



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

**Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών**

--- ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 ---

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»**

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Μελέτη φυσικών προϊόντων με πιθανή  
αντι-γηραντική και/ή αντι-καρκινική δράση»**

**ΙΩΑΝΝΑ ΛΩΛΟΥ**

Μοριακός Βιολόγος

A.M. 41805

**Επιβλέπων Καθηγητής**

Ιωάννης Π. Τρουγκάκος, Καθηγητής

Αθήνα 2020



## **Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής**

**Ιωάννης Π. Τρουγκάκος** Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,  
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ (**Επιβλέπων Καθηγητής**)

**Ισιδώρα Σ. Παπασιδέρη** Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής,  
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

**Παναγούλα Κόλλια** Καθηγήτρια, Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας,  
Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

## **Τόπος εκπόνησης**

Εργαστήριο Μοριακής-Κυτταρικής Γήρανσης και Καρκινογένεσης  
Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ

## Περίληψη

Η πρωτεόσταση είναι μια διαδικασία, η οποία ρυθμίζει τη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών στα κύτταρα, με σκοπό τη διατήρηση της ακεραιότητας του πρωτεώματος και συνεπώς της υγείας ολόκληρου του οργανισμού. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενός πολύπλοκου συστήματος, το οποίο διασφαλίζει την ποιότητα του πρωτεώματος και ονομάζεται δίκτυο πρωτεόστασης. Το δίκτυο αυτό αποφασίζει για το δίπλωμα, τη διατήρηση ή την αποικοδόμηση μιας πρωτεΐνης και αποτελείται από αλληλοεξαρτώμενα συστήματα, τα οποία αναγνωρίζουν και διορθώνουν ή αποικοδομούν τα λανθασμένα διπλωμένα ή τα μη λειτουργικά πολυπεπτίδια. Τα βασικά συστατικά του δικτύου πρωτεόστασης είναι οι δύο κύριοι πρωτεολυτικοί μηχανισμοί του κυττάρου, δηλαδή τα μονοπάτια ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσσοσώματος, το σηματοδοτικό μονοπάτι NRF2/KEAP1, που είναι υπεύθυνο για την απόκριση των κυττάρων σε οξειδωτικό και/ή ηλεκτρόφιλο στρες, και οι μοριακές συνοδοί.

Η διατάραξη της πρωτεόστασης οδηγεί σε πρωτεωμική αστάθεια και αποτελεί ένα από τα κύρια ορόσημα της γήρανσης. Καθώς ο οργανισμός γερνάει, το δίκτυο πρωτεόστασης δυσλειτουργεί, με αποτέλεσμα τη μείωση των σηματοδοτικών και επιδιορθωτικών μονοπατιών και τη συσσώρευση υψηλών επιπέδων στρεσογόνων, τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση του γηρασμένου ιστού και των ασθενειών που σχετίζονται με το γήρας, όπως ο καρκίνος. Μελέτες αποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών του δικτύου πρωτεόστασης είναι δυνατόν να μειώσει τη νοσηρότητα και να αυξήσει τη μακροβιότητα των οργανισμών. Επίσης, η συσχέτιση της εξέλιξης της καρκινογένεσης με τους μηχανισμούς διασφάλισης της ποιότητας του πρωτεώματος των κυττάρων ανοίγει νέα μονοπάτια στην προσπάθεια αντιμετώπισης του καρκίνου.

Ωστόσο, παρά τα πολύπλοκα συστήματα, τα οποία συμμετέχουν στο φαινόμενο της γήρανσης, έχουν βρεθεί μηχανισμοί, οι οποίοι συντελούν στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής, όπως ο θερμιδικός περιορισμός. Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί αρκετά φυσικά προϊόντα, τα οποία μπορούν να καθυστερήσουν την κυτταρική γήρανση σε ανθρώπινα κύτταρα ή την *in vivo* γήρανση σε μοντέλα οργανισμών, ενεργοποιώντας τους παράγοντες του δικτύου πρωτεόστασης. Τα φυσικά προϊόντα αποτελούν εξαιρετικά πλούσια πηγή βιοδραστικών ενώσεων και συνιστούν πεδίο βιοϊατρικής έρευνας για πιθανή φαρμακευτική ή καλλυντική χρήση.

Σε συνέχεια μιας εκτενούς μελέτης με σκοπό την ανίχνευση βιοδραστικών μορίων έναντι της γήρανσης και του καρκίνου, στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν φυσικά προϊόντα που έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους οργανισμούς και φυτά. Πιο

συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση τους στα μονοπάτια ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσosώματος, στην αντιοξειδωτική απόκριση, στη ρύθμιση του δικτύου των μοριακών συνοδών και στην επιδιόρθωση βλαβών του γενετικού υλικού, αποδεικνύοντας την ευεργετική τους δράση στους μηχανισμούς αυτούς. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες πρέπει να διεξαχθούν όσον αφορά στους συγκεκριμένους μηχανισμούς, προκειμένου να αποσαφηνιστεί πλήρως ο τρόπος μέσω του οποίου μπορούν να καθυστερήσουν την κυτταρική γήρανση.

## Abstract

Proteostasis is a process that regulates the structure and the function of the proteins within the cells, with aim to maintain the integrity of the proteome and consequently, the health of the whole body. This is achieved through a complicated system that ensures the proteome's quality, known as proteostasis network. This network is responsible to fold, hold, or degrade a protein and consists of interdependent systems that recognize and rescue or degrade misfolded or non-functional polypeptides. The key components of the proteostasis network are the two main degradation machineries of the cell, i.e. the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways, the NRF2/KEAP1 signaling pathway, which mobilizes cellular responses to oxidative and/or electrophilic stress, and the molecular chaperones.

The deregulation of proteostasis leads to proteomic instability and is considered as one of the hallmarks of aging. During aging, the proteostasis network malfunctions reducing signaling and repair pathways and accumulating high levels of stressors associated with the cellular senescence and age-related diseases, such as cancer. Studies support that activating the signaling pathways of the proteostasis network can reduce the morbidity and increase the longevity of the organisms. Also, the correlation of the evolution of carcinogenesis with the mechanisms of the proteome quality control leads to new efforts to cancer treatment.

However, despite the complicated systems involved in aging, some mechanisms that have been found can increase life expectancy, such as calorie restriction. In recent years, natural products have been found that can delay the cellular senescence in human cells or the *in vivo* aging in model organisms activating the proteostasis network. Natural products are an extremely rich resources of bioactive compounds and indicate a field of biomedical research for possible pharmaceutical or cosmetic use.

Following an extensive screening in order to identify bioactive molecules against aging and cancer, in this thesis, we studied natural products, isolated from marine organisms and plants. More specifically, we examined their effect on ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways, on the antioxidant response, on the regulation of the network of molecular chaperones and on the DNA damage repair, proving their beneficial effect in these mechanisms. However, further studies need to be conducted on these mechanisms in order to fully elucidate the way by which they can delay cellular senescence.

## Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία με θέμα «Μελέτη φυσικών προϊόντων με πιθανή αντι-γηραντική και/ή αντι-καρκινική δράση» πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική» του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής-Κυτταρικής Γήρανσης και Καρκινογένεσης του Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκου, στον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, στο Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Τρουγκάκο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε παρέχοντας μου την ευκαιρία να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του. Είχα την ιδιαίτερη τιμή να συνεργαστώ μαζί του, καθώς με συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη απέκτησα γνώσεις για τη μετέπειτα σταδιοδρομία μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα Ισιδώρα Παπασιδέρη και την Καθηγήτρια κα Παναγούλα Κόλλια, μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου, για τη βοήθεια, τη γνώση και την υποστήριξη κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια Διδάκτορα Δέσποινα Γιαννιού, που ανέλαβε την εκπαίδευση μου, για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε, τη βοήθεια της, την υπομονή της και την εμπύχωση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Αιμιλία Σκληρού για την καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, τις συμβουλές της και την ψυχολογική υποστήριξη.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου, Sentiljana Gumeni, Ελένη-Δήμητρα Παπανάγνου, Ζωή Ευαγγελάκου, Μαρία Μανωλά, Αλεξάνδρα Ραφελέτου, Μαρία Λάμπρου, Ξανθίππη Λούκα, Γιώργο Αθανασίου, Όλγα Δήμου, Αλεξάνδρα Δρακάκη και Αιμιλία Παπαθανασίου για την άριστη συνεργασία μας και την ευχάριστη διάθεση τους, και σε όλα τα μέλη του Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αγάπη και τη συνεχή στήριξη που μου παρέχει για να εκπληρώσω τα όνειρα και τους στόχους μου.

Ιωάννα Λώλου

# Περιεχόμενα

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
1.1 Σημασία της πρωτεόστασης	1
1.2 Δίκτυο πρωτεόστασης	2
1.2.1 Ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης	3
1.2.2 Μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος	4
1.2.3 Μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσosώματος	7
1.2.4 Μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2/KEAP1	10
1.2.5 Δίκτυο μοριακών συνοδών	12
1.3 Επιδιόρθωση βλαβών γενετικού υλικού	13
1.4 Γήρανση	14
1.4.1 Επίδραση του δικτύου πρωτεόστασης στη γήρανση των οργανισμών	16
1.5 Καρκίνος	17
1.5.1 Επίδραση του δικτύου πρωτεόστασης στην καρκινογένεση	19
1.6 Φυσικά προϊόντα ως ρυθμιστές του δικτύου πρωτεόστασης	20
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b>	<b>23</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>24</b>
2.1 Υλικά	24
2.1.1 Φυσικά προϊόντα	24
2.1.2 Κυτταρικές σειρές	24
2.1.3 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας	25
2.1.4 Χημικά αντιδραστήρια	25
2.1.5 PCR εκκινήτες	26
2.1.6 Αντισώματα	27
2.1.7 Όργανα	28
2.2 Μέθοδοι	29
2.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες	29
2.2.2 Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη δοκιμασία MTT	30
2.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford	31
2.2.4 Καταγραφή των ενζυμικών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων	32
2.2.5 Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των καθεψινών B και L του λυσοσώματος	33



2.2.6 Μέτρηση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου	33
2.2.7 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης	34
2.2.8 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης με ανοσοαποτύπωμα Western	35
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XML-233-F9-SF10 στο δίκτυο πρωτεόστασης</b>	<b>39</b>
3.1.1 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XML-233-F9-SF10 στο μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος	39
<b>3.2 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XTMm245-S4 LAE στο δίκτυο πρωτεόστασης</b>	<b>40</b>
3.2.1 Μελέτη τοξικότητας του φυσικού προϊόντος XTMm245-S4 LAE	40
3.2.2 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XTMm245-S4 LAE στο μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος	41
3.2.3 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XTMm245-S4 LAE στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσσοσώματος	43
3.2.4 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XTMm245-S4 LAE στην αντιοξειδωτική απόκριση	44
3.2.5 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XTMm245-S4 LAE στο δίκτυο των μοριακών συνοδών	45
3.2.6 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XTMm245-S4 LAE στην επιδιόρθωση βλαβών του γενετικού υλικού	46
<b>3.3 Μελέτη της επίδρασης των φυσικών προϊόντων του φυτού <i>Sonchus tenerrimus</i> στο δίκτυο πρωτεόστασης</b>	<b>47</b>
3.3.1 Μελέτη τοξικότητας των φυσικών προϊόντων του φυτού <i>Sonchus tenerrimus</i>	47
3.3.2 Μελέτη της επίδρασης των φυσικών προϊόντων του φυτού <i>Sonchus tenerrimus</i> στην αντιοξειδωτική απόκριση	48
3.3.3 Μελέτη της επίδρασης των φυσικών προϊόντων του φυτού <i>Sonchus tenerrimus</i> στο μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος	50
3.3.4 Μελέτη της επίδρασης των φυσικών προϊόντων του φυτού <i>Sonchus tenerrimus</i> στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσσοσώματος	51
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>53</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>58</b>

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Σημασία της πρωτεόστασης

Οι πολυκύτταροι οργανισμοί αποτελούνται από μια τεράστια ποικιλία βιομορίων που βρίσκονται στα κυτταρικά οργανίδια, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, οι οποίες καθορίζουν τους κυτταρικούς τύπους και την πλειοψηφία των κυτταρικών λειτουργιών. Η πρωτεϊνική ομοιόσταση ή πρωτεόσταση είναι η διαδικασία η οποία ρυθμίζει τις πρωτεΐνες στα κύτταρα, με σκοπό τη διατήρηση της ακεραιότητας του πρωτεώματος αλλά και της υγείας του οργανισμού (Kulak et al., 2017; Trougakos et al., 2013).

Κατά την αρχική διαλογή των πρωτεϊνών, τα mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του κυτοσολίου ή του πυρήνα μεταφράζονται στα ελεύθερα ριβοσώματα, ενώ τα mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που προορίζονται για την εκκριτική οδό ή τον εξωκυττάριο χώρο μεταφράζονται στα ριβοσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου (Trougakos et al., 2013).

Όλες οι πρωτεΐνες πρέπει να διπλωθούν και συχνά να συναρμολογηθούν σε καλά καθορισμένες τρισδιάστατες δομές για την εκτέλεση ποικίλων κυτταρικών λειτουργιών (Kulak et al., 2017). Όμως, η διαδικασία του διπλώματος είναι επιρρεπής σε λάθη (Bartlett and Radford, 2009). Η παραγωγή λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών αυξάνεται περαιτέρω λόγω στοχαστικών λαθών που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της βιογένεσης των πρωτεϊνών στο επίπεδο της μεταγραφής και ωρίμανσης του mRNA καθώς και της μετάφρασης (Drummond and Wilke, 2008).

Σχεδόν όλα τα πολυπεπτίδια στο κύτταρο χρειάζονται τη βοήθεια μοριακών συνοδών και άλλων παραγόντων, προκειμένου να διπλωθούν σωστά (Balchin et al., 2016). Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες συχνά πρέπει να διατηρούν τη δομική τους ευελιξία, καθώς και ότι περιέχουν σημαντικές περιοχές μη διπλωμένες, οι οποίες έχουν λειτουργικό ρόλο, έχουν την τάση να διπλώνονται λανθασμένα και να σχηματίζουν συσσωματώματα (Chiti and Dobson, 2017). Συνεπώς, οι πρωτεΐνες που έχουν διπλωθεί λανθασμένα και δεν είναι πια λειτουργικές πρέπει να αποικοδομηθούν, ούτως ώστε να αποφευχθούν οι βλαβερές συνέπειες της συσσώρευσης τους.

Τα πολυπεπτίδια και οι πρωτεΐνες τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά είτε μέσω ενζυμικών πρωτεϊνικών τροποποιήσεων (φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, μεθυλίωση, ουβικιτινίωση) είτε μέσω μη ενζυμικών πρωτεϊνικών τροποποιήσεων (οξειδωση, γλυκοζυλίωση) (Trougakos et al., 2013). Οι πρωτεΐνες που τροποποιούνται ενζυμικά παραμένουν πλήρως λειτουργικές, ενώ οι μη ενζυμικές πρωτεϊνικές τροποποιήσεις μπορούν να προκαλέσουν λανθασμένο δίπλωμα ή ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών οδηγώντας σε αυξημένη πρωτεωμική αστάθεια (Tsakiri and Trougakos, 2015).

Επιπλέον, η συνεχής επίδραση στρεσογόνων παραγόντων και η διατάραξη της ομοιόστασης προκαλούν αυξημένη βλάβη του πρωτεώματος, με αποτέλεσμα την γονιδιωματική αστάθεια. Με άλλα λόγια, η σωστή λειτουργική δομή των πρωτεϊνών εμπλέκεται όχι μόνο στη σωστή κυτταρική λειτουργία, αλλά επίσης και στη σταθερότητα και την επιδιόρθωση του γονιδιώματος (Tsakiri and Trougakos, 2015).

Οι οργανισμοί διατηρούν χαμηλά επίπεδα των δυσλειτουργικών βιομορίων. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, αυτό επιτυγχάνεται από ένα σύστημα το οποίο διασφαλίζει τον έλεγχο ποιότητας του πρωτεώματος και ονομάζεται δίκτυο πρωτεόστασης. Το δίκτυο αυτό αποφασίζει για το δίπλωμα, τη διατήρηση ή την αποικοδόμηση μιας πρωτεΐνης και αποτελείται από αλληλοεξαρτώμενα συστήματα, τα οποία αναγνωρίζουν και διορθώνουν ή αποικοδομούν τα λανθασμένα διπλωμένα ή τα μη λειτουργικά πολυπεπτίδια (Morimoto and Cuervo, 2014; Trougakos et al., 2013).

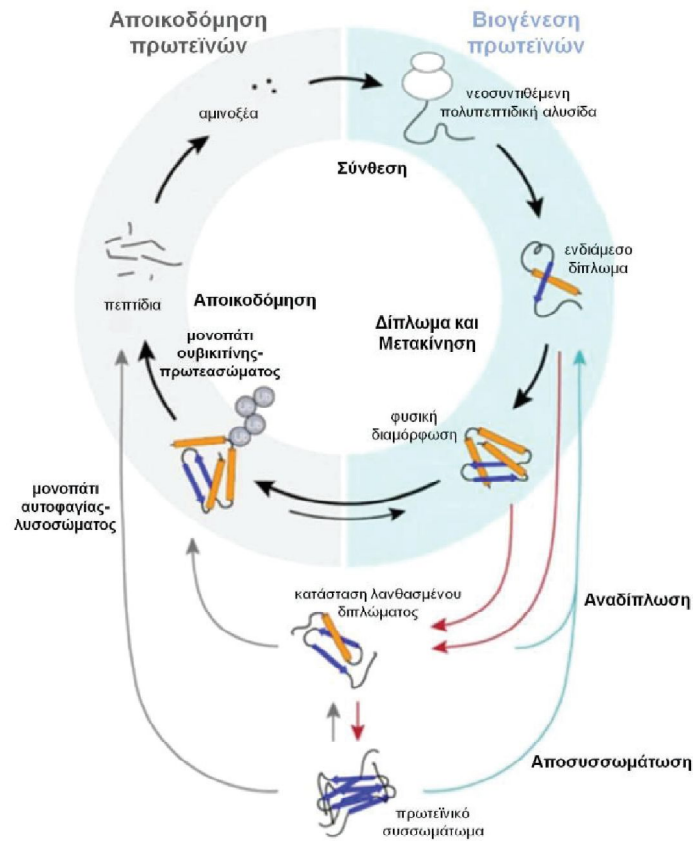
## **1.2 Δίκτυο πρωτεόστασης**

Το δίκτυο πρωτεόστασης διατηρεί την ακεραιότητα του πρωτεώματος σε κυτταρικό, ιστοειδικό και συστημικό επίπεδο, προκειμένου να εξασφαλιστεί η υγεία και η μακροζωία του οργανισμού. Εντοπίζεται σε όλα τα υποκυτταρικά διαμερίσματα, όπως στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα. Τα συστατικά του μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κλάδους, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνικών μηχανών και των συστημάτων που είναι απαραίτητα για τις εξής ουσιώδεις διεργασίες: την πρωτεϊνική σύνθεση, το δίπλωμα των πρωτεϊνών, τη μεταφορά καθώς και την αποικοδόμηση τους (Sala et al., 2017).

Πιο συγκεκριμένα, το δίκτυο πρωτεόστασης περιλαμβάνει τις ακόλουθες διαδικασίες: (α) τη μετάφραση των πρωτεϊνών που ελέγχεται από τα ριβοσώματα και τους παράγοντες που ρυθμίζουν τη σύνθεση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, (β) το δίπλωμα των πρωτεϊνών μέσω των μοριακών συνοδών, (γ) τη μεταφορά των πρωτεϊνών στο κυτοσόλιο διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών και μέσα στα κυτταρικά οργανίδια και (δ) την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών μέσω των μονοπατιών ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσοσώματος και μέσω των κυτταρικών πρωτεασών (Sala et al., 2017) (Εικόνα 1.1).

Επιπλέον, το δίκτυο πρωτεόστασης αποτελείται και από μεταγραφικούς παράγοντες με μικρό χρόνο ζωής που λειτουργούν σαν αισθητήρες στρες και κινητοποιούν γενωμικές κυτταροπροστατευτικές αποκρίσεις σε συνθήκες αυξημένων στρεσογόνων. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι μεταγραφικοί παράγοντες: P53 που κινητοποιεί την κυτταρική απόκριση σε γενωμική αστάθεια, HSF1 (Heat Shock Factor 1) που ρυθμίζει τα επίπεδα των μοριακών συνοδών, FOXO (Forkhead box O) που προάγει αντιοξειδωτικές και μεταβολικές γενωμικές αποκρίσεις και NRF2 (Nuclear factor

erythroid 2-Related Factor 2), που σχετίζεται με την απόκριση σε οξειδωτικό, ηλεκτρόφιλο και/ή πρωτεοτοξικό στρες (Gumeni et al., 2017).



**Εικόνα 1.1 Επισκόπηση του δικτύου πρωτεόστασης:** Η πρωτεόσταση περιλαμβάνει τις κυτταρικές διεργασίες που ρυθμίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση, το δίπλωμα, τη μετακίνηση και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Το δίκτυο πρωτεόστασης αποτελείται από τη μεταφραστική μηχανή, τους μοριακούς συνοδούς, τα μονοπάτια ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσσώματος για τη διατήρηση της ροής της (μαύρα βέλη). Οι μη φυσιολογικές πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από μηχανισμούς ελέγχου ποιότητας για την πρόληψη της συσσώρευσης τους στα κύτταρα (κόκκινα βέλη). Οι λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες και τα συσσωματώματα είτε αποσυσσωματώνονται και αναδιπλώνονται μέσω μοριακών συνοδών (μπλε βέλη) είτε αποικοδομούνται από τα πρωτεολυτικά συστήματα (γκρίζα βέλη) (Προσαρμογή από Sala et al., 2017).

### 1.2.1 Ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης

Παρόλο που η πρωτεϊνοσύνθεση ρυθμίζεται από συγκεκριμένους παράγοντες και μονοπάτια, προσαρμόζεται επίσης και ανάλογα με την ικανότητα των κυττάρων για το δίπλωμα των πρωτεϊνών, ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών (Klaips et al., 2018). Η μείωση της μετάφρασης αποτρέπει την

υπερφόρτωση του δικτύου πρωτεόστασης και κατ' επέκταση τη διατάραξη της πρωτεόστασης (Bravo et al., 2013).

Η ρύθμιση στο επίπεδο της μετάφρασης μέσω των ριβοσωμάτων και των κυτταρικών αισθητήρων (στα μιτοχόνδρια ή στο ενδοπλασματικό δίκτυο) ανταποκρίνεται σε διάφορες συνθήκες στρες, συμπεριλαμβανομένων συνθηκών διατροφής, όπως η έλλειψη αμινοξέων ή γλυκόζης και η συσσώρευση λίπους (Baird and Wek, 2012). Επιπλέον, οι tRNA συνθετάσες αναγνωρίζουν και απομακρύνουν λανθασμένα ενσωματωμένα αμινοξέα από το ενεργό τους κέντρο βελτιώνοντας την πιστότητα της πρωτεϊνοσύνθεσης (Lee et al., 2006).

