

Επιπροσθέτως, η υπερέκφραση τόσο του *Ras85D<sup>v12</sup>* όσο και του *Cdc6*, φάνηκε να συμβάλλει στην πρόκληση βλαβών στο γενετικό υλικό, αφού οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της φωσφορυλιωμένης ιστόνης H2AvD, η οποία αποτελεί έναν δείκτη της συσσώρευσης γενωμικών βλαβών<sup>174</sup>. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σύμφωνο και με προηγούμενες μελέτες σε ένα κυτταρικό μοντέλο, που αναφέρουν ότι τα ενεργοποιημένα ογκογονίδια διακόπτουν τη φυσιολογική πορεία του αναδιπλασιασμού του DNA, προκαλώντας αντιγραφικό στρες και τελικά γενωμική αστάθεια<sup>175</sup>.

Οι μελέτες μακροβιότητας ανέδειξαν την ιδιαίτερα τοξική δράση του μεταλλαγμένου OE *Ras85D<sup>v12</sup>* στα διαγονιδιακά έντομα, καθώς εμφάνισαν ένα φαινότυπο πρώιμης γήρανσης, όπως και απότομη μείωση του προσδόκιμου ζωής. Πιθανόν η πρώιμη γήρανση που προκαλείται, συμβάλλει στην εξάντληση των ενεργειακών αποθεμάτων των εντόμων, με αποτέλεσμα να καταστέλλονται όλες οι ενεργοβόρες διεργασίες σε επίπεδο κυττάρου, όπως η παρατηρούμενη προοδευτική καταστολή των πρωτεολυτικών μονοπατιών UPP και ALP. Πέρα από τις δυσμενείς συνέπειες της καθολικής υπερέκφρασης του *Ras85D<sup>v12</sup>*, η ιστοειδική έκφραση του ογκογονιδίου στον σύνθετο οφθαλμό της *Drosophila melanogaster* ανέδειξε την πολλαπλασιαστική ικανότητά του. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν πως η στοχευμένη ενεργοποίηση του *Ras* στο σύνθετο οφθαλμό του εντόμου παρεμποδίζει την προ-αποπτωτική δράση άλλων γονιδίων, με αποτέλεσμα την αποφυγή του κυτταρικού θανάτου<sup>176</sup>. Σε αντίθεση, η υπερέκφραση του *Cdc6* επέφερε ήπιες αλλοιώσεις. Η συνδυαστική δράση της υπερέκφρασης των δύο γονιδίων *Ras85D<sup>v12</sup>* και *Cdc6* φάνηκε να επιβαρύνει στο μέγιστο βαθμό τόσο την αρχιτεκτονική δομή του σύνθετου οφθαλμού όσο και ολόκληρο τον οργανισμό.

Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων σε διπλά διαγονιδιακά έντομα OE *Ras85D<sup>v12</sup>*, OE *cncC* και OE *Cdc6*, OE *cncC*. Η συγκεκριμένη μελέτη αποφασίστηκε να γίνει λόγω του ρόλου του μονοπατιού *cncC/Kear1* στην ενεργοποίηση διαφόρων γονιδίων της αντιοξειδωτικής απόκρισης. Πράγματι, τα αποτελέσματα προσδιορισμού των επιπέδων ROS σε διπλά διαγονιδιακά έντομα OE *Ras85D<sup>v12</sup>*, OE *cncC* και OE *Cdc6*, OE *cncC* έδειξαν τάση για μείωσή συγκριτικά με την μεμονωμένη υπερέκφραση των *Ras85D<sup>v12</sup>* και *Cdc6*. Με αυτό τον τρόπο επαληθεύεται, η αντιοξειδωτική δράση του παράγοντα *cncC* σε συνθήκες ενδοκυτταρικού στρες.

Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της ενεργότητας του πρωτεασώματος αλλά και της έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο, έδειξαν πως η υπερέκφραση του *cncC* προκαλεί την αυξορρύθμισή τους.

Άνοδος παρουσιάστηκε και στην ενεργότητα των καθεσινών B και L του μονοπατιού ALP. Μελέτες του εργαστηρίου μας έχουν αποδείξει την άμεση στόχευση και του 26S πρωτεασώματος αλλά και των γονιδίων που κωδικοποιούν τις υπομονάδες του από τον παράγοντα NRF2<sup>67</sup>.