Ως ένα ακόμα επίπεδο ελέγχου της πρωτεϊνοσύνθεσης, οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες έχουν την ικανότητα να αναδιπλώνονται πριν ολοκληρωθεί η πρωτεϊνοσύνθεση τους μέσω των μοριακών συνοδών, προκειμένου να εξασφαλιστεί το σωστό δίπλωμα τους (Shalgi et al., 2013). Επιπροσθέτως, τα λανθασμένα συναρμολογημένα ριβοσώματα αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται μέσω μιας διαδικασίας που επιτυγχάνεται με ουβικιτινιλίωση και αυτοφαγία του ριβοσώματος (ριβοφαγία) (Kraft et al., 2008).

Τέλος, η συσσώρευση μη διπλωμένων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο και η ενεργοποίηση του μηχανισμού απομάκρυνσης τους (Unfolded Protein Response, UPR) μειώνουν την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω της φωσφορυλίωσης της  $\alpha$  υπομονάδας του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF2 $\alpha$  από την πρωτεϊνική κινάση PERK (Protein kinase RNA-like ER Kinase) (Scheuner et al., 2001).

### **1.2.2 Μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος**

Το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος είναι από τους κυριότερους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς που συμβάλλουν στη διατήρηση της πρωτεόστασης σε πολλά κυτταρικά οργανίδια, όπως στον πυρήνα, στο κυτοσόλιο, στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στα μιτοχόνδρια, αλλά και στον εξωκυττάριο χώρο. Αποτελείται από την πρωτεΐνη ουβικιτίνη, τα ένζυμα που συνδέονται με την ουβικιτίνη και το πρωτεάσωμα (Εικόνα 1.2). Το πρωτεάσωμα είναι μια μοριακή μηχανή που αποικοδομεί φυσιολογικές πρωτεΐνες μικρού χρόνου ζωής, που είναι συνδεδεμένες με την ουβικιτίνη, και το 80-90% των ενδοκυττάριων πρωτεϊνών, που έχουν διπλωθεί λανθασμένα. Το μονοπάτι αυτό ρυθμίζεται μεταγραφικά και μετα-μεταφραστικά, είτε σε φυσιολογικές συνθήκες, είτε υπό συνθήκες αυξημένου οξειδωτικού και πρωτεοτοξικού στρες, όπως συμβαίνει κατά τη γήρανση. Η αποικοδόμηση πρωτεϊνών από το σύστημα ουβικιτίνης-πρωτεασώματος είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία που εμπλέκει δύο διακριτά βήματα, την ουβικιτινιλίωση και την πρωτεασωμική αποικοδόμηση (Tsakiri and Trougakos, 2015).

### 1.2.2.1 Ουβικιτίνη

Η ουβικιτίνη είναι μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 76 αμινοξέα και είναι σημαντικά συντηρημένη μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών. Παρόλο που δεν εκφράζεται στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, έχουν βρεθεί διάφορες βακτηριακές πρωτεΐνες που παρουσιάζουν λειτουργικές και δομικές ομοιότητες με την ουβικιτίνη και τα συστατικά του συστήματος ουβικιτίνης (Iyer et al, 2006). Η ουβικιτίνη σχηματίζει αλυσίδες που συνδέονται μέσω των επτά καταλοίπων λυσίνης (Lys 6, 11, 27, 29, 33, 48 και 63) και μέσω της μεθειονίνης που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της, με το μοτίβο δι-γλυκίνης στο καρβοξυτελικό άκρο μιας άλλης ουβικιτίνης. Η ουβικιτίνη προσδένεται στις πρωτεΐνες είτε ως μονομερές είτε με τη μορφή μιας αλυσίδας πολυουβικιτίνης μέσω μιας ενζυμικής αντίδρασης, που ονομάζεται ουβικιτινιλίωση, ρυθμίζοντας έτσι την τύχη των πρωτεϊνών που έχουν τροποποιηθεί στον πυρήνα και το κυτοσόλιο (von Mikecz et al, 2006).

Η διαδικασία της ουβικιτινιλίωσης είναι ATP εξαρτώμενη και πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας σειράς ενζύμων. Πιο συγκεκριμένα, η ουβικιτίνη ενεργοποιείται από το ένζυμο ενεργοποίησης της ουβικιτίνης (E1) μέσω του σχηματισμού ενός θειοεστερικού δεσμού μεταξύ του καρβοξυτελικού καταλοίπου γλυκίνης της ουβικιτίνης και του ενεργού κέντρου του ενζύμου E1 παρουσία ATP. Στη συνέχεια, η ενεργοποιημένη ουβικιτίνη μεταφέρεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου σύζευξης της ουβικιτίνης (E2) και μέσω του ενζύμου λιγάση της ουβικιτίνης (E3) συνδέεται με την ε-αμινοομάδα ενός καταλοίπου λυσίνης της πρωτεΐνης-στόχου δημιουργώντας ισοπεπτιδικό δεσμό (Hershko and Ciechanover, 1998).

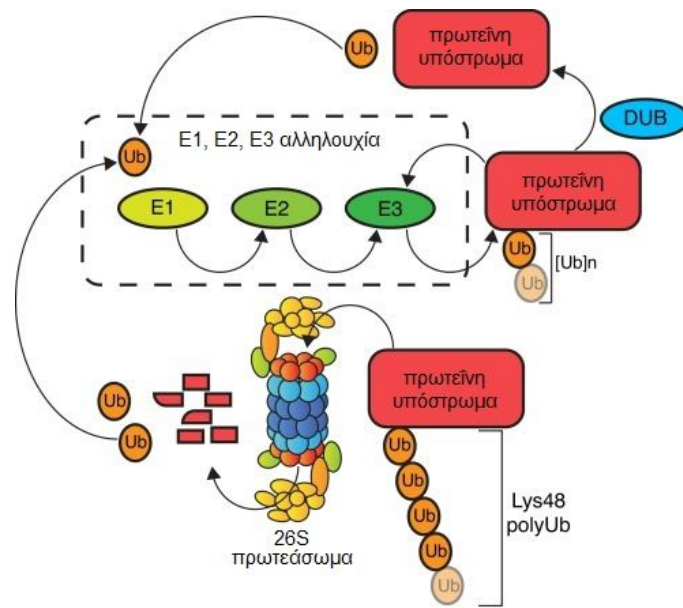
Η απο-ουβικιτινιλίωση είναι η διαδικασία εκείνη κατά την οποία αφαιρούνται οι αλυσίδες ουβικιτίνης από το υπόστρωμα για να εισαχθεί στο πρωτεάσωμα και να αποικοδομηθεί. Πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας ομάδας ισοπεπτιδασών που ονομάζονται απο-ουβικιτινάσες (Deubiquitinating enzymes, DUBs), οι οποίες έχουν την ικανότητα να διασπούν τον ισοπεπτιδικό δεσμό ανάμεσα στην ουβικιτίνη και το υπόστρωμα. Μερικές απο-ουβικιτινάσες απελευθερώνουν την ουβικιτίνη πριν την αναγνώριση από το πρωτεάσωμα, με αποτέλεσμα την αναστολή της αποικοδόμησης. Επιπλέον, οι απο-ουβικιτινάσες ρυθμίζουν τα επίπεδα της ελεύθερης και της συζευγμένης μορφής της ουβικιτίνης (Nijman et al., 2005).

### 1.2.2.2 Πρωτεάσωμα

Το πρωτεάσωμα είναι ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο (~2,5 MDa), το οποίο παίζει κύριο ρόλο στην πρωτεϊνική αποικοδόμηση από τα αρχαιοβακτήρια μέχρι τα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το 26S πρωτεάσωμα αποτελείται από το 20S καταλυτικό τμήμα και από ένα ή δύο 19S ρυθμιστικά τμήματα τα οποία προσδένονται στα άκρα του 20S καταλυτικού τμήματος. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι πρωτεΐνες μικρού χρόνου ζωής που είναι συνδεδεμένες με την πρωτεΐνη ουβικιτίνη, αποικοδομούνται από το 26S πρωτεάσωμα, ενώ μη διπλωμένα ή λανθασμένα διπλωμένα μη λειτουργικά πολυπεπίδια αποικοδομούνται από το 20S πρωτεάσωμα (Tsakiri and Trougakos, 2015).

Το 20S καταλυτικό τμήμα αποτελείται από 28 α και β τύπου υπομονάδες που ομαδοποιούνται σε τέσσερις δακτυλίους. Οι εσωτερικοί δακτύλιοι αποτελούνται από τις β τύπου υπομονάδες (β1-7) και οι εξωτερικοί δακτύλιοι από τις α τύπου υπομονάδες (α1-7). Οι κύριες ενζυμικές ενεργότητες του πρωτεασώματος βρίσκονται στις υπομονάδες β και πιο συγκεκριμένα στην υπομονάδα β1 βρίσκεται η ενεργότητα κασπάσης, στην υπομονάδα β2 η ενεργότητα θρυψίνης και στην υπομονάδα β5 η ενεργότητα χυμοθρυψίνης. Οι υπομονάδες α δεν διαθέτουν κάποια πρωτεολυτική ενεργότητα, αλλά έχουν ρυθμιστικό ρόλο, καθώς αποτελούν την πύλη του 20S πρωτεασώματος, η οποία ρυθμίζει την είσοδο των υποστρωμάτων που πρόκειται να αποικοδομηθούν στις υπομονάδες β (Groll and Clausen, 2003; Kunjappu and Hochstrasser, 2014).

Το 19S ρυθμιστικό τμήμα περιέχει 20 υπομονάδες, οι οποίες οργανώνονται σε δύο υποσύμπλοκα που ονομάζονται βάση και κάλυμμα, και συμβάλλει στην αναγνώριση των πρωτεϊνών που έχουν σημανθεί με ουβικιτίνη για αποικοδόμηση, στην απομάκρυνση της ουβικιτίνης (απο-ουβικιτινιλίωση) και στο ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών για την εισαγωγή τους στο 20S καταλυτικό τμήμα. Η βάση αποτελείται από έξι ATPάσες υπομονάδες τύπου AAA (RPT1-6) και τρεις μη-ATPάσες υπομονάδες (RPN1, RPN2 και RPN13), ενώ το κάλυμμα αποτελείται από εννιά μη-ATPάσες υπομονάδες (RPN3, RPN5-9, RPN11, RPN12 και RPN15). Η βάση και το κάλυμμα συνδέονται μέσω της υπομονάδας RPN10, σχηματίζοντας το 19S ρυθμιστικό τμήμα (Glickman et al., 1998). Οι υπομονάδες RPN10 και RPN13 λειτουργούν ως υποδοχείς της ουβικιτίνης (Liu and Jacobson, 2013), η υπομονάδα RPN11 έχει ενεργότητα απο-ουβικιτινιλίωσης (Verma et al., 2002), ενώ η υπομονάδα RPN6 είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση των 19S και 20S συμπλόκων (Pathare et al., 2012).



**Εικόνα 1.2 Μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος:** Η ουβικιτίνη (Ub) συνδέεται με τις πρωτεΐνες-υποστρώματα είτε ως μονομερές είτε με τη μορφή μιας αλυσίδας πολυ-ουβικιτίνης μέσω της E1, E2 και E3 αλληλουχίας. Στη συνέχεια, οι ουβικιτινιλιωμένες πρωτεΐνες αναγνωρίζονται και αποικοδομούνται από το 26S πρωτεάσωμα. Τα ένζυμα της αποουβικιτινιλίωσης (DUBs) αφαιρούν τις αλυσίδες ουβικιτίνης από το υπόστρωμα (Προσαρμογή από Leestemaker and Ovaa, 2017).

### 1.2.3 Μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσσοσώματος

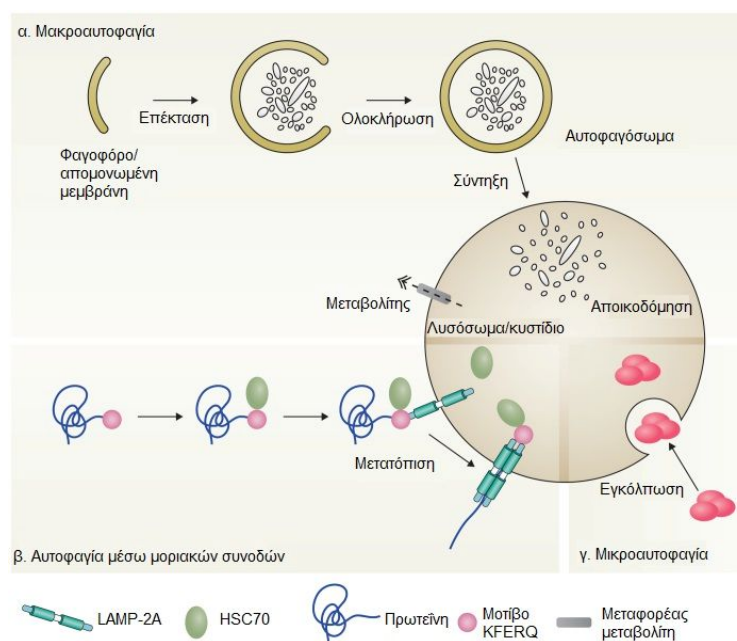
Το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσσοσώματος είναι μια κυτταρική διαδικασία αποικοδόμησης και ανακύκλωσης η οποία είναι εξελικτικά συντηρημένη σε μεγάλο βαθμό σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από το ζυμομύκητα μέχρι τα θηλαστικά. Παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη, καθώς περιορίζει τα ανεπιθύμητα ή άχρηστα κυτταρικά οργανίδια και συστατικά. Πιο συγκεκριμένα, η αυτοφαγία αποικοδομεί πρωτεΐνες μεγάλου χρόνου ζωής, λανθασμένα διπλωμένες πρωτεΐνες, συσσωματώματα πρωτεϊνών και κυτταροπλασματικά οργανίδια, επιτρέποντας την ανακύκλωσή τους και παρέχοντας ενέργεια και πρόδρομα μακρομόρια στο κύτταρο. Επίσης, αποτελεί ένα μηχανισμό απόκρισης των κυττάρων σε διάφορες καταστάσεις στρες, όπως στην έλλειψη θρεπτικών ουσιών, στον κυτταρικό θάνατο, στη γήρανση και σε κάποιους τύπους καρκίνου (Levine and Klionsky, 2004; Reggiori and Klionsky, 2002; Richter-Landsberg and Leyk, 2013).

Τα λυσοσώματα είναι οργανίδια με μονή μεμβράνη και περιέχουν ποικιλία πρωτεολυτικών ενζύμων για την αποικοδόμηση οξειδωμένων, λειτουργικών και μη πρωτεϊνών, αλλά και ενδοκυτταρικών συστατικών, όπως ολόκληρα οργανίδια, λιπίδια και πρωτεϊνικά συσσωματώματα. Η λυσοσωμική κοιλότητα αποτελείται από πενήντα



διαφορετικά πεπτιδικά ένζυμα, τις υδρολάσες. Η πιο μελετημένη κατηγορία υδρολασών είναι οι καθεψίνες, οι οποίες χωρίζονται σε τρεις υποκατηγορίες, τις καθεψίνες κυστεΐνης, τις καθεψίνες ασπαρτικού και τις καθεψίνες σερίνης, ανάλογα με το αμινοξικό κατάλοιπο του ενεργού τους κέντρου και είναι υπεύθυνες για την αποικοδόμηση του φορτίου που παραλαμβάνουν (Kirkegaard and Jäättelä, 2009).

Υπάρχουν τρεις τύποι αυτοφαγίας: η μακροαυτοφαγία, η μικροαυτοφαγία και η αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από μοριακές συνοδούς (Boya et al., 2013) (Εικόνα 1.3). Οι τύποι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον τρόπο με τον οποίο το κυτταροπλασματικό υλικό μεταφέρεται στο λυσόσωμα, ενώ τα στάδια της λυσοσωμικής αποικοδόμησης είναι κοινά (Levine and Klionsky, 2004). Στη μακροαυτοφαγία, το κυτταροπλασματικό υλικό μεταφέρεται στο λυσόσωμα μέσω κυστιδίων διπλής μεμβράνης που ονομάζονται αυτοφαγισώματα, τα οποία συντήκονται με το λυσόσωμα για να ακολουθήσει η αποικοδόμηση (Klionsky and Emr, 2000), ενώ στη μικροαυτοφαγία, μεταφέρεται με απευθείας εγκόλπωση στη μεμβράνη του λυσοσώματος (Li et al., 2012).

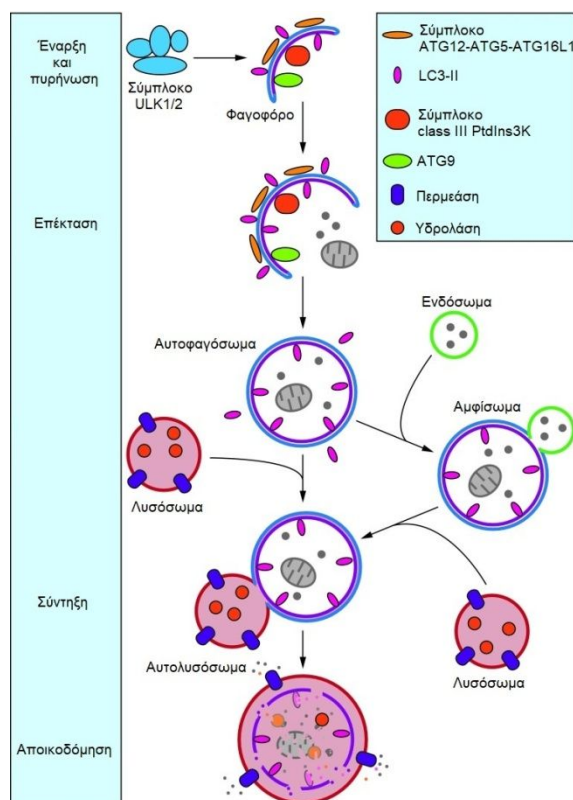


**Εικόνα 1.3 Οι τύποι αυτοφαγίας:** Υπάρχουν τρεις τύποι αυτοφαγίας: (α) η μακροαυτοφαγία, (β) η αυτοφαγία διαμεσολαβούμενη από μοριακές συνοδούς και (γ) η μικροαυτοφαγία. Οι τύποι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον τρόπο με τον οποίο το κυτταροπλασματικό υλικό μεταφέρεται στο λυσόσωμα (Προσαρμογή από Boya et al., 2013).

Η διαμεσολαβούμενη από μοριακούς συνοδούς αυτοφαγία είναι μια μορφή επιλεκτικής αυτοφαγίας, κατά την οποία κυτοσολικές πρωτεΐνες που φέρουν μοτίβα σχετικά με το πενταπεπτίδιο KFERQ, αναγνωρίζονται από τη μοριακή συνοδό HSC70 (Heat Shock Cognate 70) σχηματίζοντας σύμπλοκο. Το σύμπλοκο αυτό μεταφέρεται αρχικά στη μεμβράνη και στη συνέχεια στο εσωτερικό του λυσοσώματος μέσω του υποδοχέα LAMP2A (Arias and Cuervo, 2011). Μεταξύ των τριών τύπων αυτοφαγίας, η μακροαυτοφαγία είναι το κυρίαρχο σηματοδοτικό μονοπάτι που χρησιμοποιούν τα κύτταρα, προκειμένου να απομακρύνουν τα κατεστραμμένα κυτταρικά οργανίδια και μακρομόρια και γι' αυτό ο όρος αυτοφαγία συνήθως υποδηλώνει τη μακροαυτοφαγία (Ravanan et al., 2017).

Η αυτοφαγία πραγματοποιείται με τις εξής φάσεις: την έναρξη και την πυρήνωση, την επέκταση, τη σύντηξη και την αποικοδόμηση (Εικόνα 1.4). Μετά την έναρξη της αυτοφαγίας, πραγματοποιείται η πυρήνωση του κυτταροπλασματικού υλικό που προορίζεται για αποικοδόμηση και η επέκταση μιας διπλής μεμβράνης που ονομάζεται φαγοφόρο, η οποία το περικλείει. Κατά τη σύντηξη των άκρων της, σχηματίζεται ένα κυστίδιο, το αυτοφαγόσωμα. Στη συνέχεια, η εξωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος συντήκεται με τη μεμβράνη του λυσοσώματος δημιουργώντας το αυτολυσόσωμα. Το αυτοφαγόσωμα μπορεί να συντηχθεί επίσης και με ένα ενδόσωμα, σχηματίζοντας το αμφίσωμα πριν τη σύντηξη με το λυσόσωμα. Τέλος, το περιεχόμενο του αυτολυσοσώματος αποικοδομείται από τις υδρολάσες του λυσοσώματος και τα συστατικά του επιστρέφουν στο κυτταρόπλασμα μέσω των λυσοσωμικών περμεασιών για να χρησιμοποιηθούν από το κύτταρο σε βιοσυνθετικές διαδικασίες ή για να παράγουν ενέργεια (Parzych and Klionsky, 2014).

Μεταξύ των κύριων ρυθμιστικών παραγόντων της αυτοφαγίας είναι οι πρωτεΐνες BECLIN-1 και P62. Ειδικότερα, η πρωτεΐνη BECLIN-1 παίζει ρόλο στην πυρήνωση και τη συναρμολόγηση του φαγοφόρου που είναι η πρόδρομη μορφή του αυτοφαγοσώματος (Pattingre et al., 2008). Ενώ, η πρωτεΐνη P62 έχει δράση υποδοχέα της ουβικιτίνης και μεταφέρει πρωτεϊνικά συσσωματώματα και κατεστραμμένα οργανίδια που έχουν ουβικιτινιωθεί για αποικοδόμηση μέσω του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσοσώματος (Katsuragi et al., 2015).



**Εικόνα 1.4 Οι φάσεις της αυτοφαγίας:** Η αυτοφαγία πραγματοποιείται με τις εξής φάσεις: την έναρξη και την πυρήνωση, την επέκταση, τη σύντηξη και την αποικοδόμηση (Προσαρμογή από Parzych and Klionsky, 2014).

### 1.2.4 Μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2/KEAP1

Στην καθημερινότητα μας είμαστε συνεχώς εκτεθειμένοι σε διάφορους χημικούς και φυσικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των φαρμάκων, των περιβαλλοντικών ρύπων, των πρόσθετων στα τρόφιμα, της υπεριώδους και της ιονίζουσας ακτινοβολίας. Οι εξωγενείς στρεσογόνοι παράγοντες σε συνδυασμό με τις φυσιολογικές και παθολογικές κυτταρικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα μιτοχόνδρια, τα υπεροξυσώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Tonelli et al., 2018).