Επιπλέον, όσον αφορά τα επίπεδα γενωμικής αστάθειας με αντιπροσωπευτικό δείκτη τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης H2AvD ιστόνης, στα διπλά διαγονιδιακά έντομα φάνηκε πως η υπερέκφραση των γονιδίων *Ras85D<sup>v12</sup>* μαζί με το γονίδιο *cncC* οδήγησε σε μειωμένη συσσώρευση γενετικών βλαβών. Επίσης έπειτα από τη μελέτη της επίδρασης της ιονίζουσας ακτινοβολίας σε κύτταρα έχει βρεθεί ότι ο παράγοντας NRF2 ενεργοποιεί το μονοπάτι της επιδιόρθωσης βλαβών του γενετικού υλικού (DNA Damage Response)<sup>170</sup>. Εν αντιθέσει, η συνδυαστική υπερέκφραση των *Cdc6* και *cncC* δεν σημείωσε ιδιαίτερη μείωση στα επίπεδα γενωμικής αστάθειας των διαγονιδιακών αυτών εντόμων. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στην ανεπάρκεια δράσης του μονοπατιού *cncC/Kear1* στην ενεργοποίηση του μονοπατιού DDR.

Τέλος, μελετώντας το προσδόκιμο ζωής των διπλών διαγονιδιακών εντόμων, στην περίπτωση των διαγονιδιακών στελεχών OE *Cdc6*, OE *cncC* παρουσιάστηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση. Από την άλλη πλευρά, η συνδυασμένη υπερέκφραση των *Ras85D<sup>v12</sup>* και *cncC* προκάλεσε απότομη μείωση στο διάστημα επιβίωσης των εντόμων κατ'αναλογία με τα διαγονιδιακά έντομα OE *Ras85D<sup>v12</sup>*. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μία ήπια βελτίωση στην ποιότητα ζωής των οργανισμών κατά τα αρχικά στάδια υπερέκφρασης των δύο γονιδίων συγκριτικά με τα έντομα που υπερεκφράζουν αποκλειστικά το *Ras85D<sup>v12</sup>*. Αξίζει να σημειωθεί πως μελέτες αναφέρουν ότι πολύ υψηλά επίπεδα του αντιοξειδωτικού παράγοντα NRF2/*cncC* μπορεί να καταστούν τοξικά για την επιβίωση του οργανισμού<sup>172</sup>.

Εν κατακλείδι, αναφορικά με την μελέτη της υπερέκφρασης των γονιδίων OE *Ras85D<sup>v12</sup>* και OE *Cdc6* φαίνεται πως δρουν ευεργετικά στην εκδήλωση πολλών από τα ορόσημα που χαρακτηρίζουν τόσο τη γήρανση όσο και την ανάπτυξη κακοηθειών. Με βάση την παρούσα εργασία, διαπιστώθηκε πως η γενωμική αστάθεια, η διαταραχή της πρωτεόστασης, η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός αποτελούν μερικά από αυτά τα ορόσημα. Επίσης, η λειτουργία του μονοπατιού *cncC/Kear1*, ενδεχομένως, πρέπει να προσαρμόζεται στις εκάστοτε ανάγκες του κυττάρου ως προς την απαλλαγή και εξάλειψη των παραγόμενων οξειδωτικών παραγόντων που επιβαρύνουν την ποιότητα αλλά και τη διάρκεια ζωής. Περαιτέρω μελέτες για τη διερεύνηση επιπρόσθετων πιθανών μηχανισμών που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της γήρανσης αλλά και του καρκίνου μπορούν να ενισχύσουν την άποψη για την πολυπαραγοντική φύση και των δύο.



#### 4. Βιβλιογραφία

1. Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature*. 2010;464(7288):504-512. doi:10.1038/nature08980
2. Halliwell B, Gutteridge JMC, Halliwell B, Gutteridge JMC. Ageing, nutrition, disease, and therapy: a role for antioxidants? In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. ; 2015. doi:10.1093/acprof:oso/9780198717478.003.0011
3. López-otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M. The Hallmarks of Aging (copy without figures, can't seem to remove). 2013;153(6):1194-1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039.The
4. Partridge L, Deelen J, Slagboom PE. Facing up to the global challenges of ageing. *Nature*. 2018;561(7721):45-56. doi:10.1038/s41586-018-0457-8
5. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M. ScienceDirect.com - Cell - The Hallmarks of Aging. *Cell*. 2013.
6. Gumeni S, Evangelakou Z, Gorgoulis VG, Trougakos IP. Proteome stability as a key factor of genome integrity. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10). doi:10.3390/ijms18102036
7. Faggioli F, Wang T, Vijg J, Montagna C. Chromosome-specific accumulation of aneuploidy in the aging mouse brain. *Hum Mol Genet*. 2012. doi:10.1093/hmg/dds375
8. Worman HJ. Nuclear lamins and laminopathies. *J Pathol*. 2012. doi:10.1002/path.2999
9. Moskalev AA, Shaposhnikov M V., Plyusnina EN, et al. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev*. 2013. doi:10.1016/j.arr.2012.02.001
10. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012;481(7381):287-294. doi:10.1038/nature10760
11. Gregg SQ, Gutiérrez V, Rasile Robinson A, et al. A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair. *Hepatology*. 2012. doi:10.1002/hep.24713
12. Murga M, Bunting S, Montãa MF, et al. A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat Genet*. 2009. doi:10.1038/ng.420
13. Hoeijmakers JHJ. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 2009. doi:10.1056/NEJMra0804615

14. Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: The path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med*. 2006. doi:10.1038/nm1006-1133
15. Park CB, Larsson NG. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol*. 2011. doi:10.1083/jcb.201010024
16. Linnane AW, Ozawa T, Marzuki S, Tanaka M. MITOCHONDRIAL DNA MUTATIONS AS AN IMPORTANT CONTRIBUTOR TO AGEING AND DEGENERATIVE DISEASES. *Lancet*. 1989. doi:10.1016/S0140-6736(89)92145-4
17. Sun N, Youle RJ, Finkel T. The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol Cell*. 2016;61(5):654-666. doi:10.1016/j.molcel.2016.01.028
18. Ameer A, Stewart JB, Freyer C, et al. Ultra-deep sequencing of mouse mitochondrial DNA: Mutational patterns and their origins. *PLoS Genet*. 2011. doi:10.1371/journal.pgen.1002028
19. Aunan JR, Watson MM, Hagland HR, Søreide K. Molecular and biological hallmarks of ageing. *Br J Surg*. 2016. doi:10.1002/bjs.10053
20. Pusceddu I, Farrell CJL, Di Pierro AM, Jani E, Herrmann W, Herrmann M. The role of telomeres and Vitamin D in cellular aging and age-related diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2015. doi:10.1515/cclm-2014-1184
21. Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol*. 2007. doi:10.1038/nchembio.2007.38
22. Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, et al. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol*. 2012. doi:10.1038/ncb2466
23. Hewitt G, Jurk D, Marques FDM, et al. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun*. 2012. doi:10.1038/ncomms1708
24. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961. doi:10.1016/0014-4827(61)90192-6
25. Wolff S, Weissman JS, Dillin A. Differential scales of protein quality control. *Cell*. 2014. doi:10.1016/j.cell.2014.03.007
26. Kaushik S, Cuervo AM. Proteostasis and aging. *Nat Med*. 2015;21(12):1406-1415. doi:10.1038/nm.4001
27. Trougakos IP, Sesti F, Tsakiri E, Gorgoulis VG. Non-enzymatic post-translational



- protein modifications and proteostasis network deregulation in carcinogenesis. *J Proteomics*. 2013. doi:10.1016/j.jprot.2013.02.024
28. Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev*. 2011. doi:10.1016/j.arr.2010.02.001
  29. Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW, Balch WE. Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annu Rev Biochem*. 2009;78(1):959-991. doi:10.1146/annurev.biochem.052308.114844
  30. Labbadia J, Morimoto RI. The Biology of Proteostasis in Aging and Disease. *Annu Rev Biochem*. 2015;84(1):435-464. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-033955
  31. Tavernarakis N. Protein synthesis and aging: eIF4E and the soma vs. germline distinction. *Cell Cycle*. 2007. doi:10.4161/cc.6.10.4230
  32. Sabouny R, Fraunberger E, Geoffrion M, et al. The Keap1–Nrf2 Stress Response Pathway Promotes Mitochondrial Hyperfusion Through Degradation of the Mitochondrial Fission Protein Drp1. *Antioxid Redox Signal*. 2017;ars.2016.6855. doi:10.1089/ars.2016.6855
  33. Shalgi R, Hurt JA, Krykbaeva I, Taipale M, Lindquist S, Burge CB. Widespread Regulation of Translation by Elongation Pausing in Heat Shock. *Mol Cell*. 2013. doi:10.1016/j.molcel.2012.11.028
  34. Lee JW, Beebe K, Nangle LA, et al. Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature*. 2006. doi:10.1038/nature05096
  35. Kraft C, Deplazes A, Sohrmann M, Peter M. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Chemtracts*. 2008.
  36. Riera CE, Merkwirth C, De Magalhaes Filho CD, Dillin A. Signaling Networks Determining Life Span. *Annu Rev Biochem*. 2016. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014451
  37. Baird TD, Wek RC. Eukaryotic Initiation Factor 2 Phosphorylation and Translational Control in Metabolism. *Adv Nutr*. 2012. doi:10.3945/an.112.002113
  38. Matambo TS, Odunuga OO, Boshoff A, Blatch GL. Overproduction, purification, and characterization of the Plasmodium falciparum heat shock protein 70. *Protein Expr Purif*. 2004. doi:10.1016/j.pep.2003.09.010
  39. Taylor RC, Dillin A. XXBP-1 Is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity. *Cell*. 2013. doi:10.1016/j.cell.2013.05.042