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η παραγωγή των ROS εξισορροπείται από τη δράση των ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών συστημάτων. Ωστόσο, η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής των ROS και των αντιοξειδωτικών αποκρίσεων προκαλεί οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα τα υψηλά επίπεδα των ROS να προκαλούν βλάβες στα κυτταρικά βιομόρια, όπως στις πρωτεΐνες, στα λιπίδια και στο DNA (Betteridge, 2000; Tonelli et al., 2018). Προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα και η λειτουργικότητα του πρωτεώματος υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, έχουν αναπτυχθεί

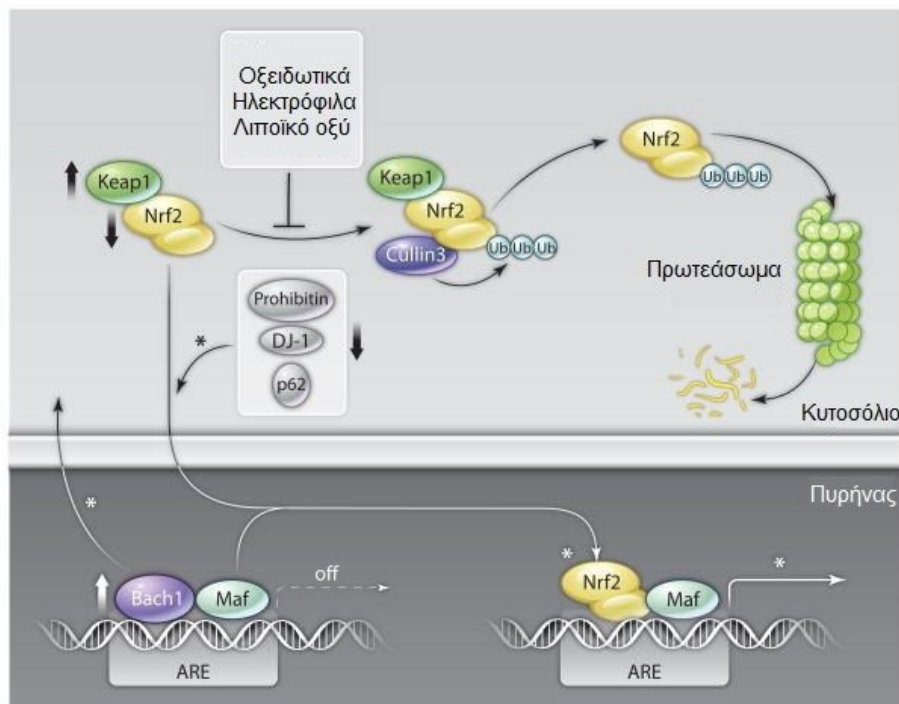
μηχανισμοί αντιοξειδωτικής απόκρισης που δρουν σε κυτταρικό επίπεδο ή σε επίπεδο οργανιδίων (Kourtis and Tavernarakis, 2011).

Ένας μηχανισμός που παίζει κύριο ρόλο στην απόκριση του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι NRF2/KEAP1 (Εικόνα 1.5). Σε φυσιολογικές συνθήκες, η πρωτεΐνη KEAP1 προσδέεται στον μεταγραφικό παράγοντα NRF2 και τον οδηγεί για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα μέσω της ουβικιτινίωσης από τη λιγάση της ουβικιτίνης (CULLIN3). Τα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (Antioxidant Response Elements, AREs) είναι ανενεργά, συνδεδεμένα με διμερή της πρωτεΐνης MAF ή με κατασταλτικούς παράγοντες, όπως ο BACH1.

Σε συνθήκες στρες, οξειδωτικά, ηλεκτρόφιλα και άλλοι στρεσογόνοι παράγοντες εμποδίζουν την αποικοδόμηση του NRF2 και διευκολύνουν την είσοδο του στον πυρήνα. Η ενεργοποίηση του NRF2 προωθείται επίσης από ρυθμιστικά μονοπάτια, όπως των DJ-1 και P62. Τα γονίδια αντιοξειδωτικής απόκρισης μεταγράφονται μέσω της πρόσδεσης του NRF2 και διμερών της πρωτεΐνης MAF στα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης, η οξειδωτική ισορροπία επαναφέρεται και η οξειδωτική βλάβη ελαχιστοποιείται.

Το χρόνιο οξειδωτικό στρες που σχετίζεται με τη γήρανση ή με νευροεκφυλιστικές ασθένειες μειώνει την έκφραση ή τη λειτουργία του θετικού ρυθμιστικού μονοπατιού του NRF2 ή αυξάνει τους αρνητικούς ρυθμιστές του, όπως την KEAP1 και τον BACH1. Επιπλέον, η πρωτεόλυση του NRF2 αυξάνεται, ενώ άλλα βήματα του μονοπατιού μειώνονται, όπως η μεταγραφή των γονιδίων αντιοξειδωτικής απόκρισης (Sykiotis and Bohmann, 2010).

Τα στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (AREs) βρίσκονται στον υποκινητή των γονιδίων-στόχων του NRF2 που κωδικοποιούν μεταξύ άλλων σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η αναγωγάση της θειορεδοξίνης (Thioredoxin reductase 1, TXNRD1), η αφυδρογονάση της NAD(P)H κινόνης [NAD(P)H dehydrogenase (quinone) 1, NQO1], η δισμουτάση του υπεροξειδίου (Superoxide dismutase, SOD), η οξυγενάση 1 της αίμης (Heme oxygenase 1, HO1) και η μεταφοράση της γλουταθειόνης (Glutathione S-transferase, GST) (Jung and Kwak, 2010). Επιπλέον, ο NRF2 ρυθμίζει την έκφραση και άλλων γονιδίων, όπως τα γονίδια των υπομονάδων του 26S πρωτεασώματος, των πρωτεϊνών θερμικού στρες και διάφορων ενζύμων του μεταβολισμού (Kwak et al., 2003; Lee et al., 2003; Thimmulappa et al., 2002).



**Εικόνα 1.5 Μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2/KEAP1:** Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο μεταγραφικός παράγοντας των γονιδίων αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2 οδηγείται για αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα από την πρωτεΐνη KEAP1. Σε συνθήκες στρες, ο NRF2 συμβάλλει στη μεταγραφή των γονιδίων αντιοξειδωτικής απόκρισης και στη μείωση της οξειδωτικής βλάβης. Το χρόνιο οξειδωτικό στρες που σχετίζεται με τη γήρανση ή με νευροεκφυλιστικές ασθένειες, μειώνει την έκφραση ή τη λειτουργία των θετικών ρυθμιστικών μονοπατιών του NRF2 (↓) ή αυξάνει τους αρνητικούς ρυθμιστές του, όπως την KEAP1 και τον BACH1 (↑). Επιπλέον, η πρωτεόλυση του NRF2 αυξάνεται, ενώ άλλα βήματα του μονοπατιού μειώνονται, όπως η μεταγραφή των γονιδίων αντιοξειδωτικής απόκρισης (\*) (Προσαρμογή από Sykiotis and Bohmann, 2010).

### 1.2.5 Δίκτυο μοριακών συνοδών

Οι μοριακές συνοδοί (molecular chaperons) συμβάλλουν και αυτές στη διατήρηση της πρωτεόστασης. Πιο συγκεκριμένα, στο κυτταρικό περιβάλλον πολλές πρωτεΐνες χρειάζονται μοριακές συνοδούς για να διπλωθούν σωστά. Ακόμα και κατά την πρωτεϊνοσύνθεση τους, οι μοριακές συνοδοί τις προστατεύουν από το λανθασμένο δίπλωμα καθώς μεταφράζονται. Επίσης, οι μοριακές συνοδοί ελαχιστοποιούν τη συσσωμάτωση των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του διπλώματος και τις διατηρούν διαλυτές. Συναντώνται ενδοκυτταρικά αλλά και εξωκυτταρικά. Ενδοκυτταρικά βρίσκονται σε όλα τα οργανίδια, συμπεριλαμβανομένων του πυρήνα, του κυτοσολίου, των μιτοχονδρίων και του ενδοπλασματικού δικτύου (Hartl et al., 2011; Niforou et al., 2014).

Υπάρχουν διαφορετικά μέλη που ανήκουν στην οικογένεια των μοριακών συνοδών και σχηματίζουν συνεργικά μονοπάτια και δίκτυα. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs) είναι μέλη αυτής της οικογένειας και συμβάλλουν σε λειτουργίες διατήρησης του πρωτεώματος, όπως στο *de novo* δίπλωμα των πρωτεϊνών, στο δίπλωμα των λανθασμένα διπλωμένων πρωτεϊνών, στη συγκρότηση ολιγομερών, στη μετακίνηση και την πρωτεολυτική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και στη μείωση του σχηματισμού συσσωματωμάτων. Συνήθως, ταξινομούνται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος και διακρίνονται στις μικρού μοριακού βάρους (~10-40 kDa) (small Heat Shock Proteins, sHSPs) (π.χ. HSP27, CLUSTERIN), οι οποίες είναι ATP ανεξάρτητες και στις μεγάλου μοριακού βάρους (π.χ. HSP60, HSP70, HSP90), οι οποίες είναι ATP εξαρτώμενες. Οι ATP εξαρτώμενες αναγνωρίζουν υδρόφοβα αμινοξέα στις μη διπλωμένες πρωτεΐνες και συνεργάζονται με τις ATP ανεξάρτητες για το δίπλωμα τους (Hartl et al., 2011).

Η μεταγραφή των γονιδίων *HSPs* ρυθμίζεται από μια οικογένεια τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων που ονομάζονται HSFs (Heat Shock Factors). Ο HSF1 είναι ο καλύτερα χαρακτηρισμένος παράγοντας της οικογένειας. Εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς και στους κυτταρικούς τύπους και ρυθμίζεται από μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς. Σε φυσιολογικές συνθήκες, ο HSF1 παραμένει ανενεργός ως μονομερές στο κυτταρόπλασμα, καθώς είναι προσδεδεμένος σε διάφορες μοριακές συνοδούς, συμπεριλαμβανομένων των HSP90, HSP70, HSP40 και άλλων. Σε συνθήκες στρες, οι μοριακές συνοδοί που βρίσκονται σε σύμπλοκο με τον HSF1, τον απελευθερώνουν και δεσμεύουν τα μη διπλωμένα πολυπεπτίδια. Στη συνέχεια, ο HSF1 φωσφορυλιώνεται, σχηματίζει τριμερές και μετατοπίζεται στον πυρήνα, προκειμένου να επάγει την έκφραση των μοριακών συνοδών (Anckar and Sistonen, 2011).

### **1.3 Επιδιόρθωση βλαβών γενετικού υλικού**

Προκειμένου να εξασφαλιστεί η υγεία και η μακροζωία, εκτός από την ακεραιότητα του πρωτεώματος, κάθε οργανισμός διατηρεί και την ακεραιότητα του γενετικού του υλικού, παρά τους συνεχόμενους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA του. Για να αντιμετωπίσουν αυτές τις απειλές τα κύτταρα ανέπτυξαν ένα πολύπλοκο σύστημα ανίχνευσης και επιδιόρθωσης των βλαβών στο γενετικό υλικό (DNA Damage Repair, DDR). Στα κύτταρα των θηλαστικών, κύριο ρόλο κατέχει η πρωτεϊνική κινάση ATM, η οποία στρατολογείται και ενεργοποιείται από θραύσεις στη δίκλωνη αλυσίδα του DNA (Double Strand Breaks, DSBs). Η ATM έχει ως υπόστρωμα την ιστόνη H2AX, η οποία όταν φωσφορυλιώνεται στη σερίνη 139 (γH2AX) αποτελεί βιοδείκτη ύπαρξης θραύσης στη δίκλωνη αλυσίδα. Λόγω της τροποποίησης της

ιστόνης, το DNA καθίσταται λιγότερο συμπυκνωμένο επιτρέποντας στα μόρια της επιδιορθωτικής μηχανής να το προσεγγίσουν και με αυτό τον τρόπο να αποκατασταθεί η βλάβη (Jackson and Bartek, 2009).

Επιπλέον, στόχοι της ATM αποτελούν και οι πρωτεϊνικές κινάσες CHK1 και CHK2, οι οποίες μαζί με την ATM δρουν, ώστε να μειώσουν τη δράση των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (Jackson and Bartek, 2009). Οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη P53 και την ενεργοποιούν. Η πρωτεΐνη P53 μπορεί να ενεργοποιήσει την επιδιόρθωση του DNA, αλλά και να σταματήσει την κυτταρική αύξηση σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο στο σημείο G1/S. Όταν η βλάβη είναι μη αναστρέψιμη, επάγει την απόπτωση του κυττάρου (Cheng and Chen, 2010). Επίσης, υπόστρωμα της ATM αποτελεί και η πρωτεΐνη 53BP1, η οποία συμμετέχει στην επιδιόρθωση των θραύσεων δίκλωνης αλυσίδας, αλληλεπιδρώντας με την γH2AX και την P53 (Panier and Boulton, 2014).

#### 1.4 Γήρανση

Η γήρανση αποτελεί μια φυσιολογική, μη αναστρέψιμη διαδικασία που εμφανίζεται σε όλους τους οργανισμούς. Περιλαμβάνει τη μείωση της κυτταρικής λειτουργίας και της αντίστασης στο στρες με την πάροδο του χρόνου, που οδηγεί στην αύξηση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας. Τα γεγονότα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση δυσλειτουργικών βιομορίων, τα οποία διαταράσσουν την κυτταρική ομοιόσταση. Η γήρανση αποτελεί τον κύριο παράγοντα εμφάνισης παθολογιών στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου, του διαβήτη, των καρδιαγγειακών και νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Argyropoulou et al., 2013; López-Otín et al., 2013).

Ο ρυθμός εμφάνισης του γήρατος οφείλεται στη συσσώρευση εξωγενών και ενδογενών στρεσογόνων παραγόντων. Οι εξωγενείς παράγοντες μπορεί να σχετίζονται με το περιβάλλον (π.χ. ακτινοβολίες, ρύποι) ή τον τρόπο ζωής (π.χ. διατροφή, κάπνισμα). Οι ενδογενείς παράγοντες μπορεί να αφορούν σε φλεγμονώδεις καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων της υπερενεργοποίησης των NAD(P)H οξειδασών και/ή της δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων. Τα στρεσογόνα προκαλούν τη συσσώρευση βλαβών σε όλα τα κυτταρικά βιομόρια.

Ωστόσο, οι οργανισμοί διατηρούν χαμηλά επίπεδα των βιομορίων που έχουν υποστεί βλάβη μέσω της δράσης ενός συστήματος ποιοτικού ελέγχου, του δικτύου πρωτεόστασης, το οποίο εξουδετερώνει τα στρεσογόνα, αναγνωρίζει και επιδιορθώνει ή απομακρύνει τα δυσλειτουργικά βιομόρια. Καθώς ο οργανισμός γερνάει, το σύστημα αυτό δυσλειτουργεί, με αποτέλεσμα τη μείωση των σηματοδοτικών και επιδιορθωτικών μονοπατιών και τη συσσώρευση υψηλών επιπέδων στρεσογόνων, τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση του γηρασμένου ιστού και των ασθενειών που σχετίζονται με το γήρας (Tsakiri and Trougakos, 2015).

Έρευνες έχουν δείξει ότι η γήρανση είναι μία παθητική διαδικασία που όμως μπορεί να ρυθμιστεί και πιθανόν να επιβραδυνθεί μέσω καλά καθορισμένων γενετικών και/ή διατροφικών τροποποιήσεων. Μια θεμελιώδης πρόκληση στο πεδίο της γήρανσης είναι η κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται τόσο στην εμφάνιση όσο και στη μεγάλη ετερογένεια αυτής της διαδικασίας. Χρησιμοποιώντας γενετικές, γονιδιωματικές, βιοχημικές και συμπεριφορικές προσεγγίσεις, έχει βρεθεί μια πληθώρα μοριακών και κυτταρικών παραγόντων που μπορούν με άμεσο τρόπο να οδηγήσουν στην εμφάνιση της γήρανσης.

Τα κύρια ορόσημα που συμμετέχουν στη γήρανση σε διαφορετικούς οργανισμούς είναι: (1) η γενωμική αστάθεια, (2) η μείωση του μήκους των τελομερών, (3) οι επιγενετικές τροποποιήσεις, (4) η διατάραξη της πρωτεόστασης, (5) η απορρύθμιση των μονοπατιών ανίχνευσης θρεπτικών συστατικών, (6) η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, (7) η κυτταρική γήρανση, (8) η απώλεια βλαστοκυττάρων και (9) οι αλλαγές στη διακυτταρική επικοινωνία (Εικόνα 1.6). Όλα τα ορόσημα πληρούν τα ακόλουθα κριτήρια: (1) εκδηλώνονται κατά τη διάρκεια της γήρανσης, (2) η πειραματική επιδείνωση τους επιταχύνει τη γήρανση και (3) η πειραματική βελτίωση τους επιβραδύνει τη διαδικασία της γήρανσης και συνεπώς αυξάνει τη διάρκεια ζωής (López-Otín et al., 2013).



**Εικόνα 1.6 Τα ορόσημα της γήρανσης:** Τα ορόσημα που συμμετέχουν στη γήρανση σε διαφορετικούς οργανισμούς είναι: (1) η γενωμική αστάθεια, (2) η μείωση του μήκους των τελομερών, (3) οι επιγενετικές τροποποιήσεις, (4) η διατάραξη της πρωτεόστασης, (5) η απορρύθμιση των μονοπατιών ανίχνευσης θρεπτικών συστατικών, (6) η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, (7) η κυτταρική γήρανση, (8) η απώλεια βλαστοκυττάρων και (9) οι αλλαγές στη διακυτταρική επικοινωνία (Προσαρμογή από López-Otín et al., 2013).



Τα κυριότερα σηματοδοτικά μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ποιότητας ζωής και της μακροβιότητας είναι εκείνα των INS/IGF-1 (insulin/insulin-like growth factor-1), των κινασών TOR (target of rapamycin) και AMPK (AMP-activated kinase), καθώς και των σιρτουινών (Alic and Partridge, 2011; Cohen and Dillin, 2008; Kenyon, 2010). Το μονοπάτι των INS/IGF-1 είναι υπεύθυνο για την ανίχνευση υψηλών επιπέδων γλυκόζης, των TOR για την ανίχνευση υψηλών συγκεντρώσεων αμινοξέων, ενώ το μονοπάτι AMPK και οι σιρτουίνες ρυθμίζονται θετικά σε συνθήκες ενεργειακού ελλείμματος, ανιχνεύοντας υψηλά επίπεδα AMP και NAD<sup>+</sup>, αντίστοιχα (Houtkooper et al., 2010). Η λήψη διατροφής με περιορισμένες θερμίδες ή ο θερμιδικός περιορισμός επάγει την αύξηση της μακροβιότητας και μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης των περισσότερων εξαρτώμενων από την ηλικία ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, ο θερμιδικός περιορισμός μειώνει τα σηματοδοτικά μονοπάτια INS/IGF-1 και TOR και ενεργοποιεί το μονοπάτι AMPK (Mair and Dillin, 2008).

#### **1.4.1 Επίδραση του δικτύου πρωτεόστασης στη γήρανση των οργανισμών**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ένα κύριο ορόσημο της γήρανσης είναι η διατάραξη της πρωτεόστασης, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση δυσλειτουργικών βιομορίων. Προοδευτική απώλεια της πρωτεόστασης παρατηρείται στους περισσότερους οργανισμούς καθώς γερνούν. Ωστόσο, παρεμβάσεις που ρυθμίζουν τη λειτουργία του δικτύου πρωτεόστασης στα ασπόνδυλα και στα θηλαστικά μπορούν να επεκτείνουν τον χρόνο ζωής και την υγεία τους. Πιο συγκεκριμένα, πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών του δικτύου πρωτεόστασης είναι δυνατόν να μειώσει τη νοσηρότητα και να αυξήσει τη μακροβιότητα των οργανισμών (Argyropoulou et al., 2013; Kaushik and Cuervo, 2015).

Όσον αφορά το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, παρατηρείται μειωμένη ενεργότητα του σε κύτταρα θηλαστικών κατά την κυτταρική γήρανση (Chondrogianni et al., 2003), καθώς και κατά την *in vivo* γήρανση στο έντομο *D. melanogaster* (Tsakiri et al., 2013). Επίσης, η μερική αναστολή του σε νεαρούς ανθρώπινους ινοβλάστες (Torres et al., 2006), σε ποντικούς (Tomaru et al., 2012) και στο έντομο *D. melanogaster* (Tsakiri et al., 2013) προκαλεί πρόωμη κυτταρική γήρανση. Από την άλλη πλευρά, μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση της καταλυτικής υπομονάδας β5 του πρωτεασώματος σε ανθρώπινα κύτταρα αύξησε την ενεργότητα του και την ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες, ενώ επίσης καθυστέρησε την εμφάνιση της κυτταρικής γήρανσης (Chondrogianni et al., 2005).

Η αυτοφαγία, το άλλο σημαντικό πρωτεολυτικό μονοπάτι του κυττάρου, επίσης έχει βρεθεί να μειώνεται κατά τη γήρανση, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Morimoto and Cuervo, 2014). Η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας

μέσω της υπερέκφρασης των αυτοφαγικών γονιδίων (ATGs) οδηγεί σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής και της ανθεκτικότητας σε στρεσογόνους παράγοντες σε οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster* (Kaushik and Cuervo, 2015) και των ποντικών (Pyo et al., 2013).

Η διατήρηση της κυτταρικής πρωτεόστασης εξαρτάται και από το μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2/KEAP1, του οποίου η ρύθμιση μειώνεται κατά τη γήρανση (Tsakiri et al., 2013). Σύμφωνα με μια μελέτη σε ανθρώπινους ινοβλάστες, η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 μειώνεται κατά την κυτταρική γήρανση, ενώ η αποσιώπηση του οδηγεί σε πρώιμη κυτταρική γήρανση (Kapeta et al., 2010). Επιπλέον, η ενεργοποίηση του οδηγεί σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε ανθρώπινους ινοβλάστες (Kapeta et al., 2010) και στον σκώληκα *C. elegans* (Papaevgeniou et al., 2016). Ωστόσο, μελέτες σε έντομα *D. melanogaster* έδειξαν ότι τόσο η καταστολή της έκφρασης του NRF2, όσο και η μακροχρόνια ενεργοποίηση του είναι τοξική, οδηγώντας σε σημαντική μείωση της μακροβιότητας (Tsakiri et al., 2013).

Τέλος, η πρόοδος της γήρανση εξαρτάται και από την επίδραση των μοριακών συνοδών. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη γήρανση έχει παρατηρηθεί μειωμένη έκφραση των γονιδίων των μοριακών συνοδών (Calderwood et al., 2009). Σύμφωνα με κάποιες μελέτες, η αποσιώπηση της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα HSF1 οδηγεί σε μείωση του προσδόκιμου ζωής, ενώ η υπερέκφραση του οδηγεί σε μακροβιότητα (Hsu et al., 2003). Παράλληλα, η υπερέκφραση του γονιδίου *HSP22* στους κινητήριους νευρώνες εντόμων *D. melanogaster* καθυστερεί τη γήρανση τους (Morrow et al., 2004).

## 1.5 Καρκίνος

Η εμφάνιση του καρκίνου προκαλείται από τον ανεξέλεγκτο και συνεχή πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, τα οποία δεν ανταποκρίνονται στους μηχανισμούς ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου. Η έλλειψη ελέγχου των μηχανισμών αυτών είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης βλαβών στα ρυθμιστικά συστήματα του κυττάρου με την πάροδο του χρόνου. Για αυτό ο καρκίνος θεωρείται μία από τις σημαντικότερες ηλικιο-εξαρτώμενες ασθένειες. Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να επεκτείνονται στους γύρω ιστούς και να εμφανίζουν μεταστάσεις σε άλλα όργανα με τελική κατάληξη τον θάνατο του οργανισμού (DePinho, 2000; Hanahan and Weinberg, 2000).

Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη σημαντικότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο καρκίνος ήταν υπεύθυνος για 8,8 εκατομμύρια θανάτους το 2015 και ο αριθμός των νέων περιστατικών εκτιμάται ότι θα αυξηθεί κατά περίπου 70% τις επόμενες δύο δεκαετίες (Sklirou et al., 2018).

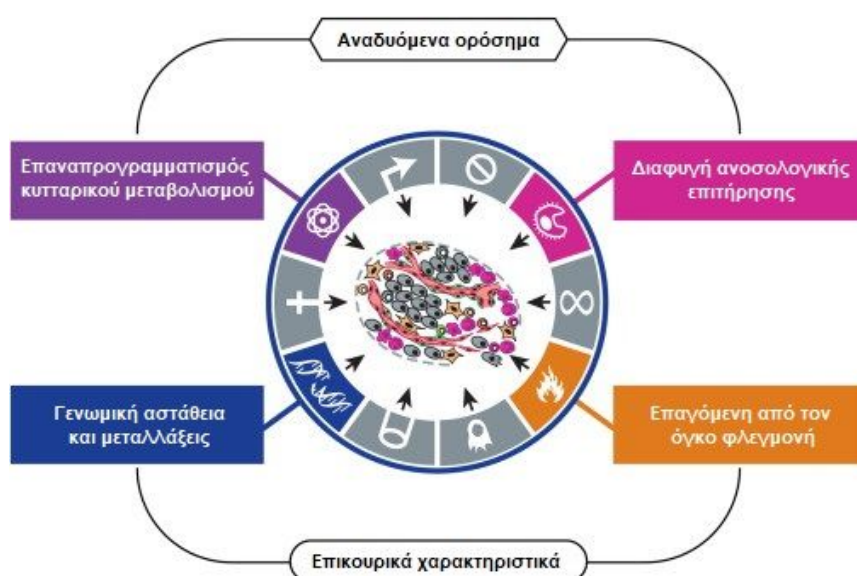
Ο καρκίνος αποτελεί μια πολυσταδιακή και πολυπαραγοντική διαδικασία, γιατί απαιτεί συσσώρευση μεταλλαγών και αλληλεπίδραση πολλών παραγόντων. Στους παράγοντες αυτούς ανήκουν μεταξύ άλλων η γενετική προδιάθεση, η λήψη ορμονών, το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η κακή διατροφή, η έλλειψη σωματικής άσκησης, οι ακτινοβολίες και τα χημικά καρκινογόνα (Wu et al., 2018).

Σύμφωνα με τους Hanahan και Weinberg, όλα τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν κάποια κοινά χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την ανάπτυξη του όγκου και την ικανότητα μετάστασης. Στα χαρακτηριστικά αυτά περιλαμβάνονται: (1) η αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), (2) η αυτο-επάρκεια σε αυξητικούς παράγοντες, (3) η απευαισθητοποίηση σε σήματα αναστολής του πολλαπλασιασμού, (4) η διήθηση ιστών και η μετάσταση, (5) το απεριόριστο πολλαπλασιαστικό δυναμικό και (6) η επαγωγή της αγγειογένεσης (Εικόνα 1.7). Τα χαρακτηριστικά αυτά ονομάστηκαν τα ορόσημα του καρκίνου (Hanahan and Weinberg, 2000).



**Εικόνα 1.7 Τα ορόσημα του καρκίνου:** Τα ορόσημα του καρκίνου είναι: (1) η αποφυγή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση), (2) η αυτο-επάρκεια σε αυξητικούς παράγοντες, (3) η απευαισθητοποίηση σε σήματα αναστολής του πολλαπλασιασμού, (4) η διήθηση ιστών και η μετάσταση, (5) το απεριόριστο πολλαπλασιαστικό δυναμικό και (6) η επαγωγή της αγγειογένεσης (Προσαρμογή από Hanahan and Weinberg, 2000).

Η συσσώρευση ερευνητικών δεδομένων της τελευταίας δεκαετίας οδήγησε στη πρόσθεση δύο επιπλέον χαρακτηριστικών που εμπλέκονται στην παθογένεια του καρκίνου. Τα χαρακτηριστικά αυτά αφορούν (1) στον επαναπρογραμματισμό του κυτταρικού μεταβολισμού και (2) στη διαφυγή της ανοσολογικής επιτήρησης και χαρακτηρίζονται ως αναδυόμενα ορόσημα του καρκίνου. Επιπρόσθετα, προτάθηκαν από τους ίδιους συγγραφείς δύο επακόλουθα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων που συμβάλλουν στην απόκτηση των κεντρικών και των αναδυόμενων ορόσημων. Αυτά ονομάζονται επικουρικά χαρακτηριστικά και περιλαμβάνουν (1) τη γενωμική αστάθεια και τις μεταλλάξεις και (2) την επαγόμενη από τον όγκο φλεγμονή (Hanahan and Weinberg, 2011) (Εικόνα 1.8).



**Εικόνα 1.8 Τα αναδυόμενα ορόσημα και τα επικουρικά χαρακτηριστικά του καρκίνου:** Τα αναδυόμενα ορόσημα αφορούν (1) στον επαναπρογραμματισμό του κυτταρικού μεταβολισμού και (2) στη διαφυγή της ανοσολογικής επιτήρησης. Τα επικουρικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν (1) τη γενωμική αστάθεια και τις μεταλλάξεις και (2) την επαγόμενη από τον όγκο φλεγμονή (Προσαρμογή από Hanahan and Weinberg, 2011).

### 1.5.1 Επίδραση του δικτύου πρωτεόστασης στην καρκινογένεση

Η δυσλειτουργία του δικτύου πρωτεόστασης οδηγεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου (Klaips et al., 2018; Sala et al., 2017). Ειδικότερα, τα τελευταία χρόνια αποδεικνύεται μεταξύ άλλων η άμεση συσχέτιση της εξέλιξης της καρκινογένεσης με τους μηχανισμούς διασφάλισης της ποιότητας του πρωτεώματος των κυττάρων, ανοίγοντας έτσι νέα μονοπάτια στην προσπάθεια αντιμετώπισης του καρκίνου (Sklirou et al., 2018; Trougakos et al., 2013).

Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα ποντικών με καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *NRF2*, ανέδειξε τον καταλυτικό ρόλο του μεταγραφικού αυτού παράγοντα στην πρόληψη του καρκίνου. Ειδικότερα, ποντικοί με αυτό το γενετικό υπόβαθρο, όταν εκτέθηκαν σε διάφορα χημικά καρκινογόνα, παρουσίασαν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου σε σχέση με τους ποντικούς αγρίου τύπου (Becks et al., 2010; Fahey et al., 2002; Khor et al., 2008). Επιπλέον, ποντικοί με καταστολή της έκφρασης του γονιδίου στόχου του *NRF2*, *NQO1* παρουσίασαν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του δέρματος επαγόμενου από χημικά καρκινογόνα (Long et al., 2001). Συνεπώς, το σηματοδοτικό μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης *NRF2/KEAP1* πιθανόν αποτελεί σημαντικό φραγμό της καρκινογένεσης.

Επιπροσθέτως, το μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος θεωρείται τα τελευταία χρόνια στόχος για την ανάπτυξη νέων αντι-καρκινικών θεραπειών. Ως αποτέλεσμα, αρκετοί αναστολείς του πρωτεασώματος βρίσκονται στη φάση των κλινικών δοκιμών, ενώ η αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα των πρωτεασωμικών αναστολέων *Bortezomib* και *Carfilzomib* απέναντι στο πολλαπλό μύελωμα και σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες, παρέχει πλέον την απόδειξη ότι η στόχευση του πρωτεασώματος είναι μια νέα πολλά υποσχόμενη στρατηγική στη θεραπεία του καρκίνου (Dimopoulos et al., 2011; Manasanch and Orłowski, 2017).

Παράλληλα, η συμμετοχή αυτοφαγικών πρωτεϊνών στην εξέλιξη της καρκινογένεσης έχει δειχθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου. Η αυξημένη έκφραση και ενεργότητα των λυσοσωμικών καθεψινών συσχετίζεται με την εξέλιξη του όγκου σε ασθενείς με καρκίνο μαστού (Gabrijelcic et al., 1992), προστάτη (Fernández et al., 2001), παχέος εντέρου (Campo et al., 1994), κεφαλής και τραχήλου (Kos et al., 1995). Τέλος, όσον αφορά στη συμμετοχή των μοριακών συνοδών στην ογκογένεση, έχει βρεθεί πως οι πρωτεΐνες αυτές υπερεκφράζονται σε μια πληθώρα τύπων καρκίνου και συχνά αποτελούν βιοδείκτες κακής πρόγνωσης (Trougakos et al., 2013).

## **1.6 Φυσικά προϊόντα ως ρυθμιστές του δικτύου πρωτεόστασης**

Ένα σύνολο από μικρά μόρια, που ονομάζονται φυσικά προϊόντα (π.χ. ακατέργαστα εκχυλίσματα ή καθαρές ενώσεις), και προέρχονται από διάφορες πηγές (π.χ. φυτά, θαλάσσιοι οργανισμοί ή μικροοργανισμοί), έχει βρεθεί ότι μπορεί να καθυστερήσει την κυτταρική γήρανση σε ανθρώπινα κύτταρα ή την *in vivo* γήρανση σε μοντέλα οργανισμών. Τα φυσικά προϊόντα παρουσιάζουν μια μεγάλη ποικιλομορφία και αποτελούν φαρμακολογικούς ρυθμιστές των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στη γήρανση, όπως των μεταβολικών μονοπατιών του θερμιδικού περιορισμού και των σηματοδοτικών μονοπατιών απόκρισης στο στρες. Επιπλέον,

έχουν βρεθεί φυσικά προϊόντα που ενεργοποιούν τους παράγοντες του δικτύου πρωτεόστασης και κατ' επέκταση φέρουν αντι-γηραντικές ιδιότητες *in vitro* και *in vivo* (Argyropoulou et al., 2013).

Ένα παράδειγμα φυσικού προϊόντος με αντι-γηραντικές ιδιότητες είναι η ραπαμυκίνη, η οποία προέρχεται από το βακτήριο *Streptomyces hygroscopicus* και είναι αναστολέας του μονοπατιού TOR. Σύμφωνα με μελέτες, η ραπαμυκίνη αυξάνει το προσδόκιμο ζωής των ποντικών (Harrison et al., 2009), καθώς και του σκώληκα *C. elegans* μέσω του μεταγραφικού παράγοντα SKN-1/Nrf (Robida-Stubbs et al., 2012). Επίσης, η χορήγηση της σε ενήλικα έντομα *D. melanogaster* είχε ως αποτέλεσμα την επέκταση της διάρκειας ζωής τους, που σχετιζόταν με αυξημένη ανθεκτικότητα στον υποσιτισμό και στο οξειδωτικό στρες (Bjedov et al., 2010).

Η μετορμίνη προέρχεται από το φυτό *Galega officinalis* και αποτελεί το βασικότερο φάρμακο για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 και του μεταβολικού συνδρόμου (Berstein, 2012). Αναστέλλει το μονοπάτι TOR και ενεργοποιεί την κινάση AMPK, με αποτέλεσμα να επάγει την αυτοφαγία (Shi et al., 2012). Μελέτες αναφέρουν ότι η μετορμίνη μπορεί να μειώσει το ρυθμό εμφάνισης της γήρανσης *in vivo* στον σκώληκα *C. elegans* και στα ποντίκια (Anisimov et al., 2011; Cabreiro and Gems, 2013).

Ένα ακόμα παράδειγμα φυσικού προϊόντος είναι η κερσετίνη. Ως ένα φλαβονοειδές που εντοπίζεται σε φρούτα και λαχανικά, είναι ένα φυσικό αντιοξειδωτικό με πιθανή αντι-καρκινική και αντι-γηραντική δράση (Belinha et al., 2007). Επάγει την πρωτεασωματική ενεργότητα, παρέχει προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες, καθυστερεί την κυτταρική γήρανση σε ανθρώπινους ινοβλάστες (Chondrogianni et al., 2010), και αυξάνει τη μακροβιότητα στους οργανισμούς *S. cerevisiae* (Belinha et al., 2007) και *C. elegans* (Kampkötter et al., 2008).

Η ελαιουρωπαΐνη αποτελεί το κύριο πολυφαινόλικό συστατικό των φύλλων, του ελαιόλαδου και των ελιών του δέντρου *Olea europaea* και ενισχύει την πρωτεασωματική ενεργότητα. Μειώνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των ROS και το ποσοστό των οξειδωμένων πρωτεϊνών, αυξάνοντας την αποικοδόμηση μέσω του πρωτεασώματος και διατηρώντας την λειτουργία του πρωτεασώματος κατά την κυτταρική γήρανση σε ανθρώπινους εμβρυονικούς ινοβλάστες (Katsiki et al., 2007).

Η ρεσβερατρόλη ανήκει στις πολυφαινόλες και εντοπίζεται στα σταφύλια, τα μούρα και άλλες φυτικές πηγές και είναι γνωστή για τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες (Mehta et al., 2018). Μελέτες έχουν δείξει ότι επάγει τη δράση των σιρτουινών, αυξάνοντας τη μακροβιότητα στους οργανισμούς *S. cerevisiae*, *C. elegans* και *D. melanogaster* (Baur and Sinclair, 2006). Επίσης, ενισχύει την αυτοφαγία μέσω της ενεργοποίησης της κινάσης AMPK και της αναστολής της κινάσης TOR και ενεργοποιεί τον αντιοξειδωτικό μεταγραφικό παράγοντα NRF2 (Wedel et al., 2018).

Επιπλέον, σημαντικές αντι-γηραντικές ιδιότητες φαίνεται να κατέχει το φυσικό προϊόν κουρκουμίνη, η οποία παράγεται από το φυτό *Curcuma longa*. Μελέτες αναφέρουν ότι η χορήγηση κουρκουμίνης στους οργανισμούς *C. elegans* και *D. melanogaster* αυξάνει το προσδόκιμο ζωής τους (Lee et al., 2010; Liao et al., 2011). Σε μοριακό επίπεδο, η ευεργετική δράση της κουρκουμίνης πιθανόν οφείλεται στην ενεργοποίηση των σιρτουινών και της αντιοξειδωτικής απόκρισης μέσω του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 και της αναστολής του μονοπατιού TOR (Argyropoulou et al., 2013).

Η σπερμιδίνη είναι μια πολυκατιονική πολυαμίνη που εμπλέκεται σε πολλαπλές βιολογικές διεργασίες και είναι γνωστή για την εξαιρετική αντι-γηραντική της δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα, η σπερμιδίνη δρα ως επαγωγέας της αυτοφαγίας *in vivo* και *in vitro*. Αυξάνει τη διάρκεια ζωής των οργανισμών *S. cerevisiae*, *C. elegans* και *D. melanogaster* (Madeo et al., 2010a). Επιπλέον, η σπερμιδίνη μειώνει σημαντικά την οξειδωτική βλάβη σε ποντίκια (Madeo et al., 2010b).

Τέλος, μεταξύ των μορίων που έχουν αναφερθεί ως ενεργοποιητές του NRF2 είναι η σουλφοραφάνη (Houghton et al., 2016) και το προϊόν 3H-1,2-dithiole-3-thione (Pazdro and Burgess, 2012), τα οποία εντοπίζονται στα σταυρανθή λαχανικά, καθώς και το προϊόν 18a-glycyrrhetic acid, που βρίσκεται στο φυτό *Glycyrrhiza glabra* (Kapeta et al., 2010).

## **Σκοπός της παρούσας εργασίας**

Το δίκτυο πρωτεόστασης διατηρεί τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα του πρωτεώματος, προκειμένου να εξασφαλιστεί η υγεία και η μακροζωία του οργανισμού, εξουδετερώνοντας τα στρεσογόνα και αναγνωρίζοντας και επιδιορθώνοντας ή απομακρύνοντας τα δυσλειτουργικά βιομόρια. Καθώς ο οργανισμός γερνάει, το σύστημα αυτό δυσλειτουργεί, με αποτέλεσμα τη μείωση των σηματοδοτικών και επιδιορθωτικών μονοπατιών και την συσσώρευση υψηλών επιπέδων στρεσογόνων, τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση του γηρασμένου ιστού και των ασθενειών που σχετίζονται με το γήρας, όπως ο καρκίνος.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση ορισμένων φυσικών προϊόντων στους μηχανισμούς του δικτύου πρωτεόστασης με σκοπό την εύρεση της πιθανής αντι-γηραντικής ή αντι-καρκινικής τους δράσης. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι δύο κύριοι κυτταρικοί πρωτεολυτικοί μηχανισμοί, δηλαδή τα μονοπάτια ουβικιτίνης-πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσosώματος, η αντιοξειδωτική απόκριση των κυττάρων μέσω του μονοπατιού NRF2/KEAP1, η ρύθμιση του δικτύου των μοριακών συνοδών και η επιδιόρθωση βλαβών στο γενετικό υλικό.



## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Υλικά

#### 2.1.1 Φυσικά προϊόντα

Τα φυσικά προϊόντα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν σε συνέχεια μιας εκτενούς μελέτης της ερευνητικής μας ομάδας με σκοπό την ανίχνευση βιοδραστικών μορίων έναντι της γήρανσης και του καρκίνου. Η ομάδα μας συμμετέχει σε ένα πρόγραμμα ανεύρεσης φυσικών προϊόντων με αντι-γηραντικές ή αντι-καρκινικές ιδιότητες σε κυτταρικά μοντέλα και σε οργανισμούς. Αρχικά, συλλέχθηκαν θαλάσσια ασπόνδυλα (κοράλλια, σπόγγοι, χιτωνοφόρα, εχινόδερμα και θαλάσσιες ανεμώνες) και οι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί τους (μύκητες) από τον Ινδικό Ωκεανό, τις ακτές της Ταϊλάνδης, την Ερυθρά Θάλασσα και την Ανατολική Μεσόγειο. Στη συνέχεια, απομονώθηκαν εκχυλίσματα και βιομόρια από τους οργανισμούς και τους μικροοργανισμούς τους, προκειμένου να βρεθούν οι φαρμακευτικές, καλλυντικές και διατροφικές τους δυνατότητες. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το βιομόριο XML-233-F9-SF10, το οποίο απομονώθηκε από θαλάσσια ασπόνδυλα, και το εκχύλισμα XTMm245-S4 LAE, το οποίο απομονώθηκε από μικροοργανισμούς.

Ακόμα, ως μέρος ενός άλλου προγράμματος, απομονώθηκαν εκχυλίσματα από επτά είδη διαφορετικών φυτών με σκοπό την εύρεση της πιθανής αντι-γηραντικής τους δράσης. Στην παρούσα εργασία, συγκρίθηκαν ως προς την επίδραση τους στο δίκτυο πρωτεόστασης εκχυλίσματα από το φυτό *Sonchus tenerrimus*, τα οποία προέκυψαν με τέσσερις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης, ώστε να διαπιστωθεί ποια μέθοδος είναι η καταλληλότερη. Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο εκχύλισμα απομονώθηκε με τη μέθοδο Ultrasound Assisted Extraction (UAE), η οποία βασίζεται στη χρήση υπερηχητικών κυμάτων, το δεύτερο με τη μέθοδο Supercritical Fluid Extraction (SFE), στην οποία η εκχύλιση πραγματοποιείται με τη χρήση υπερκρίσιμου ρευστού ως διαλύτη, που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι το διοξείδιο του άνθρακα και το τρίτο και το τέταρτο με τη μέθοδο Accelerated Solvent Extraction (ASE), που συνδυάζει αυξανόμενη θερμοκρασία και πίεση χρησιμοποιώντας ως διαλύτη αιθανικό αιθυλεστέρα και αιθανόλη αντίστοιχα.

#### 2.1.2 Κυτταρικές σειρές

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι οι εξής:

- BJ: ανθρώπινοι φυσιολογικοί δερματικοί ινοβλάστες
- HaCaT: ανθρώπινα αθανατοποιημένα κερατινοκύτταρα
- DLD1: κύτταρα ανθρώπινου εντερικού αδενοκαρκινώματος.

### 2.1.3 Υλικά κυτταροκαλλιέργειας

Τα υλικά κυτταροκαλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι: τα θρεπτικά υλικά DMEM (Dulbeco's Minimal Essential Medium) και RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), ο ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS), η L-γλουταμίνη 100x, το διάλυμα μη απαραίτητων αμινοξέων 100x, το διάλυμα τρυψίνης/EDTA 10x, καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 10x (Phosphate Buffered Saline, PBS).

### 2.1.4 Χημικά αντιδραστήρια

Πίνακας 2.1 Χημικά αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρεία	Κωδικός
APS	Research Organics	9530A
ATP	Sigma-Aldrich	A1852
BSA	Sigma-Aldrich	A9418
CH <sub>3</sub> COOH	Sigma-Aldrich	S2BBD1910V
CH <sub>3</sub> COONa	Fluka Analytical	15664850
ClCH <sub>2</sub> COONa	Fluka Analytical	24610
CM-H <sub>2</sub> DCFDA	Invitrogen	C6827
DMSO	Sigma-Aldrich	270431
DTT	Sigma-Aldrich	248531
EDTA	Research Organics	9572E
FastGene Scriptase II	Nippon Genetics Europe	LS64
HCl	Merck	100317
Hepes	Sigma-Aldrich	H0891
HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix	Solis BioDyne	08-36-00001
KCl	Sigma-Aldrich	P9333
LLE (Z-Leu-Leu-Glu-AMC-LLE)	Enzo Life Sciences	BML-ZW9345-0005
LLVY (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC-LLVY)	Enzo Life Sciences	BML-P802-0005
NaCl	Merck	106404
NP-40	Sigma-Aldrich	74385
NucleoZol	Macherey Nagel	740404.200
Pink Prestained Protein	Nippon Genetics Europe	MWP02

Marker		
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bradford)	Bio-Rad Laboratories	5000006
SDS	Serva	20765
TEMED	Merck	1107320100
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma-Aldrich	M2128
Tris	Research Organics	9680T
Trypan Blue	Gibco	15250
Tween-20	Sigma-Aldrich	P1379
Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories	1705061
αιθανόλη	Merck	100974
αναστολείς πρωτεασών	Sigma-Aldrich	I5763
αναστολείς φωσφατασών 1	Sigma-Aldrich	P2850
αναστολείς φωσφατασών 2	Sigma-Aldrich	P5726
β-μερκαπτοαιθανόλη	Merck	15433
γλυκερόλη	SDS	6023516
γλυκίνη	Serva	23390
διάλυμα εμφάνισης	Kodak	146 4593
διάλυμα μονιμοποίησης	Agfa	G382B
ισοπροπανόλη	Sigma-Aldrich	I9516
μεθανόλη	Merck	107018
μπλε της βρωμοφαινόλης	Fluka Analytical	27816
πολυακρυλαμίδιο	Research Organics	9502A
υπεροξειδίο του υδρογόνου	PanReac AppliChem	131077.1209

### 2.1.5 PCR εκκινητές

**Πίνακας 2.2 PCR εκκινητές**

<b>Εκκινητής</b>	<b>Αλληλουχία</b>
<i>BECLIN-1-F</i>	AACCAGATGCGTTATGCCCA
<i>BECLIN-1-R</i>	TCCATTCCACGGGAACACTG
<i>CTSB-F</i>	GCCAACTCCTGGAACACTGA
<i>CTSB-R</i>	GTACTGATCGGTGCGTGGAA
<i>CTSD-F</i>	ACCTTCATCGCAGCCAAGTT

<i>CTSD-R</i>	AGCACGTTGTTGACGGAGAT
<i>CTSL-F</i>	ACAGGGAAGGGAAACACAGC
<i>CTSL-R</i>	TTCACAGGAGTCACGTAGCC
<i>HMBS-F</i>	AAGAGACCATGCAGGCTACCA
<i>HMBS-R</i>	ACAAGTTGGCCAGGCTGATG
<i>NQO1-F</i>	AGCAGACGCCCGAATTCAA
<i>NQO1-R</i>	AGAGGCTGCTTGGAGCAAAA
<i>NRF2-F</i>	CATCCAGTCAGAAACCAGTGG
<i>NRF2-R</i>	GCAGTCATCAAAGTACAAAGCAT
<i>PSMA3-F</i>	GCTGGGTTGGTGAATTAATAATGG
<i>PSMA3-R</i>	GGGCTAAATAGTTACATTGGACTGG
<i>PSMB5-F</i>	TCAAGTTCCGCCATGGAGTC
<i>PSMB5-R</i>	CTTCTTCACCGTCTGGGAGG
<i>PSMB6-F</i>	GACCTGATGGCGGAATCAT
<i>PSMB6-R</i>	CAAAGCGAGAGCATTGGCA
<i>PSMB7-F</i>	CAAGCTGGATTTTCTCCGCC
<i>PSMB7-R</i>	TGATTTTCTCAGTGAGGACTGC
<i>RPN11-F</i>	ACGGAAGCCGAAGCAAATA
<i>RPN11-R</i>	GCAAACCGGCGATGAATCAG
<i>RPN6-F</i>	TCAAACCTCCAAGGCCGAC
<i>RPN6-R</i>	CTCCCCCTGGTCCAAAATCC
<i>SQSTM1-P62-F</i>	CATCGGAGGATCCGAGTGTG
<i>SQSTM1-P62-R</i>	TTCTTTTCCCTCCGTGCTCC
<i>TXNRD1-F</i>	TTGGAGTGCGCTGGATTTCT
<i>TXNRD1-R</i>	TTTGTGGCCATGTCCTGGT

## 2.1.6 Αντισώματα

Πίνακας 2.3 Αντισώματα

Αντίσωμα	Εταιρεία	Κωδικός
20S proteasome $\alpha$ 7	Santa Cruz	sc-100456
20S proteasome $\beta$ 5	Santa Cruz	sc-55009
53BP1	Cell Signaling	4937
BECLIN-1	Santa Cruz	sc-11427

CLUSTERIN	Santa Cruz	sc-6419
donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2020
GAPDH	Santa Cruz	sc-25778
goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2005
goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2004
HSP27	Santa Cruz	sc-13132
HSP70	Santa Cruz	sc-59570
NRF2	Abcam	ab62352
P53	Santa Cruz	sc-47698
P62	Enzo Life Sciences	BML-PW9860
phospho-P53 (Ser15)	Cell Signaling	9286
UBIQUITIN	Cell Signaling	3933
γH2AX	Cell Signaling	9712

## 2.1.7 Όργανα

**Πίνακας 2.4 Όργανα**

<b>Όργανο</b>	<b>Εταιρεία</b>
Δεξαμενή υγρού αζώτου	Statebourne Cryogenics
Επωαστικός κλίβανος	Thermo Fischer Scientific
Θάλαμος νηματικής ροής	Euroclone
Μετρητής απορρόφησης πλακών μικροπιλοδότησης	Tecan Trading AG
Συσκευή PikoReal 96 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific
Συσκευή ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών	PEQLAB Biotechnologie
Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών	Bio-Rad Laboratories
Συσκευή σύνθεσης cDNA (Minicycler PTC-150)	MJ Research
Φασματοφωτόμετρο (BioSpec-nano)	Shimadzu
Φασματοφωτόμετρο (Genova Bio)	Jenway
Φθορισμόμετρο	Bio-Rad Laboratories
Φυγόκεντρος	Biofuge stratus
Ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος	Thermo Fisher scientific

## **2.2 Μέθοδοι**

### **2.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες**

#### **2.2.1.1 Διατήρηση και ανακαλλιέργεια των κυττάρων**

Η κυτταρική σειρά BJ καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM παρουσία 10% (v/v) FBS και 1% (v/v) μη απαραίτητων αμινοξέων. Η κυτταρική σειρά HaCaT καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM παρουσία 10% (v/v) FBS. Η κυτταρική σειρά DLD1 καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό RPMI παρουσία 10% (v/v) FBS. Οι καλλιέργειες όλων των κυτταρικών σειρών αναπτύχθηκαν σε ατμόσφαιρα: CO<sub>2</sub> 5%, υγρασία 95% και θερμοκρασία 37°C σε επωαστικό κλίβανο.

Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται όταν φτάσουν στο 90% κάλυψης του πυθμένα της φιάλης ή του τρυβλίου καλλιέργειας με τη διαδικασία της θρυψινοποίησης. Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό με αναρρόφηση και τα κύτταρα εκπλένονται με διάλυμα PBS, ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ορού που περιέχουν αναστολείς της θρυψίνης. Τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα θρυψίνης 1x (PBS) στους 37°C, έως ότου συρρικνωθούν και στρογγυλοποιηθούν. Το διάλυμα αυτό διασπά τις συνδέσεις των κυττάρων, τόσο μεταξύ τους όσο και με το στερεό τους υπόστρωμα. Η αποκόλληση των κυττάρων γίνεται με ήπια μηχανική ανατάραξη της φιάλης καλλιέργειας και τα κύτταρα επαναιωρούνται σε νέο θρεπτικό υλικό παρουσία ορού με επανειλημμένες ήπιες αναρροφήσεις και μοιράζονται σε νέες φιάλες με κατάλληλο λόγο κατανομής.

#### **2.2.1.2 Απόψυξη και ψύξη των κυτταρικών σειρών**

Τα διάφορα κυτταρικά στελέχη μπορούν να ψυχθούν στους -196°C για μεγάλο χρονικό διάστημα και όταν αποψυχθούν να επανέλθουν στους 37°C, να ανακαλλιεργηθούν και να διατηρήσουν τις ιδιότητες τους. Επίσης, έχουν τη δυνατότητα να συμπληρώσουν τον αριθμό αναδιπλασιασμών του κυτταρικού πληθυσμού που θα συμπλήρωναν, αν δεν μεσολαβούσε η ψύξη-απόψυξη (Hayflick and Moorhead, 1961).

Κατά την ψύξη των κυττάρων χρησιμοποιείται το DMSO (Dimethyl sulfoxide), το οποίο έχει κρυστοπροστατευτικό ρόλο, καθώς μειώνει τη δημιουργία κρυστάλλων, προστατεύοντας τα κύτταρα κατά τις διαδικασίες ψύξης και απόψυξης. Η απόψυξη των κυττάρων, αντίθετα με την ψύξη που γίνεται σταδιακά, πρέπει να είναι ταχεία, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία βλαβών από τους κρυστάλλους που ενδεχομένως σχηματίζονται στα κύτταρα κατά την ψύξη.

Κατά την απόψυξη των προσκολλημένων κυττάρων, το φιαλίδιο με τα κύτταρα τοποθετείται απευθείας από το υγρό άζωτο σε υδατόλουτρο στους 37°C και ακολούθως, το εναιώρημα των κυττάρων προστίθεται σε φιάλη καλλιέργειας που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό. Την επόμενη ημέρα, αφού ολοκληρωθεί η

προσκόλληση των κυττάρων, το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας αντικαθίσταται με νέο, προκειμένου να απομακρυνθεί το DMSO, το οποίο είναι τοξικό για τα κύτταρα.

Κατά την ψύξη πρέπει να εξασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες, ώστε να διασφαλιστεί η μέγιστη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά την απόψυξη τους. Η συλλογή των κυττάρων γίνεται 2-3 ημέρες μετά την ανακαλλιέργεια τους, όταν δηλαδή βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και ο μεταβολισμός τους είναι πιο έντονος. Ειδικότερα, το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε διάλυμα ψύξης, αποτελούμενο από 50% FBS, 40% θρεπτικό υλικό και 10% DMSO, και στη συνέχεια, τα κύτταρα τοποθετούνται σε αποστειρωμένα φιαλίδια πολυπροπυλενίου. Η ψύξη πρέπει να είναι σταδιακή, ώστε τα κύτταρα να προστατευτούν από τις βλαβερές συνέπειες της ψύξης, με 1h στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , 24h στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και τέλος, αποθήκευση σε δεξαμενή υγρού αζώτου στους  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.1.3 Μέτρηση αριθμού κυττάρων για επίστρωση σε τρυβλία καλλιέργειας**

Προκειμένου να επιστρωθούν τα κύτταρα σε τρυβλία καλλιέργειας, καταμετρείται ο συνολικός αριθμός τους σε πλάκα Neubauer. Μετά τη διαδικασία θρυψινοποίησης, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό και φυγοκεντρώνονται για 5 min σε 1.500 rpm. Ακολούθως, απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται σε θρεπτικό υλικό, από το οποίο 10 μl τοποθετούνται στην πλάκα μαζί με 10 μl χρωστικής Trypan Blue, καλύπτοντας τα τέσσερα τεταρτημόρια που διαθέτει, χωρητικότητας  $10^{-4}$  ml το καθένα. Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο μέσος όρος των κυττάρων στα τέσσερα τεταρτημόρια, ο οποίος πολλαπλασιαζόμενος με  $10^4$  προσδιορίζει τη συγκέντρωση των κυττάρων ανά ml.

### **2.2.2 Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη δοκιμασία MTT**

Η δοκιμασία MTT βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών και άρα μεταβολικά ενεργών κυττάρων να ανάγουν το υδατοδιαλυτό άλας του τετραζολίου MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], με αποτέλεσμα την παραγωγή ιωδών κρυστάλλων φορμαζανίου (Denizot and Lang, 1986). Η αναγωγή του τετραζολίου προς το αδιάλυτο φορμαζάνιο προκαλείται από τις μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες των ζωντανών κυττάρων. Οι κρύσταλλοι φορμαζανίου είναι δυνατόν να διαλυτοποιηθούν παρουσία ισοπροπανόλης, DMSO ή άλλων οργανικών διαλυτών και έτσι προκύπτει ένα έγχρωμο προϊόν, του οποίου η απορρόφηση μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά. Η μετρούμενη απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του έγχρωμου προϊόντος και συνεπώς της μεταβολικής ενεργότητας των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση που καταγράφεται σε μήκος κύματος 500-600 nm, τόσο πιο έντονος είναι ο σχηματισμός των κρυστάλλων

τετραζολίου και τόσο μεγαλύτερος ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων. Συνεπώς, με τη δοκιμασία MTT μπορεί να προσδιοριστεί η βιωσιμότητα και ο ρυθμός αύξησης ενός κυτταρικού πληθυσμού, μέσω της μιτοχονδριακής του δραστηριότητας.

Κατά τη δοκιμασία αυτή, αρχικά γίνεται η επίστρωση των κυττάρων με πλήρες θρεπτικό υλικό σε πλάκα μικροπιλοδότησης 96 θέσεων, αφού πρώτα μετρηθεί ο αριθμός τους, για να είναι ίδιος σε κάθε θέση. Όταν τα κύτταρα καλύψουν την επιφάνεια της θέσης, αφαιρείται το αρχικό υλικό και τα κύτταρα επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C με τον παράγοντα επίδρασης στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Την επόμενη μέρα, αφαιρείται το υλικό από τα κύτταρα και προστίθεται σε αυτά MTT, διαλυμένο σε θρεπτικό υλικό απουσία της χρωστικής ερυθρό της φαινόλης, σε συγκέντρωση 1 μg/μl. Όταν σχηματιστούν οι κρύσταλλοι φορμαζανίου, μετά από 3-4 h, αφαιρείται το διάλυμα MTT και προστίθεται ισοπροπανόλη, προκειμένου να διαλυτοποιηθούν οι κρύσταλλοι. Τέλος, εκτιμάται ποσοτικά η συγκέντρωση του έγχρωμου προϊόντος σε μετρητή απορρόφησης πλακών μικροπιλοδότησης σε μήκος κύματος 570 nm. Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, από όλες τις τιμές που έχουν προκύψει για κάθε θέση, αφαιρείται η τιμή από τη μέτρηση της θέσης-τυφλού που περιέχει μόνο τον οργανικό διαλύτη.

### **2.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford**

Η μέθοδος Bradford αποτελεί μια φασματοφωτομετρική διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης ενός πρωτεϊνικού διαλύματος. Βασίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινες συνθήκες απορροφά σε μήκος κύματος 465 nm (κόκκινο χρώμα), όταν είναι μόνη της στο διάλυμα, ενώ σε 595 nm (μπλε χρώμα), όταν είναι προσδεδεμένη σε πρωτεΐνη, λόγω ιοντικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Bradford, 1976).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης ενός άγνωστου δείγματος έγινε βάσει πρότυπης καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο διάλυμα την αλβουμίνη ορού βοός (bovine serum albumin, BSA). Για κάθε δείγμα, σε κάθε σωληνάριο τοποθετούνται 200 μl διαλύματος Bradford 5x, 800 μl dH<sub>2</sub>O και 1 μl δείγματος. Σε κάθε μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο απαιτείται και η δημιουργία ενός δείγματος μάρτυρα (τυφλό), στο οποίο αντί για δείγμα, προστίθεται 1 μl από τον διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένες οι πρωτεΐνες.



#### 2.2.4 Καταγραφή των ενζυμικών πρωτεασωμικών ενεργοτήτων

Για τη μελέτη της ενεργότητας του πρωτεασώματος καταγράφονται οι ενεργότητες της χυμοθρυψίνης της υπομονάδας β5 και της κασπάσης της υπομονάδας β1, με τη χρήση ειδικών φθοροπεπτιδίων. Τα φθοροπεπτίδια αναγνωρίζονται ειδικά από μια πρωτεασωμική υπομονάδα και πρωτεολύονται από αυτή, εκπέμποντας το αντίστοιχο σήμα φθορισμού. Ο μετρούμενος φθορισμός είναι ανάλογος με την ενεργότητα κάθε υπομονάδας του πρωτεασώματος. Συγκεκριμένα, για την ενεργότητα της χυμοθρυψίνης χρησιμοποιήθηκε το φθοροπεπτίδιο Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC-LLVY (LLVY), ενώ για την ενεργότητα της κασπάσης το φθοροπεπτίδιο Z-Leu-Leu-Glu-AMC-LLE (LLE).

Αρχικά, πραγματοποιείται η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων και η επίστρωση τους σε τρυβλία 60mm. Αφού προσκολληθούν, αφαιρείται το αρχικό θρεπτικό υλικό και επωάζονται για το επιθυμητό χρονικό διάστημα με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις του υπό μελέτη παράγοντα επίδρασης διαλυμένου στο πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολούθως, αναρροφάται το υλικό, εκπλένονται τα κύτταρα με PBS, θρυψινοποιούνται, συλλέγονται σε σωλήνα φυγοκέντρησης και φυγοκεντρώνται (5 min, 1.500 rpm). Αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο, τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε PBS και φυγοκεντρώνται (5 min, 1.500 rpm). Στη συνέχεια, αναρροφάται το υπερκείμενο και πραγματοποιείται λύση των κυττάρων με το διάλυμα λύσης 26S [0,2% (v/v) NP-40, 5 mM ATP, 10% (v/v) γλυκερόλη, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6] για 30 min στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση.

Κατόπιν, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση (4°C, 13.300 rpm, 15 min), ώστε να συλλεχθούν οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο υπερκείμενο, οι οποίες ποσοτικοποιούνται με τη μέθοδο Bradford. 20 μg του κάθε δείγματος επωάζονται ξεχωριστά με τα φθοροπεπτίδια LLVY και LLE διαλυμένα στο διάλυμα αντίδρασης (100 mM Hepes buffer pH 7,3) με τελική συγκέντρωση αντίδρασης 50 μM. Το κάθε φθοροπεπτίδιο έχει το δικό του τυφλό δείγμα, το οποίο περιέχει διάλυμα λύσης 26S απουσία πρωτεΐνης. Η επώαση διαρκεί 30 min στους 37°C σε σκοτάδι. Μετά την επώαση, προστίθενται 300 μl κρύου διαλύματος τερματισμού της αντίδρασης (30 mM CH<sub>3</sub>COONa, 70 mM CH<sub>3</sub>COOH, 100 mM ClCH<sub>2</sub>COONa, pH 4,3) και μετράται ο φθορισμός σε φθορισμόμετρο με φίλτρο διέγερσης (360 nm) και φίλτρο εκπομπής (440 nm).

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

Για την καταγραφή της ενεργότητας των καθεψινών, αρχικά, πραγματοποιείται η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων και η επίστρωση τους σε τρυβλία 60mm. Αφού προσκολληθούν, αφαιρείται το αρχικό θρεπτικό υλικό και επωάζονται για το επιθυμητό χρονικό διάστημα με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις του υπό μελέτη παράγοντα επίδρασης διαλυμένου στο πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολούθως, αναρροφάται το υλικό, εκπλένονται τα κύτταρα με PBS, θρυψινοποιούνται, συλλέγονται σε σωλήνα φυγοκέντρησης και φυγοκεντρώνται (5 min, 1.500 rpm). Αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο, τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε PBS και φυγοκεντρώνται (5 min, 1.500 rpm). Στη συνέχεια, αναρροφάται το υπερκείμενο και προστίθεται στο ίζημα διάλυμα λύσης λυσοσωμάτων (1 mM DTT, 50 mM Tris-HCl pH 4,0).

Προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη λύση, το λύμα παραμένει στον πάγο για 10 min, ανακινείται και εμβαπτίζεται σε υγρό άζωτο. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για άλλες δύο φορές. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (4°C, 13.300 rpm, 10 min), συλλογή υπερκειμένου και ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Έπειτα, 20 μg του κάθε δείγματος επωάζονται με ειδικό φθοροπεπτιδίο σε διάλυμα ενεργότητας λυσοσώματος (50 mM CH<sub>3</sub>COONa, 8 mM L-Cysteine Hydrochloride, 1 mM EDTA pH 4,0) για 50 min στους 37°C σε σκοτάδι. Τέλος, στο κάθε δείγμα προστίθεται 1 ml dH<sub>2</sub>O και μετράται ο φθορισμός σε φθορισμόμετρο με φίλτρο διέγερσης (360 nm) και φίλτρο εκπομπής (440 nm). Απαιτείται και η μέτρηση ενός τυφλού δείγματος, το οποίο περιέχει διάλυμα λύσης απουσία πρωτεΐνης.

### **2.2.6 Μέτρηση των επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου**

Για τη μέτρηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), αρχικά, πραγματοποιείται η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων και η επίστρωση τους σε τρυβλία 60mm. Αφού προσκολληθούν, αφαιρείται το αρχικό θρεπτικό υλικό και επωάζονται για το επιθυμητό χρονικό διάστημα με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις του υπό μελέτη παράγοντα επίδρασης διαλυμένου στο πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολούθως, αναρροφάται το υλικό, εκπλένονται τα κύτταρα με PBS, θρυψινοποιούνται, συλλέγονται σε σωλήνα φυγοκέντρησης και φυγοκεντρώνται (5 min, 1.500 rpm). Αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο, τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε PBS και φυγοκεντρώνται (5 min, 1.500 rpm). Στη συνέχεια, αναρροφάται το υπερκείμενο και προστίθεται ο ειδικός ιχνηθέτης CM-H<sub>2</sub>DCFDA που φθορίζει παρουσία ROS σε συγκέντρωση 10 μM (PBS). Πραγματοποιείται καλή ανάδευση και επώαση για 30 min στους 37°C σε σκοτάδι.

Μετά την επώαση, τα δείγματα φυγοκεντρώνται (5 min, 1.500 rpm), αφαιρείται η χρωστική στο υπερκείμενο και ακολουθεί επώαση για 15 min με PBS. Τα δείγματα

εκπλένονται δύο φορές με PBS και ομογενοποιούνται με διάλυμα λύσης [150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 50 mM Tris pH 8,0]. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (4°C, 13.300 rpm, 15 min), συλλογή υπερκείμενου και ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τέλος, προστίθεται dH<sub>2</sub>O και μετράται ο φθορισμός σε φθορισμόμετρο με φίλτρο διέγερσης (490 nm) και φίλτρο εκπομπής (520 nm). Απαιτείται και η μέτρηση ενός τυφλού δείγματος, το οποίο περιέχει διάλυμα λύσης απουσία πρωτεΐνης.

## **2.2.7 Μελέτη της γονιδιακής έκφρασης**

### **2.2.7.1 Απομόνωση ολικού RNA**

Για την απομόνωση ολικού RNA, αρχικά, πραγματοποιείται η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων και η επίστρωση τους σε τρυβλία 100mm. Αφού προσκολληθούν, αφαιρείται το αρχικό θρεπτικό υλικό και επωάζονται για το επιθυμητό χρονικό διάστημα με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις του υπό μελέτη παράγοντα επίδρασης διαλυμένου στο πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολούθως, αναρροφάται το υλικό και προστίθεται 1 ml NucleoZol, το οποίο λύει τα κύτταρα. Το λύμα αναμιγνύεται με 400 μl dH<sub>2</sub>O και παραμένει για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση (4°C, 12.000 g, 15 min). Αποτέλεσμα της φυγοκέντρησης είναι ο διαχωρισμός των συστατικών του φιαλιδίου φυγοκέντρησης σε τρία στρώματα. Το πάνω στρώμα, που αποτελείται από το ολικό RNA, συλλέγεται σε νέο φιαλίδιο φυγοκέντρησης, αναμιγνύεται με 500 μl 100% ισοπροπανόλης και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.

Στη συνέχεια, φυγοκεντρείται (4°C, 12.000 g, 10 min), οπότε το RNA καθιζάνει ως ίζημα, αφαιρείται το υπερκείμενο, το RNA επαναδιαλυτοποιείται σε 500 μl αιθανόλης 75% και φυγοκεντρείται (4°C, 8.000 g, 3 min). Αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και επαναδιαλυτοποιείται σε όγκο dH<sub>2</sub>O ανάλογο της ποσότητας του RNA. Για την ποσοτικοποίηση του RNA, λαμβάνει χώρα φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 260 και 280 nm, έτσι ώστε να προσδιορισθεί τόσο η συγκέντρωση του όσο και η καθαρότητα του. Το διαλυμένο στο dH<sub>2</sub>O RNA φυλάσσεται στους -80°C.