40. Nishikawa SI, Brodsky JL, Nakatsukasa K. Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J Biochem.* 2005. doi:10.1093/jb/mvi068
41. Nanua S, Murakami M, Xia J, et al. Activation of the unfolded protein response is associated with impaired granulopoiesis in transgenic mice expressing mutant Elane. *Blood.* 2011. doi:10.1182/blood-2010-10-311704
42. Brodsky JL. Cleaning Up: ER-associated degradation to the rescue. *Cell.* 2012. doi:10.1016/j.cell.2012.11.012
43. Lippincott-schwartz J, Roberts TH, Hirschberg K. Secretory Protein Trafficking and Organelle Dynamics in Living Cells. *Cell.* 2000.
44. Sala AJ, Bott LC, Morimoto RI. Shaping proteostasis at the cellular, tissue, and organismal level. *J Cell Biol.* 2017. doi:10.1083/jcb.201612111
45. Hill SM, Hanzén S, Nyström T. Restricted access: spatial sequestration of damaged proteins during stress and aging. *EMBO Rep.* 2017. doi:10.15252/embr.201643458
46. Wang XJ, Yu J, Wong SH, et al. A novel crosstalk between two major protein degradation systems: regulation of proteasomal activity by autophagy. *Autophagy.* 2013. doi:10.4161/auto.25573
47. Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, et al. Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am J Pathol.* 2012. doi:10.1016/j.ajpath.2011.11.012
48. Cuervo AM, McLain F. Autophagy, nutrition and immunology. In: *Molecular Aspects of Medicine.* ; 2012. doi:10.1016/j.mam.2011.09.001
49. Chondrogianni N, Gonos ES. Structure and function of the ubiquitin-proteasome system: Modulation of components. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* ; 2012. doi:10.1016/B978-0-12-397863-9.00002-X
50. Lehmann G, Udasin RG, Ciechanover A. On the linkage between the ubiquitin-proteasome system and the mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;473(1):80-86. doi:10.1016/j.bbrc.2016.03.055
51. von Mikecz A. The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J Cell Sci.* 2006. doi:10.1242/jcs.03008
52. Hershko A, Ciechanover A. THE UBIQUITIN SYSTEM. *Annu Rev Biochem.* 1998. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425
53. Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM. HECT and RING finger families of E3

- ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci.* 2012. doi:10.1242/jcs.091777
54. Murata S, Chiba T, Tanaka K. CHIP: A quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003. doi:10.1016/S1357-2725(02)00394-1
  55. Skaar JR, Pagano M. Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Curr Opin Cell Biol.* 2009. doi:10.1016/j.ceb.2009.08.004
  56. Ikeda F, Crosetto N, Dikic I. What determines the specificity and outcomes of Ubiquitin signaling? *Cell.* 2010. doi:10.1016/j.cell.2010.10.026
  57. Xu P, Duong DM, Seyfried NT, et al. Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation. *Cell.* 2009. doi:10.1016/j.cell.2009.01.041
  58. Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol.* 2003. doi:10.1038/ncb983
  59. Moore SC, Jason L, Ausió J. The elusive structural role of ubiquitinated histones. In: *Biochemistry and Cell Biology.* ; 2002. doi:10.1139/o02-081
  60. Johnson ES, Ma PCM, Ota IM, Varshavsky A. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem.* 1995. doi:10.1074/jbc.270.29.17442
  61. Baboshina O V., Haas AL. Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. *J Biol Chem.* 1996. doi:10.1074/jbc.271.5.2823
  62. Kirisako T, Kamei K, Murata S, et al. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J.* 2006. doi:10.1038/sj.emboj.7601360
  63. Nijman SMB, Luna-Vargas MPA, Velds A, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell.* 2005. doi:10.1016/j.cell.2005.11.007
  64. Shabek N, Iwai K, Ciechanover A. Ubiquitin is degraded by the ubiquitin system as a monomer and as part of its conjugated target. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.185
  65. Liu CW, Jacobson AD. Functions of the 19S complex in proteasomal degradation. *Trends Biochem Sci.* 2013. doi:10.1016/j.tibs.2012.11.009
  66. Pickart CM. Ubiquitin biology: An old dog learns an old trick. *Nat Cell Biol.* 2000. doi:10.1038/35019610