### **2.2.7.2 Σύνθεση cDNA**

Για μια αντίδραση σύνθεσης cDNA τελικού όγκου 10 μl αναμειγνύονται σε φιαλίδιο 2 μl του μίγματος αντίδρασης 5x FastGene Scriptase II-Ready Mix, όγκος RNA που αντιστοιχεί σε 1 μg και dH<sub>2</sub>O. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή (Minicycler PTC-150). Τα βήματα της σύνθεσης περιλαμβάνουν την επιμήκυνση των εκκινητών για 10 min στους 25°C, τον πολυμερισμό του DNA για 60 min στους 42°C και

την απενεργοποίηση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση για 5 min στους 85°C. Τέλος, το cDNA αραιώνεται με dH<sub>2</sub>O σε αναλογία 1:5 και φυλάσσεται στους -20°C.

### **2.2.7.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time-Polymerase Chain Reaction, Real Time-PCR)**

Για μια αντίδραση PCR τελικού όγκου 10 μl αναμειγνύονται σε κάθε θέση μιας πλάκας 96 θέσεων 2 μl μίγματος αντίδρασης 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix, 1,5 μl πρόσθιου (forward) εκκινήτη (0,3μM), 1,5 μl ανάστροφου (reverse) εκκινήτη (0,3 μM), 4 μl dH<sub>2</sub>O και 1 μl cDNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε συσκευή PikoReal 96 Real-Time PCR System και περιλαμβάνει την αρχική αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 10 min, την αποδιάταξη στους 95°C για 15 sec, την υβριδοποίηση των εκκινήτων στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στους 60°C για 30 sec, την επιμήκυνση των κλώνων στους 72 °C για 30 sec και τη λήξη της αντίδρασης στους 20°C για 10 sec. Τα στάδια της αποδιάταξης, της υβριδοποίησης και της επιμήκυνσης πραγματοποιούνται σε 40 κύκλους.

### **2.2.8 Μελέτη της πρωτεϊνικής έκφρασης με ανοσοαποτύπωμα Western**

Το ανοσοαποτύπωμα Western χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Αρχικά, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του δείγματος με ηλεκτροφόρηση και κατόπιν η μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, η οποία επωάζεται με ειδικά αντισώματα. Το πρωτογενές αντίσωμα είναι ειδικό για την υπό μελέτη πρωτεΐνη, ενώ το δευτερογενές είναι ειδικό για το είδος του ξενιστή του πρωτογενούς αντισώματος και είναι συζευγμένο με έναν ιχνηθέτη. Ο ιχνηθέτης αυτός μετά από αντίδραση με ειδικό υπόστρωμα, οδηγεί σε ανίχνευση της υπό μελέτη πρωτεΐνης με χρώση, ραδιενέργεια ή χημειοφωταύγεια.

#### **2.2.8.1 Απομόνωση ολικής πρωτεΐνης**

Το πρώτο βήμα για τη διεξαγωγή του ανοσοαποτυπώματος Western είναι η απομόνωση της ολικής πρωτεΐνης των κυττάρων. Αρχικά, πραγματοποιείται η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων και η επίστρωση τους σε τρυβλία 60mm. Αφού προσκολληθούν, αφαιρείται το αρχικό θρεπτικό υλικό και επωάζονται για το επιθυμητό χρονικό διάστημα με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις του υπό μελέτη παράγοντα επίδρασης διαλυμένου στο πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολούθως, αναρροφάται το υλικό, εκπλένονται τα κύτταρα με PBS, θρυψινοποιούνται, συλλέγονται σε σωλήνα φυγοκέντρησης και φυγοκεντρούνται (5 min, 1.500 rpm). Αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο, τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε PBS και φυγοκεντρούνται (5 min, 1.500 rpm). Στη συνέχεια, αναρροφάται το υπερκείμενο και πραγματοποιείται λύση των

κυττάρων με το διάλυμα λύσης [150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 50 mM Tris pH 8,0], στο οποίο έχουν προστεθεί αναστολείς φωσφατασών και πρωτεασών. Για να επιτευχθεί καλύτερη λύση των κυττάρων αφήνονται για 30 min στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση και ακολούθως φυγοκεντρώνται (4°C, 13.300 rpm, 20 min). Συλλέγεται το υπερκείμενο, στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες διαχωρισμένες από τα υπόλοιπα κυτταρικά υπολείμματα και συστατικά. Τέλος, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του υπερκειμένου ποσοτικοποιείται με τη μέθοδο Bradford και φυλάσσεται στους -80°C.

### **2.2.8.2 Προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων και ηλεκτροφόρηση**

Το επόμενο βήμα της διαδικασίας είναι η προετοιμασία των πρωτεϊνικών δειγμάτων και ο διαχωρισμός τους με ηλεκτροφόρηση σε ομοιογενές πήκτωμα ακρυλαμίδης (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, SDS - PAGE). Η βασική αρχή της ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνικών δειγμάτων είναι ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν με βάση το μέγεθος τους, εάν εξαιτίας ενός ηλεκτρικού πεδίου αναγκασθούν να κινηθούν διαμέσου ενός πηκτώματος. Επομένως, τα δείγματα αναμειγνύονται σε αναλογία 1:1 με διάλυμα Laemmli 2x [125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% (v/v) SDS, 20% (v/v) γλυκερόλη, 10% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 0,597 mM μπλέ της βρωμοφαινόλης]. Παρουσία του ισχυρού απορρυπαντικού δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS) και της αναγωγικής β-μερκαπτοαιθανόλης, η οποία ανάγει δισουλφιδικούς δεσμούς, οι πρωτεΐνες χάνουν όλες τις ανώτερες δομές τους παραμένοντας μόνο με την πρωτοταγή. Προκειμένου να επαχθεί περαιτέρω η αποδιάταξη των πρωτεϊνών, τα δείγματα, αφού αναμειχθούν με το διάλυμα Laemmli, θερμαίνονται στους 95°C για 5 min.

Στη συνέχεια, παρασκευάζονται τα πηκτώματα επιστοίβαξης [126 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% (w/v) πολυακρυλαμιδίου, 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,1% (v/v) TEMED] και διαχωρισμού [375 mM Tris-HCl pH 8,8, 6-15% (w/v) πολυακρυλαμιδίου (ανάλογα με το μοριακό βάρος της υπό ανίχνευση πρωτεΐνης), 0,1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) APS, 0,04% (v/v) TEMED]]. Τα δείγματα τοποθετούνται σε εσοχές/πηγαδάκια του πηκτώματος επιστοίβαξης, έτσι ώστε σε κάθε πηγαδάκι να υπάρχουν 30 μg πρωτεΐνης. Επίσης, σε μία από τις θέσεις αυτές προστίθενται πρωτεϊνικοί δείκτες γνωστών μοριακών βαρών. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή τάση 120 Volt για περίπου 2 h σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης [25 mM Tris-HCl, 192 mM γλυκίνη, 0,1% (w/v) SDS]. Το SDS καλύπτει ομοίμορφα τις πρωτεΐνες προσδίδοντάς τους αρνητικό φορτίο. Συνεπώς, οι πρωτεΐνες εντός του ηλεκτρικού πεδίου κινούνται διαμέσου του πηκτώματος από τον αρνητικό (κάθοδος) προς το θετικό πόλο (άνοδος).

### 2.2.8.3 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Αφού ολοκληρωθεί η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες που ηλεκτροφορήθηκαν μεταφέρονται από το πήκτωμα ακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, με μέγεθος πόρου 0,45  $\mu\text{m}$ , σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών, υπό σταθερή ένταση ρεύματος 360 A για 2,5 h σε διάλυμα μεταφοράς [50 mM Tris-HCl, 40 mM γλυκίνη, 20% (v/v) μεθανόλη]. Εντός του ηλεκτρικού πεδίου, οι αρνητικά φορτισμένες λόγω του SDS πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήκτωμα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κινούμενες από τον αρνητικό (μαύρο) προς το θετικό (κόκκινο) πόλο.

### 2.2.8.4 Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών

Προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων, αρχικά, η μεμβράνη εμβαπτίζεται για 1 h υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου με διάλυμα κάλυψης [5% γάλα σε TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween-20)]. Κατόπιν, η μεμβράνη επώαζεται με το πρωτογενές αντίσωμα για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντίσωμα είναι διαλυμένο στο διάλυμα κάλυψης στη συγκέντρωση που προτείνεται από τον κατασκευαστή. Μετά την επώαση, πραγματοποιούνται τρεις εκπλύσεις των 10 min της μεμβράνης με διάλυμα TBS-T, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος. Έπειτα, ακολουθεί επώαση της μεμβράνης για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου με το δευτερογενές αντίσωμα, το οποίο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης του ραπανιού και είναι διαλυμένο σε διάλυμα TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl). Μετά την επώαση, πραγματοποιούνται τρεις εκπλύσεις των 10 min της μεμβράνης με διάλυμα TBS-T, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος.

Στη συνέχεια, προστίθεται στη μεμβράνη το διάλυμα Western ECL Substrate, το οποίο περιέχει δύο αντιδραστήρια: το A και το B. Συγκεκριμένα, το A αντιδραστήριο περιέχει υπεροξειδίο του υδρογόνου (υπόστρωμα για το ένζυμο υπεροξειδάση του ραπανιού) και το B περιέχει λουμινόλη και έναν ενισχυτή χημειοφωταύγειας. Τα δύο αντιδραστήρια αναμειγνύονται σε ίσους όγκους και απλώνονται στην επιφάνεια της μεμβράνης για 5 min. Η μεμβράνη στεγνώνεται ελαφρώς από το ECL και τοποθετείται σε ειδική κασετίνα καλυμμένη με μια λεπτή διαφανή μεμβράνη. Τέλος, πραγματοποιείται άμεση έκθεση της μεμβράνης σε φιλμ ακτινών X σε σκοτεινό θάλαμο. Η εμφάνιση του φιλμ γίνεται με μεταφορά του σε διάλυμα εμφάνισης (developer) και η μονιμοποίηση του σε διάλυμα μονιμοποίησης (fixer).

#### **2.2.8.5 Αποδέσμευση των αντισωμάτων από τη μεμβράνη**

Για τη διαδικασία της αποδέσμευσης των αντισωμάτων, η μεμβράνη αρχικά εκπλένεται με διάλυμα TBS-T και στη συνέχεια, επωάζεται με το διάλυμα αποδέσμευσης των αντισωμάτων [62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% (v/v) SDS, 100 mM β-μερκαπτοαιθανόλη] για 30 min στους 60°C. Μετά την επώαση, πραγματοποιούνται τρεις εκπλύσεις των 10 min της μεμβράνης με διάλυμα TBS-T, ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα αποδέσμευσης. Ακολουθεί η διαδικασία της ανοσοεντόπισης.

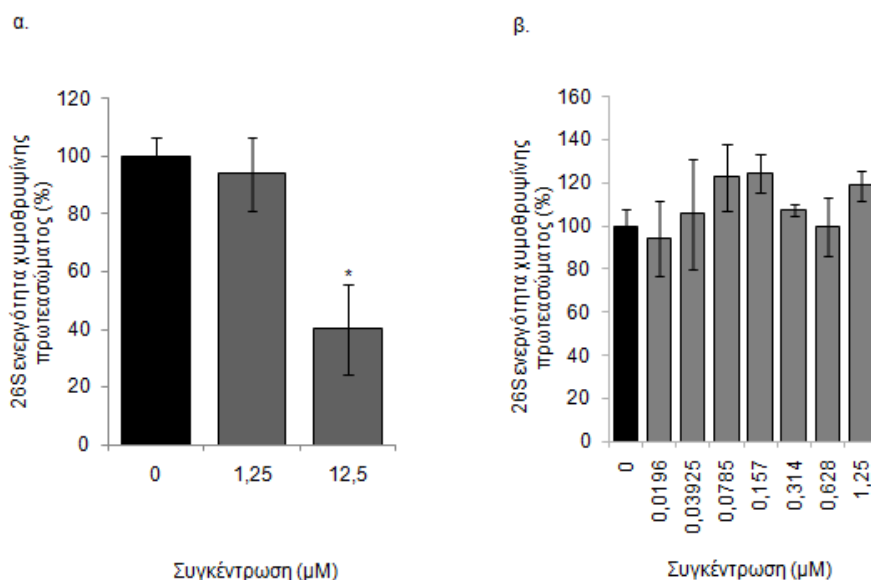
### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XML-233-F9-SF10 στο δίκτυο πρωτεόστασης

Στο πρώτο τμήμα της παρούσας εργασίας ερευνήθηκε η εμπλοκή του βιομορίου XML-233-F9-SF10 στο δίκτυο πρωτεόστασης και πιο συγκεκριμένα στο μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος.

##### 3.1.1 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XML-233-F9-SF10 στο μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του βιομορίου XML-233-F9-SF10 στο μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος. Για το σκοπό αυτό, εξετάστηκε η αλλαγή στην ενεργότητα χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος σε κύτταρα ανθρώπινου εντερικού αδενοκαρκινώματος (DLD1), τα οποία παρουσιάζουν ενδογενώς υψηλά επίπεδα πρωτεασωμικής λειτουργίας. Τα κύτταρα επωάστηκαν με το μόριο για 24 h σε συγκεντρώσεις 1,25 και 12,5  $\mu\text{M}$ . Μέσω της διαδικασίας καταγραφής της ενεργότητας χυμοθρυψίνης του πρωτεασώματος, βρέθηκε μείωση της στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 12,5  $\mu\text{M}$ , σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (Εικόνα 3.1α).



**Εικόνα 3.1** (α) Μέτρηση ενζυμικής πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε κύτταρα DLD1, έπειτα από χορήγηση 1,25 και 12,5  $\mu\text{M}$  του βιομορίου XML-233-F9-SF10 και (β) μέτρηση ενζυμικής πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε απομονωμένα πρωτεασώματα κυττάρων DLD1, έπειτα από χορήγηση διαδοχικών αραιώσεων, 0,0196, 0,03925, 0,0785, 0,1757, 0,314, 0,628 και 1,25  $\mu\text{M}$  του βιομορίου XML-233-F9-SF10. Ως κύτταρα μάρτυρες



χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, τα οποία επωάστηκαν με τον διαλύτη του μορίου, DMSO, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του (\*  $P < 0,05$ ).

Αφού παρατηρήθηκε αλλαγή στην ενεργότητα του πρωτεασώματος ύστερα από την επώαση με το υπό εξέταση μόριο, στη συνέχεια ερευνήθηκε αν αυτό το μόριο καταστέλλει το πρωτεάσωμα άμεσα, με το να συνδέεται απευθείας σε αυτό, ή έμμεσα, με το να δρα σε κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι, το οποίο επιδρά στη λειτουργία του πρωτεασώματος, όπως για παράδειγμα στο μονοπάτι NRF2/KEAP1. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων DLD1 και απομόνωση των πρωτεασωμάτων, τα οποία επωάστηκαν με το μόριο σε διαδοχικές αραιώσεις, 0,0196, 0,03925, 0,0785, 0,157, 0,314, 0,628 και 1,25  $\mu\text{M}$ . Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν σημαντική διαφορά στην ενεργότητα της χυμοθρυψίνης, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (Εικόνα 3.1β).

### **3.2 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XTmm245-S4 LAE στο δίκτυο πρωτεόστασης**

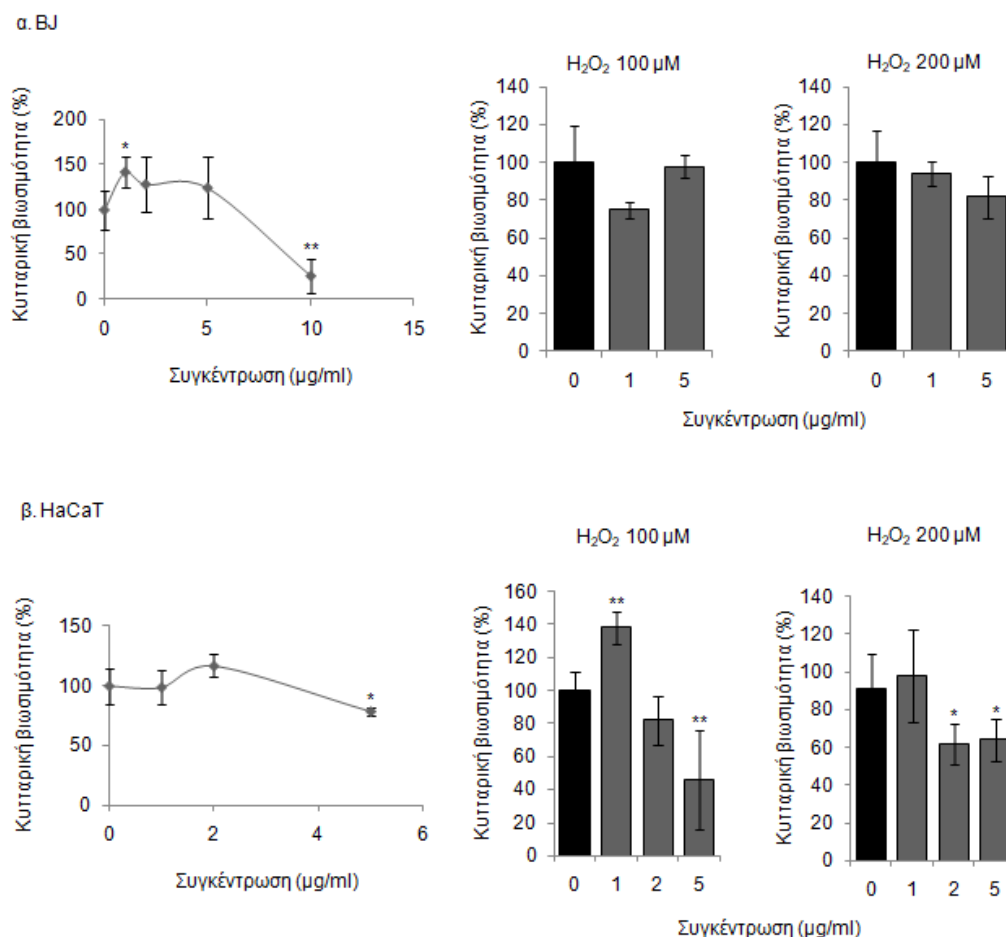
Στη συνέχεια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος XTmm245-S4 LAE στο πρωτεοστατικό δίκτυο και οι πιθανές αντι-γηραντικές του ιδιότητες.

#### **3.2.1 Μελέτη τοξικότητας του φυσικού προϊόντος XTmm245-S4 LAE**

Αρχικά, για να επιλεγεί η κατάλληλη συγκέντρωση του εκχυλίσματος XTmm245-S4 LAE εξετάστηκε η επίδραση του στη βιωσιμότητα φυσιολογικών δερματικών ινοβλαστών (BJ) και αθανатоποιημένων κερατινοκυττάρων (HaCaT). Τα κύτταρα επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος για 24 h μέχρι τη συγκέντρωση 10  $\mu\text{g/ml}$ . Ακολούθησε δοκιμασία MTT και μέτρηση της απορρόφησης. Το εκχύλισμα δεν παρουσίασε σημαντική κυτταροτοξική δράση μέχρι τη συγκέντρωση 5  $\mu\text{g/ml}$  και για τις δύο κυτταρικές σειρές, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (Εικόνα 3.2).

Σε επόμενο στάδιο, εξετάστηκε η επίδραση του εκχυλίσματος στη βιωσιμότητα των κυττάρων ύστερα από συγχορήγηση με τον οξειδωτικό παράγοντα, υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), με σκοπό να ελεγχθεί η πιθανή προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες και κατά συνέπεια η αντι-γηραντική του ικανότητα. Τα κύτταρα επωάστηκαν με μη τοξικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος για 24 h μέχρι τη συγκέντρωση 5  $\mu\text{g/ml}$ , και με  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε συγκεντρώσεις 100 και 200  $\mu\text{M}$ , οι οποίες επίσης δεν προκαλούσαν σημαντικό κυτταρικό θάνατο. Η συγχορήγηση των δύο ουσιών δεν προκάλεσε αλλαγές στη βιωσιμότητα για τα κύτταρα BJ, ενώ για τα κύτταρα HaCaT παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας στη μικρότερη

χορηγούμενη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε συνδυασμό με τη συγκέντρωση 100μM του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, σε αντίθεση με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος, οι οποίες βρέθηκε να είναι τοξικές, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (Εικόνα 3.2).



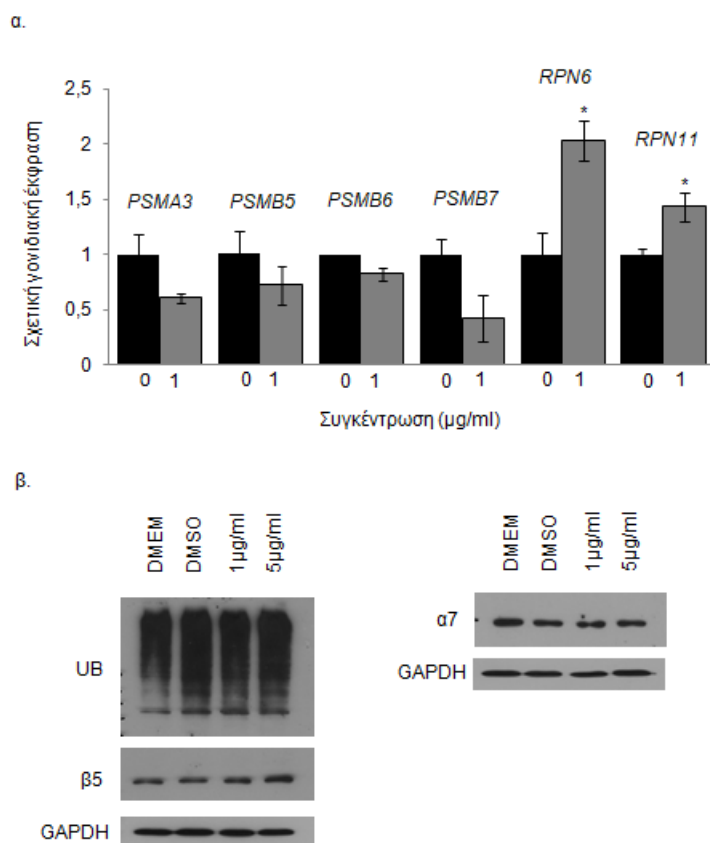
**Εικόνα 3.2** Μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων (α) BJ και (β) HaCaT, έπειτα από χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος XTmm245-S4 LAE και σε συνδυασμό με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε συγκεντρώσεις 100 και 200 μM. Ως κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία επωάστηκαν με τον διαλύτη του μορίου, DMSO, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του, στην πρώτη περίπτωση και με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στη δεύτερη περίπτωση (\* P<0,05, \*\* P<0,01).

### 3.2.2 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XTmm245-S4 LAE στο μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος

Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος XTmm245-S4 LAE στο μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, εξετάζοντας τη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση των πρωτεασωμικών υπομονάδων και τα επίπεδα των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών. Για τη μέτρηση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης των πρωτεασωμικών

υπομονάδων κύτταρα BJ επωάστηκαν με το εκχύλισμα για 24 h σε συγκέντρωση 1 μg/ml. Παρατηρήθηκε μία τάση για μείωση της έκφρασης των γονιδίων του 20S πρωτεασώματος, *PSMA3*, *PSMB5*, *PSMB6* και *PSMB7*, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική, ενώ όσον αφορά τα γονίδια του 19S πρωτεασώματος, *RPN6* και *RPN11*, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης τους, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (Εικόνα 3.3α).

Για τη μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων και των επιπέδων των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών, κύτταρα HaCaT επωάστηκαν με το εκχύλισμα για 24 h σε συγκεντρώσεις 1 και 5 μg/ml. Παρατηρήθηκε αύξηση της υπομονάδας του πρωτεασώματος β5 στη μεγαλύτερη συγκέντρωση 5 μg/ml του εκχυλίσματος, ενώ δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της έκφρασης της υπομονάδας α7, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στα επίπεδα των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών (UB) (Εικόνα 3.3β).

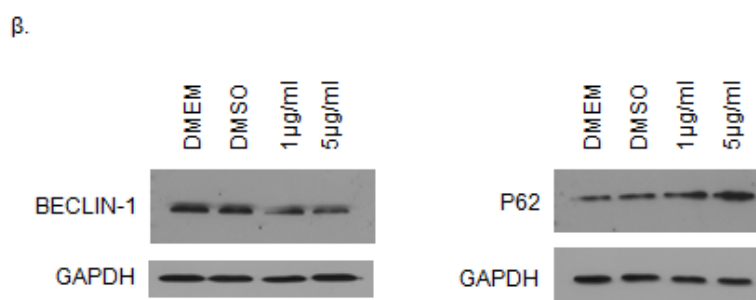
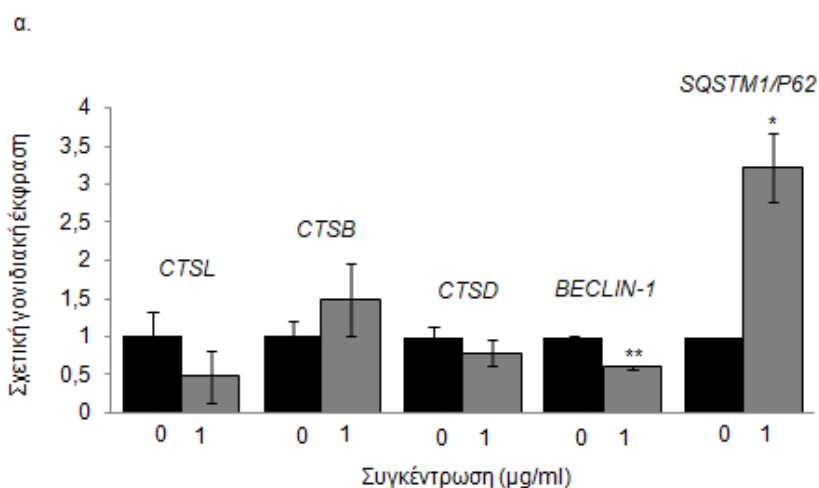


**Εικόνα 3.3** (α) Μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων σε κύτταρα BJ και (β) μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των πρωτεασωμικών υπομονάδων και των επιπέδων των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών σε κύτταρα HaCaT, έπειτα από χορήγηση 1 και 5 μg/ml του εκχυλίσματος XTMm245-S4 LAE. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Ως κύτταρα μάρτυρες

χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, τα οποία επωάστηκαν με τον διαλύτη του μορίου, DMSO, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του (\*  $P < 0,05$ ).

### 3.2.3 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XTMM245-S4 LAE στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσσοσώματος

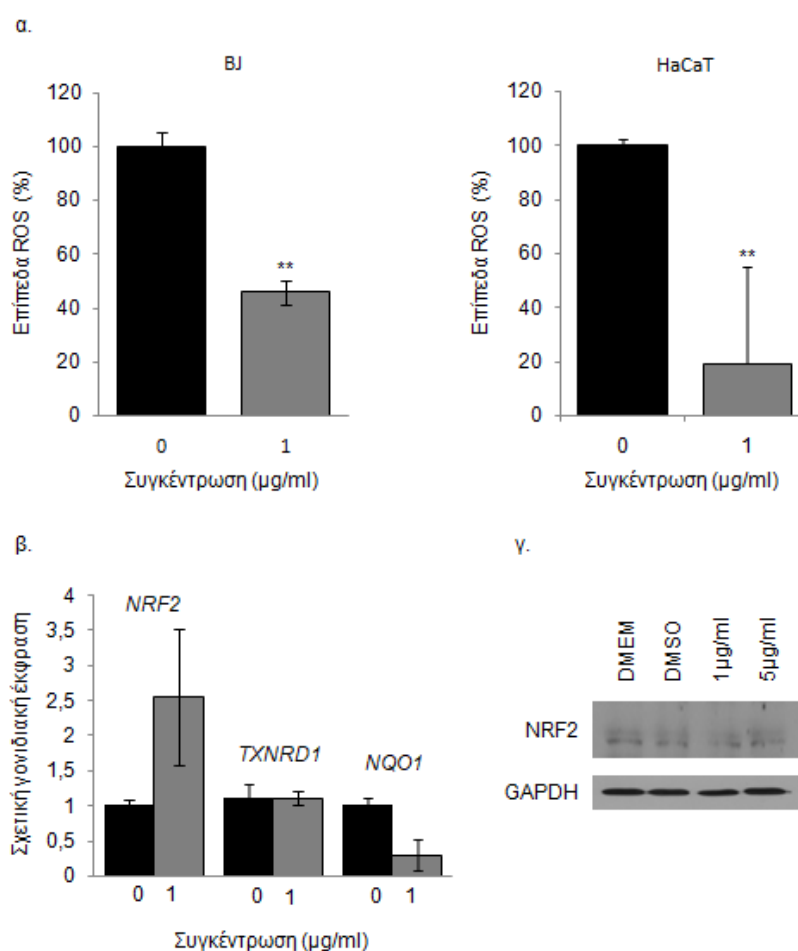
Έπειτα, μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος XTMM245-S4 LAE στον δεύτερο κύριο πρωτεολυτικό μηχανισμό του κυττάρου, στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσσοσώματος, εξετάζοντας τη γονιδιακή έκφραση των καθεψινών του λυσοσώματος και τη γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση των *BECLIN-1* και *SQSTM1/P62*, τα οποία συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό. Για τη μέτρηση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης, κύτταρα BJ επωάστηκαν με το εκχύλισμα για 24 h σε συγκέντρωση 1  $\mu\text{g/ml}$ . Όσον αφορά τα γονίδια των καθεψινών δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με το εκχύλισμα σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, αλλά παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του γονιδίου *BECLIN-1* και αύξηση του γονιδίου *SQSTM1/P62* (Εικόνα 3.4α). Για τη μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης, κύτταρα HaCaT επωάστηκαν με το εκχύλισμα για 24 h σε συγκεντρώσεις 1 και 5  $\mu\text{g/ml}$  και παρατηρήθηκε αύξηση της πρωτεΐνης P62, και μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης *BECLIN-1*, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες και για τις δύο υπό εξέταση συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος (Εικόνα 3.4β).



**Εικόνα 3.4** (α) Μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης των καθεψινών του λυσοσώματος και των γονιδίων *BECLIN-1* και *SQSTM1/P62* σε κύτταρα BJ και (β) μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών BECLIN-1 και P62 σε κύτταρα HaCaT, έπειτα από χορήγηση 1 και 5 µg/ml του εκχυλίσματος XTMm245-S4 LAE. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Ως κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, τα οποία επωάστηκαν με τον διαλύτη του μορίου, DMSO, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του (\* P<0,05, \*\* P<0,01).

### 3.2.4 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XTMm245-S4 LAE στην αντιοξειδωτική απόκριση

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος XTMm245-S4 LAE στην αντιοξειδωτική απόκριση, εξετάζοντας τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Για τη μέτρηση των επιπέδων των ROS, κύτταρα BJ και HaCaT επωάστηκαν με το εκχύλισμα για 24 h σε συγκέντρωση 1 µg/ml. Παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων των ROS και στις δύο κυτταρικές σειρές, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (Εικόνα 3.5α).

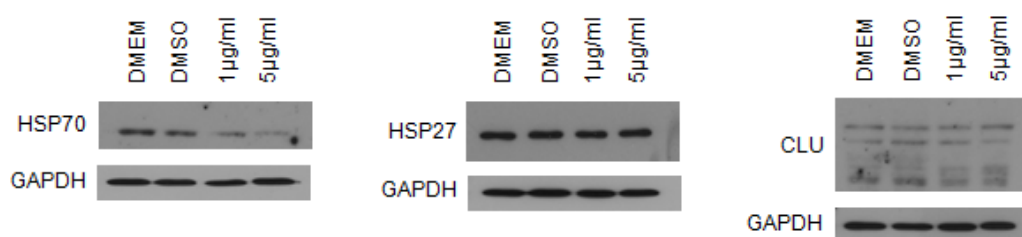


**Εικόνα 3.5** (α) Μέτρηση των επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) σε κύτταρα BJ και HaCaT, (β) μέτρηση της γονιδιακής έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 και των στόχων του, TXNRD1 και NQO1 σε κύτταρα BJ και (γ) μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του NRF2 σε κύτταρα HaCaT, έπειτα από χορήγηση 1 και 5 µg/ml του εκχυλίσματος XTMm245-S4 LAE. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Ως κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, τα οποία επωάστηκαν με τον διαλύτη του μορίου, DMSO, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του (\* P<0,05, \*\* P<0,01).

Αφού βρέθηκε ότι το εκχύλισμα, το οποίο μελετάμε, μειώνει τα ενδογενή επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου, εξετάστηκε η επίδραση στη γονιδιακή έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NRF2 και των στόχων του, NQO1 και TXNRD1, καθώς και στην πρωτεϊνική έκφραση του NRF2. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια τάση για αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *NRF2*, ενώ δε παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των *TXNRD1* και *NQO1*, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (Εικόνα 3.5β). Όσον αφορά την πρωτεϊνική έκφραση του NRF2, δεν παρατηρήθηκε επίσης καμία μεταβολή, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (Εικόνα 3.5γ).

### 3.2.5 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XTMm245-S4 LAE στο δίκτυο των μοριακών συνοδών

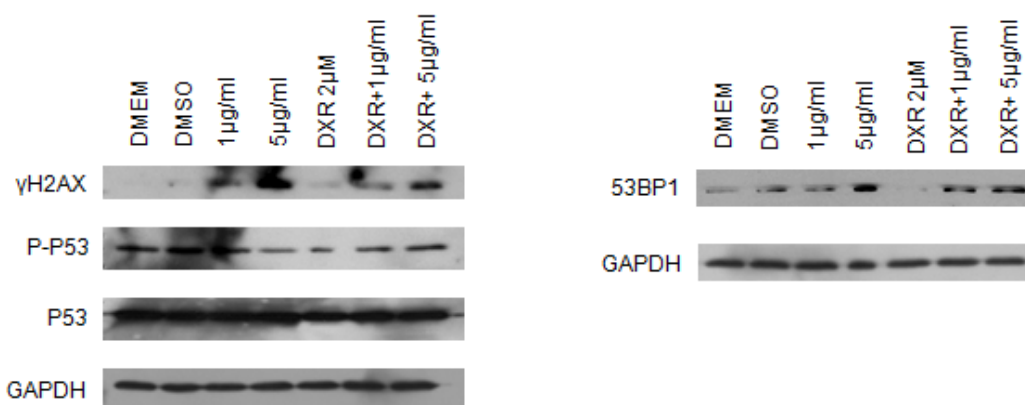
Ένα ακόμα σύστημα του δικτύου πρωτεόστασης που διερευνήθηκε στην παρούσα εργασία ύστερα από επώαση με το υπό μελέτη εκχύλισμα, είναι αυτό των μοριακών συνοδών. Για το σκοπό αυτό, μετρήθηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνικής έκφρασης επιλεγμένων μοριακών συνοδών. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μειορρύθμιση των πρωτεϊνών HSP70 και CLUSTERIN (CLU), ενώ δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στα επίπεδα της HSP27 και σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (Εικόνα 3.6).



**Εικόνα 3.6** Μέτρηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των μοριακών συνοδών HSP70, HSP27 και CLUSTERIN (CLU) σε κύτταρα HaCaT, έπειτα από χορήγηση 1 και 5 µg/ml του εκχυλίσματος XTMm245-S4 LAE. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Ως κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία επωάστηκαν με τον διαλύτη του μορίου, DMSO, στη μεγαλύτερη συγκέντρωσή του.

### 3.2.6 Μελέτη της επίδρασης του φυσικού προϊόντος XTm245-S4 LAE στην επιδιόρθωση βλαβών του γενετικού υλικού

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος XTm245-S4 LAE στα μονοπάτια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA και η πιθανή του δράση ως παράγοντας μείωσης γενετικών βλαβών στα κύτταρα. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η πρωτεϊνική έκφραση των βιοδεικτών βλάβης γενετικού υλικού: γH2AX, φωσφορυλιωμένου P53 (P-P53), P53 και 53BP1 σε κύτταρα HaCaT. Τα κύτταρα επωάστηκαν με το εκχύλισμα για 24 h σε συγκεντρώσεις 1 και 5 μg/ml, και σε συνδυασμό με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο Doxorubicin (DXR) σε συγκέντρωση 2μM. Το DXR χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας πρόκλησης γενετικών βλαβών στο κύτταρο. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της ιστόνης γH2AX και του 53BP1 και μείωση του P-P53, ενώ το P53 παραμένει σταθερό, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του εκχυλίσματος, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Ο συνδυασμός των δύο ουσιών δεν έδειξε κάποια πιθανή προστατευτική δράση του εκχυλίσματος στις βλάβες του γενετικού υλικού (Εικόνα 3.7).



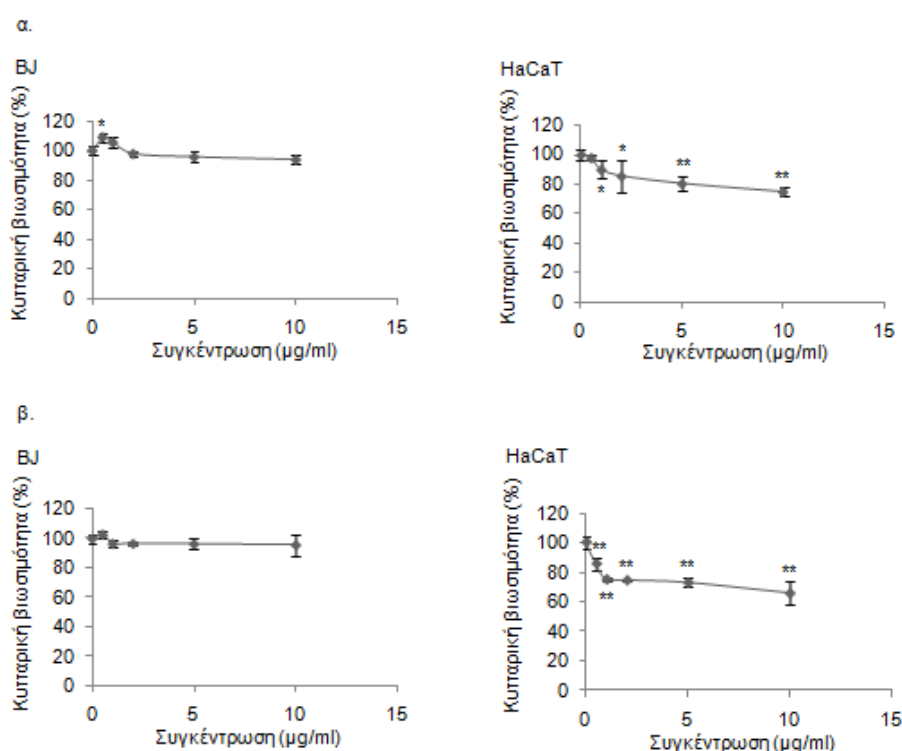
**Εικόνα 3.7** Μέτρηση επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης των δεικτών επιδιόρθωσης βλαβών του DNA γH2AX, φωσφορυλιωμένο P53 (P-P53), P53 και 53BP1, έπειτα από χορήγηση 1 και 5 μg/ml του εκχυλίσματος XTm245-S4 LAE και σε συνδυασμό με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο DXR σε συγκέντρωση 2μM. Η πρωτεΐνη GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη αναφοράς για την παρουσίαση του ισοφορτώματος. Ως κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία επωάστηκαν με τον διαλύτη του μορίου, DMSO, στη μεγαλύτερη συγκέντρωσή του.

### 3.3 Μελέτη της επίδρασης των φυσικών προϊόντων του φυτού *Sonchus tenerrimus* στο δίκτυο πρωτεόστασης

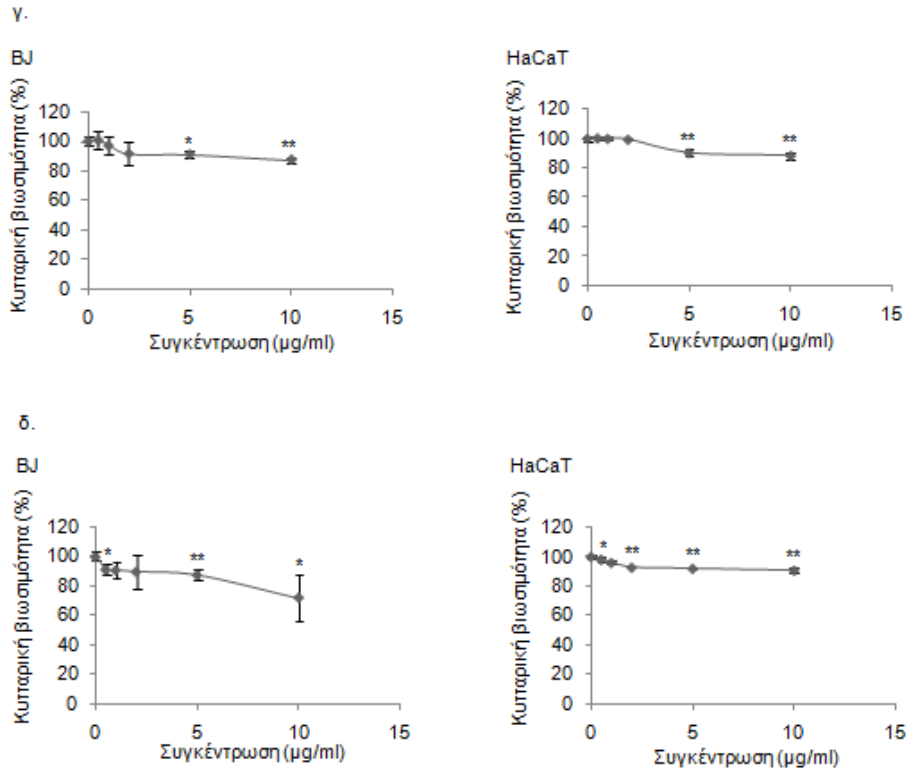
Στο τελευταίο κομμάτι της παρούσας εργασίας συγκρίθηκαν ως προς την επίδρασή τους στο δίκτυο πρωτεόστασης, εκχυλίσματα από το φυτό *Sonchus tenerrimus*, τα οποία προέκυψαν με τέσσερις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης, και ανιχνεύτηκαν οι πιθανές αντι-γηραντικές τους ιδιότητες.

#### 3.3.1 Μελέτη τοξικότητας των φυσικών προϊόντων του φυτού *Sonchus tenerrimus*

Αρχικά, για να επιλεγθεί η κατάλληλη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από το φυτό *Sonchus tenerrimus*, εξετάστηκε η επίδραση τους στη βιωσιμότητα κυττάρων BJ και HaCaT. Τα κύτταρα επωάστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων για 24 h, μέχρι τη συγκέντρωση 10  $\mu\text{g/ml}$  και διαπιστώθηκε ότι τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν σημαντική κυτταροτοξική δράση και στις δύο κυτταρικές σειρές, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (Εικόνα 3.8).





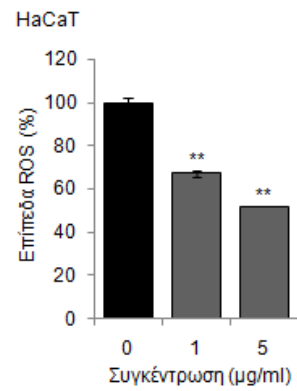
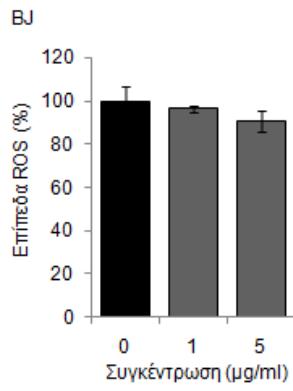


**Εικόνα 3.8** Μέτρηση βιωσιμότητας κυτάρων BJ και HaCaT, έπειτα από χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων των εκχυλισμάτων του φυτού *Sonchus tenerrimus* που απομονώθηκαν με τις μεθόδους (α) UAE, (β) SFE, (γ) ASE (αιθανικός αιθυλεστέρας) και (δ) ASE (αιθανόλη). Ως κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, τα οποία επώαστηκαν με τον διαλύτη του μορίου, DMSO, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του (\* P<0,05, \*\* P<0,01).

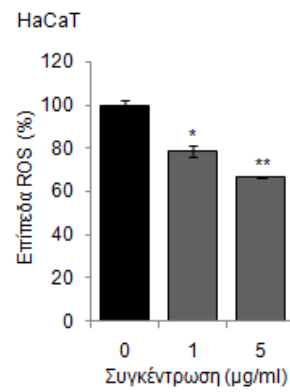
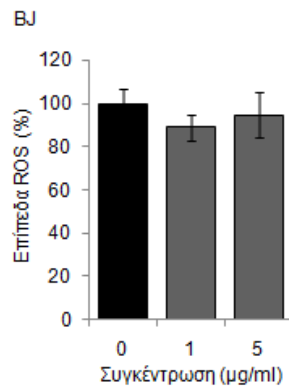
### 3.3.2 Μελέτη της επίδρασης των φυσικών προϊόντων του φυτού *Sonchus tenerrimus* στην αντιοξειδωτική απόκριση

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από το φυτό *Sonchus tenerrimus* στην αντιοξειδωτική απόκριση, εξετάζοντας τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Για τη μέτρηση των επιπέδων των ROS, κύτταρα BJ και HaCaT επώαστηκαν με το εκχύλισμα για 24 h σε συγκεντρώσεις 1 και 5 µg/ml και παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων των ROS στα κύτταρα HaCaT, ενώ δεν επηρεάστηκαν στα κύτταρα BJ, σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες (Εικόνα 3.9).

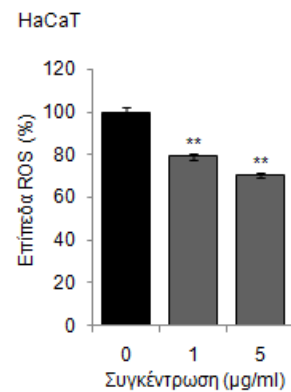
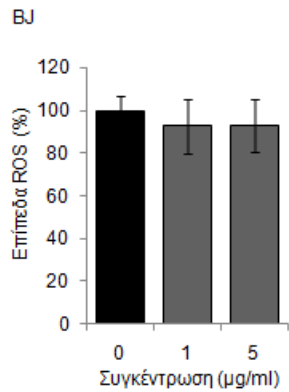
α.