67. Tsakiri EN, Sykiotis GP, Papassideri IS, Gorgoulis VG, Bohmann D, Trougakos IP. Differential regulation of proteasome functionality in reproductive vs. somatic tissues of *Drosophila* during aging or oxidative stress. *FASEB J*. 2013;27(6):2407-2420. doi:10.1096/fj.12-221408
68. Maupin-Furlow JA. Ubiquitin-like proteins and their roles in archaea. *Trends Microbiol*. 2013. doi:10.1016/j.tim.2012.09.006
69. Kunjappu MJ, Hochstrasser M. Assembly of the 20S proteasome. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.008
70. Schwartz DC, Hochstrasser M. A superfamily of protein tags: Ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci*. 2003. doi:10.1016/S0968-0004(03)00113-0
71. Walz J, Erdmann A, Kania M, Typke D, Koster AJ, Baumeister W. 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy. *J Struct Biol*. 1998. doi:10.1006/jsbi.1998.3958
72. Tanaka K. The proteasome: From basic mechanisms to emerging roles. *Keio J Med*. 2013. doi:10.2302/kjm.2012-0006-RE
73. Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature*. 2012;482(7384):186-191. doi:10.1038/nature10774
74. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. 2002. doi:10.1152/physrev.00027.2001
75. Shringarpure R, Grune T, Mehlhase J, Davies KJA. Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J Biol Chem*. 2003. doi:10.1074/jbc.M206279200
76. Morimoto RI, Cuervo AM. Proteostasis and the aging proteome in health and disease. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci*. 2014;69(SUPPL. 1):33-38. doi:10.1093/gerona/glu049
77. Morrow G, Samson M, Michaud S, Tanguay RM. Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *FASEB J*. 2004;18(3):598-599. doi:10.1096/fj.03-0860fje
78. Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems.
79. Chondrogianni N, Gonos ES. Proteasome inhibition induces a senescence-like phenotype in primary human fibroblasts cultures. *Biogerontology*. 2004.

- doi:10.1023/B:BGEN.0000017687.55667.42
80. Ferrington DA, Husom AD, Thompson L V. Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *FASEB J.* 2005. doi:10.1096/fj.04-2578fje
  81. Carrard G, Bulteau AL, Petropoulos I, Friguet B. Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002. doi:10.1016/S1357-2725(02)00085-7
  82. Vernace VA, Arnaud L, Schmidt-Glenewinkel T, Figueiredo-Pereira ME. Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J.* 2007. doi:10.1096/fj.06-6751com
  83. Sitte N, Merker K, Zglinick T, Davies KJA, Grune T. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part II—aging of nondividing cells. *FASEB J.* 2000. doi:10.1096/fj.00-0210com
  84. Jahngen JH, Lipman RD, Eisenhauer DA, Jahngen EGE, Taylor A. Aging and cellular maturation cause changes in ubiquitin-eye lens protein conjugates. *Arch Biochem Biophys.* 1990. doi:10.1016/0003-9861(90)90006-K
  85. Ruotolo R, Grassi F, Percudani R, et al. Gene expression profiling in human age-related nuclear cataract. *Mol Vis.* 2003.
  86. Hawse JR, Hejtmancik JF, Horwitz J, Kantorow M. Identification and functional clustering of global gene expression differences between age-related cataract and clear human lenses and aged human lenses. In: *Experimental Eye Research.* ; 2004. doi:10.1016/j.exer.2004.04.007
  87. Scrofano MM, Shang F, Nowell TR, et al. Calorie restriction, stress and the ubiquitin-dependent pathway in mouse livers. *Mech Ageing Dev.* 1998. doi:10.1016/S0047-6374(98)00097-9
  88. Tsigotou P, Economopoulos T, Rontogianni D, et al. T-cell-rich B-cell lymphoma: Analysis of clinical features, response to treatment, survival and comparison with diffuse large B-cell lymphoma. *Oncology.* 2001. doi:10.1159/000055331
  89. Alberts B, Bray D, Johnson A, et al. *Essential Cell Biolog.*; 2013. doi:10.1201/9781315815015
  90. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981. doi:10.1073/pnas.78.11.7124
  91. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009;417(1):1-13. doi:10.1042/BJ20081386

92. Suomalainen A, Battersby BJ. Mitochondrial diseases: The contribution of organelle stress responses to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(2):77-92. doi:10.1038/nrm.2017.66
93. Edgar D, Shabalina I, Camara Y, et al. Random Point Mutations with Major Effects on Protein-Coding Genes Are the Driving Force behind Premature Aging in mtDNA Mutator Mice. *Cell Metab.* 2009. doi:10.1016/j.cmet.2009.06.010
94. Hiona A, Sanz A, Kujoth GC, et al. Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial dysfunction, apoptosis and sarcopenia in skeletal muscle of mitochondrial DNA mutator mice. *PLoS One.* 2010. doi:10.1371/journal.pone.0011468
95. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis. *Cell.* 2008. doi:10.1016/j.cell.2008.12.004
96. De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabó I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* 2011. doi:10.1038/nature10230
97. Wang K, Klionsky DJ. Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy.* 2011. doi:10.4161/auto.7.3.14502
98. Betteridge DJ. What is oxidative stress? In: *Metabolism: Clinical and Experimental.* ; 2000. doi:10.1016/S0026-0495(00)80077-3
99. Sykiotis GP, Bohmann D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal.* 2010;3(112). doi:10.1126/scisignal.3112re3
100. Furukawa M, Xiong Y. BTB Protein Keap1 Targets Antioxidant Transcription Factor Nrf2 for Ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 Ligase. *Mol Cell Biol.* 2005. doi:10.1128/mcb.25.1.162-171.2005
101. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Antioxidant-induced INrf2 (Keap1) tyrosine 85 phosphorylation controls the nuclear export and degradation of the INrf2-Cul3-Rbx1 complex to allow normal Nrf2 activation and repression. *J Cell Sci.* 2012. doi:10.1242/jcs.097295
102. Holland R, Fishbein JC. Chemistry of the cysteine sensors in kelch-like ECH-associated protein 1. *Antioxidants Redox Signal.* 2010. doi:10.1089/ars.2010.3273
103. Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA. Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Mol Cell Biol.* 2003. doi:10.1128/mcb.23.20.7198-7209.2003

104. Niture SK, Jain AK, Jaiswal AK. Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC- $\delta$ -mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci.* 2009. doi:10.1242/jcs.058537
105. Rahman MM, Sykiotis GP, Nishimura M, Bodmer R, Bohmann D. Declining signal dependence of Nrf2-MafS-regulated gene expression correlates with aging phenotypes. *Aging Cell.* 2013. doi:10.1111/accel.12078
106. Tsakiri EN, Sykiotis GP, Papassideri IS, et al. Proteasome dysfunction in Drosophila signals to an Nrf2-dependent regulatory circuit aiming to restore proteostasis and prevent premature aging. *Aging Cell.* 2013;12(5):802-813. doi:10.1111/accel.12111
107. Aunan JR, Cho WC, Søreide K. The biology of aging and cancer: A brief overview of shared and divergent molecular hallmarks. *Aging Dis.* 2017. doi:10.14336/AD.2017.0103
108. Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer.* 2008. doi:10.1038/nrc2399
109. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2002. doi:10.1016/S1535-6108(02)00102-2
110. Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: A perspective. *Oncogene.* 2005. doi:10.1038/sj.onc.1208618
111. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015. doi:10.3322/caac.21254
112. Fearon KCH, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer cachexia: Mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metab.* 2012. doi:10.1016/j.cmet.2012.06.011
113. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
114. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010. doi:10.1016/j.cell.2010.06.011
115. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology.* 2010. doi:10.1152/physiol.00045.2009
116. Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2009. doi:10.1016/j.ceb.2008.12.010
117. Perona R. Cell signalling: Growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol.* 2006. doi:10.1007/s12094-006-0162-1

118. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature*. 2004. doi:10.1038/nature03098
119. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007. doi:10.1038/sj.onc.1210220
120. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science (80- )*. 1998. doi:10.1126/science.281.5381.1317
121. Wong RSY. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011. doi:10.1186/1756-9966-30-87
122. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 2010. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025
123. White E, Karp C, Strohecker AM, Guo Y, Mathew R. Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2010. doi:10.1016/j.ceb.2009.12.008
124. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000. doi:10.1038/35036093
125. Blasco MA. Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005. doi:10.1038/nrg1656
126. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996. doi:10.1016/S0092-8674(00)80108-7
127. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(9):1745-1770. doi:10.1007/s00018-019-03351-7
128. Peget S. The Distribution of Secondary Growths in Cancer of the Breast. *Lancet*. 1888. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
129. Berx G, Van Roy F. The E-cadherin/catenin complex: An important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. *Breast Cancer Res*. 2001. doi:10.1186/bcr309
130. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004. doi:10.1038/nrc1276
131. Fidler IJ, Kripke ML. The challenge of targeting metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2015;34(4):635-641. doi:10.1007/s10555-015-9586-9
132. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability an evolving hallmark



- of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010. doi:10.1038/nrm2858
133. Yadav AK, Srikrishna S, Gupta SC. Cancer Drug Development Using *Drosophila* as an in vivo Tool: From Bedside to Bench and Back. *Trends Pharmacol Sci.* 2016;37(9):789-806. doi:10.1016/j.tips.2016.05.010
  134. Brumby AM, Richardson HE. Using *Drosophila melanogaster* to map human cancer pathways. *Nat Rev Cancer.* 2005. doi:10.1038/nrc1671
  135. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell.* 2009. doi:10.1016/j.cell.2009.02.024
  136. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
  137. Cox AD, Der CJ. Ras history: The saga continues. *Small GTPases.* 2010. doi:10.4161/sgtp.1.1.12178
  138. Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert Š. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2007. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.01.012
  139. Stites EC, Ravichandran KS. A systems perspective of ras signaling in cancer. *Clin Cancer Res.* 2009. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2753
  140. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kristen sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982. doi:10.1073/pnas.79.11.3637
  141. Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, Pulciani S, Barbacid M. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature.* 1982. doi:10.1038/298343a0
  142. Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature.* 1982. doi:10.1038/297474a0
  143. Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell.* 2007. doi:10.1016/j.cell.2007.05.018
  144. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell.* 2005. doi:10.1016/j.ccr.2005.04.023
  145. Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, et al. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet.* 2008. doi:10.1038/ng.115

146. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nat Rev Drug Discov*. 2014. doi:10.1038/nrd4389
147. Campbell PM, Der CJ. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2004. doi:10.1016/j.semcancer.2003.09.015
148. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*. 1989. doi:10.1038/339058a0
149. Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marmé D, Kerbel RS. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 1995. doi:10.1007/BF00690598
150. Noyes NC, Walkinshaw E, Davis RL. Ras acts as a molecular switch between two forms of consolidated memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020. doi:10.1073/pnas.1819925117
151. Li S, Balmain A, Counter CM. A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot. *Nat Rev Cancer*. 2018. doi:10.1038/s41568-018-0076-6
152. Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin E V. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res*. 1999. doi:10.1101/gr.9.1.27
153. Borlado LR, Méndez J. CDC6: From DNA replication to cell cycle checkpoints and oncogenesis. *Carcinogenesis*. 2008. doi:10.1093/carcin/bgm268
154. Diffley JFX. Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol*. 2004. doi:10.1016/j.cub.2004.09.019
155. Mizushima T, Takahashi N, Stillman B. Cdc6p modulates the structure and DNA binding activity of the origin recognition complex in vitro. *Genes Dev*. 2000. doi:10.1101/gad.14.13.1631
156. Randell JCW, Bowers JL, Rodríguez HK, Bell SP. Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Mol Cell*. 2006. doi:10.1016/j.molcel.2005.11.023
157. Liu E, Li X, Yan F, Zhao Q, Wu X. Cyclin-dependent Kinases Phosphorylate Human Cdt1 and Induce Its Degradation. *J Biol Chem*. 2004. doi:10.1074/jbc.C300549200
158. Jallepalli P V., Brown GW, Muzi-Falconi M, Tien D, Kelly TJ. Regulation of the replication initiator protein p53(cdc18) by CDK phosphorylation. *Genes Dev*. 1997. doi:10.1101/gad.11.21.2767
159. Bowers JL, Randell JCW, Chen S, Bell SP. ATP hydrolysis by ORC catalyzes

- reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication. *Mol Cell*. 2004. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.038
160. Nishitani H, Nurse P. p53cd18 Plays a major role controlling the initiation of DNA replication in fission yeast. *Cell*. 1995. doi:10.1016/0092-8674(95)90117-5
161. Takai H, Xie Y, De Lange T, Pavletich NP. Tel2 structure and function in the Hsp90-dependent maturation of mTOR and ATR complexes. *Genes Dev*. 2010. doi:10.1101/gad.1956410
162. Tatsumi Y, Sugimoto N, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Fujita M. Dereglulation of Cdt1 induces chromosomal damage without rereplication and leads to chromosomal instability. *J Cell Sci*. 2006. doi:10.1242/jcs.03031
163. Gonzalez S, Klatt P, Delgado S, et al. Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus. *Nature*. 2006. doi:10.1038/nature04585
164. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*. 2006. doi:10.1038/nature05268
165. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 2006. doi:10.1038/nature05327
166. Crevel G, Mathe E, Cotterill S. The Drosophila Cdc6/18 protein has functions in both early and late S phase in S2 cells. *J Cell Sci*. 2005. doi:10.1242/jcs.02361
167. Grimm C, Hassan S, Wahl-Schott C, Biel M. Role of TRPML and two-pore channels in endolysosomal cation homeostasis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012. doi:10.1124/jpet.112.192880
168. Helfand SL, Rogina B. Genetics of Aging in the Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Genet*. 2003. doi:10.1146/annurev.genet.37.040103.095211
169. Slack C, Somers WG, Sousa-Nunes R, Chia W, Overton PM. A mosaic genetic screen for novel mutations affecting *Drosophila* neuroblast divisions. *BMC Genet*. 2006. doi:10.1186/1471-2156-7-33
170. Kim SB, Pandita RK, Eskiocak U, et al. Targeting of Nrf2 induces DNA damage signaling and protects colonic epithelial cells from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(43):2949-2955. doi:10.1073/pnas.1207718109
171. Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell*. 2018;34(1):21-43. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.022

172. Tsakiri EN, Gumeni S, Vougas K, et al. Proteasome dysfunction induces excessive proteome instability and loss of mitostasis that can be mitigated by enhancing mitochondrial fusion or autophagy. *Autophagy*. 2019;15(10):1757-1773. doi:10.1080/15548627.2019.1596477
173. Arlt A, Bauer I, Schafmayer C, et al. Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene*. 2009. doi:10.1038/onc.2009.264
174. Vardabasso C, Hasson D, Ratnakumar K, Chung CY, Duarte LF, Bernstein E. Histone variants: Emerging players in cancer biology. *Cell Mol Life Sci*. 2014. doi:10.1007/s00018-013-1343-z
175. Komseli ES, Pateras IS, Krejsgaard T, et al. A prototypical non-malignant epithelial model to study genome dynamics and concurrently monitor micro-RNAs and proteins in situ during oncogene-induced senescence. *BMC Genomics*. 2018;19(1):1-22. doi:10.1186/s12864-017-4375-1
176. Kurada P, White K. Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating hid expression. *Cell*. 1998. doi:10.1016/S0092-8674(00)81764-X

## Παράρτημα: Στατιστική ανάλυση πρότυπων καμπύλων επιβίωσης

Εικόνα 3.18	Δείγμα	Μέσο προσδόκιμο ζωής (Π.Ζ.) +/- s.e.m. (Ημέρες)	Διάμεσος προσδόκιμου ζωής (Π.Ζ.) +/- s.e.m. (Ημέρες)	% Διάμεσος Π.Ζ.	Μέγιστο (Ημέρες)	Τιμή p στατιστικής ανάλυσης log-Rank		
						<i>Ras85D<sup>+/2</sup></i> RU486 (+)		
	<i>Ras85D<sup>+/2</sup></i> RU486 (-)	40,676	5,051	40	11,727	100	93	
	<i>Ras85D<sup>+/2</sup></i> RU486 (+)	3,750	0,262	3	0,229	7,50	7	0.000

Εικόνα 3.19	Δείγμα	Μέσο προσδόκιμο ζωής (Π.Ζ.) +/- s.e.m. (Ημέρες)	Διάμεσος προσδόκιμου ζωής (Π.Ζ.) +/- s.e.m. (Ημέρες)	% Διάμεσος Π.Ζ.	Μέγιστο (Ημέρες)	Τιμή p στατιστικής ανάλυσης log-Rank		
						<i>Ras85D<sup>+/2</sup>, cncC</i> RU486 (+)		
	<i>Ras85D<sup>+/2</sup></i> RU486 (-)	40,676	5,051	40	11,727	100	93	
	<i>Ras85D<sup>+/2</sup></i> RU486 (+)	3,750	0,262	3	0,229	7,50	7	0.000
	<i>Ras85D<sup>+/2</sup>, cncC</i> RU486 (-)	63,628	2,136	67	0,934	100	79	
	<i>Ras85D<sup>+/2</sup>, cncC</i> RU486 (+)	5,255	0,140	5	0,165	7,46	8	0.000

Εικόνα 3.20	Δείγμα	Μέσο προσδόκιμο ζωής (Π.Ζ.) +/- s.e.m. (Ημέρες)	Διάμεσος προσδόκιμου ζωής (Π.Ζ.) +/- s.e.m. (Ημέρες)	% Διάμεσος Π.Ζ.	Μέγιστο (Ημέρες)	Τιμή p στατιστικής ανάλυσης log-Rank		
						<i>OE Cdc6</i> RU486 (+)		
	<i>OE Cdc6</i> RU486 (-)	43,469	2,311	43	0,998	100	80	
	<i>OE Cdc6</i> RU486 (+)	42,157	2,429	46	3,124	106,98	65	0.000

Εικόνα 3.20	Δείγμα	Μέσο προσδόκιμο ζωής (Π.Ζ.) +/- s.e.m. (Ημέρες)	Διάμεσος προσδόκιμου ζωής (Π.Ζ.) +/- s.e.m. (Ημέρες)	% Διάμεσος Π.Ζ.	Μέγιστο (Ημέρες)	Τιμή p στατιστικής ανάλυσης log-Rank		
						<i>OE Cdc6, cncC</i> RU486 (+)		
	<i>OE Cdc6</i> RU486 (-)	43,469	2,311	43	0,998	100	80	
	<i>OE Cdc6</i> RU486 (+)	42,157	2,429	46	3,124	106,98	65	0.000
	<i>OE Cdc6, cncC</i> RU486 (-)	41,385	2,853	37	3,966	100	75	
	<i>OE Cdc6, cncC</i> RU486 (+)	25,745	1,242	28	0,760	75,68	47	0.000