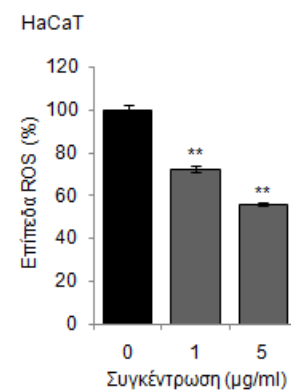
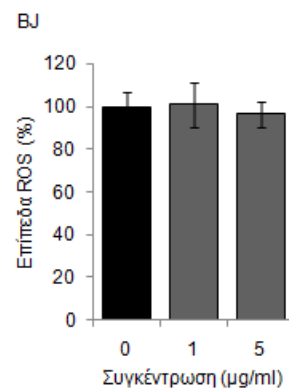
β.



γ.



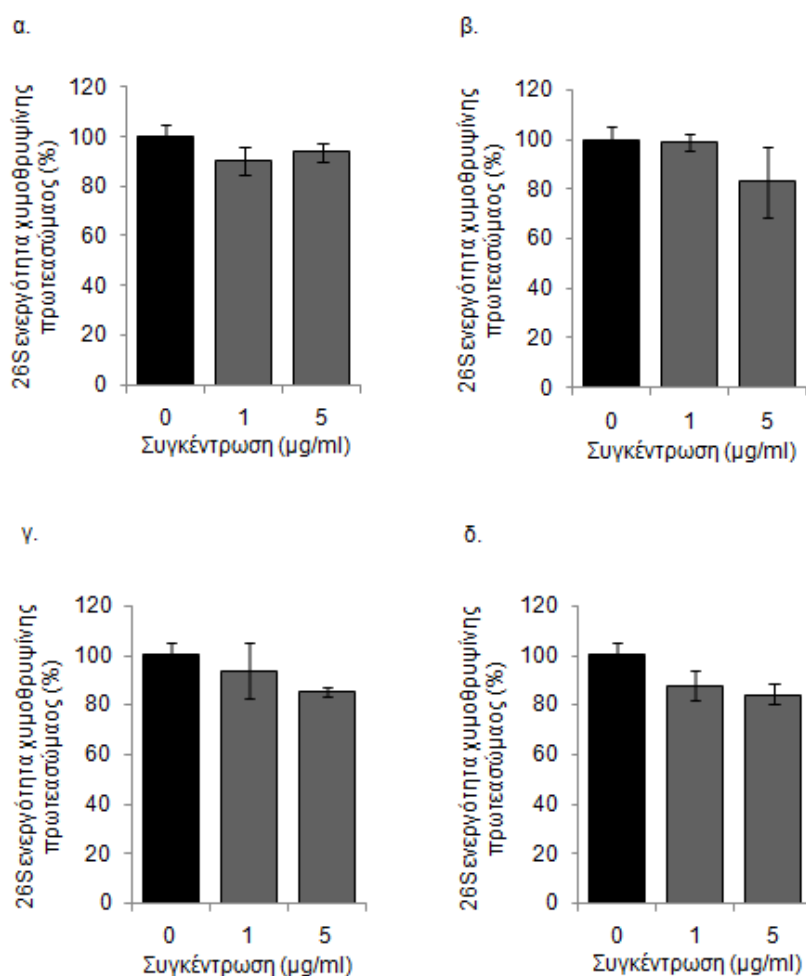
δ.



**Εικόνα 3.9** Μέτρηση των επιπέδων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) σε κύτταρα BJ και HaCaT, έπειτα από χορήγηση 1 και 5 µg/ml των εκχυλισμάτων του φυτού *Sonchus tenerrimus* που απομονώθηκαν με τις μεθόδους (α) UAE, (β) SFE, (γ) ASE (αιθανικός αιθυλεστέρας) και (δ) ASE (αιθανόλη). Ως κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, τα οποία επωάστηκαν με τον διαλύτη του μορίου, DMSO, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του (\* P<0,05, \*\* P<0,01).

### 3.3.3 Μελέτη της επίδρασης των φυσικών προϊόντων του φυτού *Sonchus tenerrimus* στο μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος

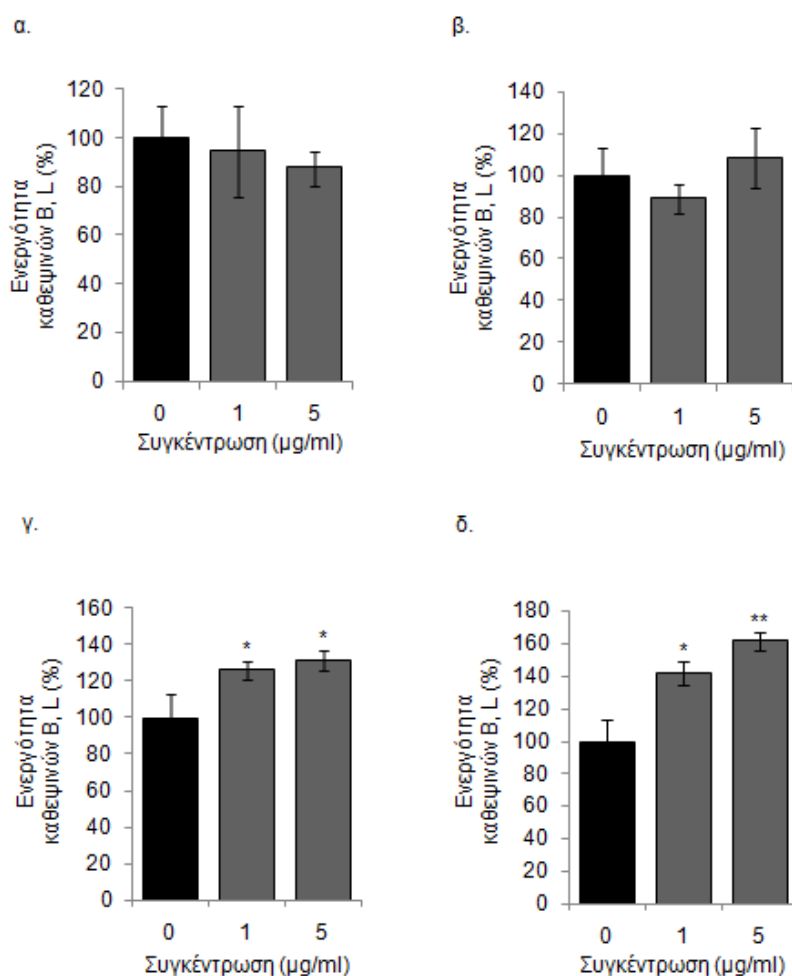
Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από το φυτό *Sonchus tenerrimus* στο μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, εξετάζοντας την ενεργότητα του πρωτεασώματος μετά τη χορήγηση τους σε κύτταρα HaCaT. Τα κύτταρα επωάστηκαν με το εκχύλισμα για 24 h σε συγκεντρώσεις 1 και 5 µg/ml. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια μεταβολή της ενζυμικής ενεργότητας της χυμοθρυψίνης της υπομονάδας β5 του πρωτεασώματος για κανέναν από τους τέσσερις τρόπους εκχύλισης (Εικόνα 3.10).



**Εικόνα 3.10** Μέτρηση ενζυμικής πρωτεασωμικής ενεργότητας χυμοθρυψίνης σε κύτταρα HaCaT, έπειτα από χορήγηση 1 και 5 µg/ml των εκχυλισμάτων του φυτού *Sonchus tenerrimus* που απομονώθηκαν με τις μεθόδους (α) UAE, (β) SFE, (γ) ASE (αιθανικός αιθυλεστέρας) και (δ) ASE (αιθανόλη). Ως κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα, τα οποία επωάστηκαν με τον διαλύτη του μορίου, DMSO, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του.

### 3.3.4 Μελέτη της επίδρασης των φυσικών προϊόντων του φυτού *Sonchus tenerrimus* στο μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσσοσώματος

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση των εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από το φυτό *Sonchus tenerrimus* στο έτερο πρωτεολυτικό μονοπάτι του κυττάρου, δηλαδή της αυτοφαγίας-λυσσοσώματος. Εξετάζοντας την ενεργότητα των καθεψινών B και L του λυσοσώματος μετά τη χορήγηση τους σε κύτταρα HaCaT δεν παρατηρήθηκε μεταβολή μετά τη χορήγηση των εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν με τις μεθόδους (α) UAE και (β) SFE, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση της μετά τη χορήγηση των εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν με τις μεθόδους (γ) ASE (αιθανικός αιθυλεστέρας) και (δ) ASE (αιθανόλη) (Εικόνα 3.11).



**Εικόνα 3.11** Μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας των καθεψινών B και L του λυσοσώματος σε κύτταρα HaCaT, έπειτα από χορήγηση 1 και 5 µg/ml των εκχυλισμάτων των εκχυλισμάτων του φυτού *Sonchus tenerrimus* που απομονώθηκαν με τις μεθόδους (α) UAE, (β) SFE, (γ) ASE (αιθανικός αιθυλεστέρας) και (δ) ASE (αιθανόλη). Ως κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τα οποία επωάστηκαν με τον διαλύτη του μορίου, DMSO, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του (\* P<0,05, \*\* P<0,01).

## 4. Συζήτηση

Η γήρανση αποτελεί μια φυσιολογική, μη αναστρέψιμη διαδικασία που εμφανίζεται σε όλους τους οργανισμούς και οδηγεί στην αύξηση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας, μειώνοντας με την πάροδο του χρόνου την κυτταρική λειτουργία και την κυτταρική απόκριση στο στρες. Ένα από τα ορόσημα της γήρανσης είναι η διατάραξη της πρωτεόστασης, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση δυσλειτουργικών βιομορίων (Argyropoulou et al., 2013; López-Otín et al., 2013). Οι οργανισμοί διαθέτουν ένα σύστημα ποιοτικού ελέγχου, το δίκτυο πρωτεόστασης, το οποίο εξουδετερώνει τα στρεσογόνα και αναγνωρίζει και επιδιορθώνει ή απομακρύνει τα δυσλειτουργικά βιομόρια. Κατά τη γήρανση, το σύστημα αυτό δυσλειτουργεί, με αποτέλεσμα τη μείωση των σηματοδοτικών και επιδιορθωτικών μονοπατιών και την συσσώρευση υψηλών επιπέδων στρεσογόνων, τα οποία σχετίζονται με την εμφάνιση του γηρασμένου ιστού και των ασθενειών που σχετίζονται με το γήρας (Tsakiri and Trougakos, 2015).

Η δυσλειτουργία του δικτύου πρωτεόστασης οδηγεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Ειδικότερα, τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από υπερενεργοποίηση των σηματοδοτικών και επιδιορθωτικών μονοπατιών του δικτύου πρωτεόστασης, με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο και συνεχή πολλαπλασιασμό τους (Klaips et al., 2018; Sala et al., 2017). Η άμεση συσχέτιση της εξέλιξης της καρκινογένεσης με τους μηχανισμούς διασφάλισης της ποιότητας του πρωτεώματος των κυτάρων ανοίγει νέα μονοπάτια στην προσπάθεια αντιμετώπισης του καρκίνου (Sklirou et al., 2018; Trougakos et al., 2013).

Ένας μεγάλος αριθμός φυσικών προϊόντων, που προέρχονται από διάφορες πηγές (π.χ. φυτά, θαλάσσιοι οργανισμοί ή μικροοργανισμοί), έχει βρεθεί ότι μπορεί να καθυστερήσει την κυτταρική γήρανση σε ανθρώπινα κύτταρα ή την *in vivo* γήρανση σε μοντέλα οργανισμών, ενεργοποιώντας τους παράγοντες του δικτύου πρωτεόστασης. Για παράδειγμα, τα φυσικά προϊόντα ραπαμυκίνη, μετοφομίνη, κερσετίνη, ελαιοευρωπαϊνή και ρεσβερατρόλη αποτελούν θετικούς ρυθμιστές των πρωτεοστατικών και/ή αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου και οδηγούν σε αύξηση του αριθμού των κυτταρικών διπλασιασμών σε ανθρώπινους ινοβλάστες και/ή του προσδόκιμου ζωής σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα (Argyropoulou et al., 2013).

Με δεδομένο την ευεργετική αντι-γηραντική και αντι-καρκινική δράση ορισμένων φυσικών προϊόντων και τη συσχέτιση τους με το δίκτυο πρωτεόστασης, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση ορισμένων φυσικών προϊόντων στα κύρια μονοπάτια του δικτύου πρωτεόστασης, με σκοπό την εύρεση των πιθανών αντι-γηραντικών ή αντι-καρκινικών ιδιοτήτων τους. Μετά τη χορήγηση τους σε κυτταρικές σειρές, εξετάστηκαν οι δύο κύριοι κυτταρικοί πρωτεολυτικοί μηχανισμοί, δηλαδή τα μονοπάτια ουβικιτίνης-

πρωτεασώματος και αυτοφαγίας-λυσσώματος, η αντιοξειδωτική απόκριση των κυττάρων μέσω του μονοπατιού NRF2/KEAP1, η ρύθμιση του δικτύου των μοριακών συνοδών και η επιδιόρθωση βλαβών στο γενετικό υλικό.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του βιομορίου XML-233-F9-SF10 στο μονοπάτι ουβικιίνης-πρωτεασώματος. Παρατηρήθηκε ότι μετά τη χορήγηση του μορίου σε κύτταρα ανθρώπινου εντερικού αδενοκαρκινώματος (DLD1) μειώνεται η ενζυμική ενεργότητα χυμοθριψίνης της υπομονάδας β5 του πρωτεασώματος. Στη συνέχεια, αφού διαπιστώθηκε η ανασταλτική δράση του μορίου στη λειτουργία του πρωτεασώματος, διερευνήθηκε η δράση του σε απομονωμένα πρωτεασώματα για να καταστεί σαφές αν το μόριο δρα άμεσα σε αυτό ή έμμεσα μέσω κάποιου σηματοδοτικού μονοπατιού που ελέγχει τη λειτουργία του, όπως για παράδειγμα αυτό του NRF2/KEAP1 (Kwak et al., 2003). Βρέθηκε ότι πιθανά δρα σε κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι, αφού δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή στην ενεργότητα χυμοθρυψίνης ύστερα από τη χορήγηση του μορίου σε απομονωμένα πρωτεασώματα. Επομένως, μπορεί να θεωρηθεί έμμεσος αναστολέας του πρωτεασώματος και να περιορίσει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Όπως είναι γνωστό, το μονοπάτι ουβικιίνης-πρωτεασώματος θεωρείται τα τελευταία χρόνια στόχος για την ανάπτυξη νέων αντι-καρκινικών θεραπειών. Ως αποτέλεσμα, αρκετοί αναστολείς του πρωτεασώματος βρίσκονται στη φάση των κλινικών δοκιμών, ενώ αποδεδειγμένη είναι η αποτελεσματικότητα απέναντι στο πολλαπλό μέλωμα και σε άλλες αιματολογικές κακοήθειες, των άμεσων πρωτεασωμικών αναστολέων Bortezomib και Carfilzomib, οι οποίοι προσδένονται στο καταλυτικό τμήμα του πρωτεασώματος (Dimopoulos et al., 2011; Manasanch and Orłowski, 2017). Επίσης, έχουν γίνει αναφορές έμμεσης αναστολής του πρωτεασώματος, όπως η κυκλοσπορίνη A, η οποία παρουσιάζει μη ανταγωνιστική αναστολή του πρωτεασώματος αλληλεπιδρώντας με τον πρωτεασωμικό ενεργοποιητή PA28 (Adams et al., 2000).

Στη συνέχεια, δεδομένου ότι η διατάραξη της πρωτεόστασης αποτελεί κύριο ορόσημο της γήρανσης (López-Otín et al., 2013), εξετάστηκε η επίδραση του εκχυλίσματος XTmm245-S4 LAE στους μηχανισμούς του δικτύου πρωτεόστασης, με σκοπό την πιθανή εύρεση των αντι-γηραντικών ιδιοτήτων του. Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση του εκχυλίσματος στη βιωσιμότητα των κυττάρων ύστερα από συγχορήγηση με τον οξειδωτικό παράγοντα, υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) (Dimozi et al., 2015), με σκοπό να ελεγχθεί η πιθανή προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας στη μικρότερη χορηγούμενη συγκέντρωση του εκχυλίσματος σε συνδυασμό με τη μικρότερη συγκέντρωση του  $H_2O_2$  στα κύτταρα HaCaT. Επομένως, το εκχύλισμα μπορεί να θεωρηθεί ότι κατέχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος XTMm245-S4 LAE στο μονοπάτι ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, το οποίο έχει μειωμένη ενεργότητα κατά την κυτταρική γήρανση (Chondrogianni et al., 2003). Βρέθηκε ότι το εκχύλισμα αυξάνει την έκφραση των γονιδίων του 19S ρυθμιστικού τμήματος του πρωτεασώματος, *RPN6* και *RPN11*, ενώ δεν επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων *PSMA3*, *PSMB5*, *PSMB6* και *PSMB7*, των οποίων οι πρωτεΐνες συμμετέχουν στη συναρμολόγηση του 20S καταλυτικού τμήματος του πρωτεασώματος. Όσον αφορά την πρωτεϊνική έκφραση, παρατηρήθηκε ότι αυξάνει την υπομονάδα β5 του 20S καταλυτικού τμήματος του πρωτεασώματος, αλλά δεν επηρεάζει την πρωτεϊνική έκφραση της υπομονάδας α7 και τα επίπεδα των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών. Η αύξηση της έκφρασης τμημάτων του πρωτεασώματος αποτελεί δείκτη των αντι-γηραντικών ιδιοτήτων του υπό εξέταση εκχυλίσματος, αφού μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση της καταλυτικής υπομονάδας β5 του πρωτεασώματος σε ανθρώπινα κύτταρα αύξησε την ενεργότητα του πρωτεασώματος και την ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες, ενώ επίσης καθυστέρησε την εμφάνιση της κυτταρικής γήρανσης (Chondrogianni et al., 2005).

Όσον αφορά το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσώματος, το οποίο έχει βρεθεί και αυτό να μειώνεται κατά τη γήρανση (Morimoto and Cuervo, 2014), παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος XTMm245-S4 LAE δεν επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων των καθεψινών του λυσοσώματος, αλλά αυξάνει τη γονιδιακή έκφραση και την πρωτεϊνική έκφραση του P62. Όπως είναι γνωστό, η πρωτεΐνη P62 συμμετέχει στη μεταφορά πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και κατεστραμμένων οργανιδίων για αποικοδόμηση μέσω του μονοπατιού αυτοφαγίας-λυσώματος και η απώλεια της σχετίζεται με τη γήρανση και τις ασθένειες του γήρατος (Bitto et al., 2014; Katsuragi et al., 2015). Ακόμη, βρέθηκε ότι το εκχύλισμα μειώνει τη γονιδιακή και την πρωτεϊνική έκφραση της BECLIN-1. Η BECLIN-1 παίζει ρόλο στην πυρήνωση και τη συναρμολόγηση του φαγοφόρου που είναι η πρόδρομη μορφή του αυτοφαγοσώματος και έχει κύριο ρόλο στη διαδικασία της γήρανσης (Patingre et al., 2008; Salminen et al., 2013).

Επιπροσθέτως, το εκχύλισμα XTMm245-S4 LAE έχει επίδραση και στο μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης NRF2/KEAP1, του οποίου η ρύθμιση μειώνεται κατά τη γήρανση (Tsakiri et al., 2013). Μειώνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), επομένως ενεργοποιεί το μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης. Επίσης, αυξάνει τη γονιδιακή έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα των γονιδίων αντιοξειδωτικής απόκρισης, NRF2, ενώ δεν επηρεάζει την πρωτεϊνική του έκφραση. Σύμφωνα με μελέτες, η ενεργοποίηση του NRF2 οδηγεί σε αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε ανθρώπινους ινοβλάστες (Kapeta et al., 2010). Ωστόσο, το



εκχύλισμα δεν επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση των στόχων του NRF2, *TXNRD1* και *NQO1*.

Στη συνέχεια, δεδομένου ότι το μονοπάτι των μοριακών συνοδών είναι μειωμένο κατά τη γήρανση (Calderwood et al., 2009), μελετήθηκε η επίδραση του εκχυλίσματος XTMm245-S4 LAE στην πρωτεϊνική έκφραση επιλεγμένων συνοδών. Παρατηρήθηκε ότι μειώνει την πρωτεϊνική έκφραση των HSP70 και CLUSTERIN, ενώ δεν επηρεάζει την έκφραση της HSP27, συνεπώς δεν φαίνεται να ωφελεί αυτόν τον μηχανισμό του δικτύου πρωτεόστασης. Οι μοριακές συνοδοί συμβάλλουν στη διατήρηση της πρωτεόστασης συμμετέχοντας στο δίπλωμα των πρωτεϊνών. Οι HSP27 και CLUSTERIN ανήκουν στις μοριακές συνοδούς μικρού μοριακού βάρους, οι οποίες είναι ATP ανεξάρτητες, ενώ η HSP70 ανήκει στις μεγάλου μοριακού βάρους, οι οποίες είναι ATP εξαρτώμενες. Οι ATP εξαρτώμενες αναγνωρίζουν τις μη διπλωμένες πρωτεΐνες και συνεργάζονται με τις ATP ανεξάρτητες για το δίπλωμα τους (Hartl et al., 2011).

Τέλος, ένα άλλο ορόσημο της γήρανσης είναι η γενωμική αστάθεια (López-Otín et al., 2013). Για αυτό το λόγο, ανιχνεύτηκαν τα επίπεδα των βιοδεικτών ύπαρξης θραύσεων στη δίκλωνη αλυσίδα (Double Strand Breaks, DSBs), όπως οι γH2AX, φωσφορυλιωμένο P53 (P-P53), P53 και 53BP1 μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος XTMm245-S4 LAE και σε συνδυασμό με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο Doxorubicin (DXR), το οποίο δρα κατά του καρκίνου προκαλώντας DSBs (Yang et al., 2014). Παρατηρήθηκε ότι αυξάνεται η πρωτεϊνική έκφραση των γH2AX και 53BP1, ενώ μειώνεται η έκφραση του φωσφορυλιωμένου P53, παραμένοντας σταθερή η έκφραση του P53. Επίσης, ο συνδυασμός των δύο ουσιών δεν έδειξε κάποια πιθανή προστατευτική δράση του εκχυλίσματος στις βλάβες του γενετικού υλικού. Όπως είναι γνωστό, η ιστόνη γH2AX και η πρωτεΐνη 53BP1 συμμετέχουν στην επιδιόρθωση των βλαβών του γενετικού υλικού και αποτελούν υποστρώματα της πρωτεϊνικής κινάσης ATM, η οποία στρατολογείται και ενεργοποιείται από θραύσεις στη δίκλωνη αλυσίδα του DNA (Jackson and Bartek, 2009; Panier and Boulton, 2014). Όσον αφορά την πρωτεΐνη P53, η οποία ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση, μπορεί να ενεργοποιήσει την επιδιόρθωση του DNA, αλλά και να σταματήσει την κυτταρική αύξηση σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο στο σημείο G1/S. Όταν η βλάβη είναι μη αναστρέψιμη, επάγει την απόπτωση του κυττάρου (Cheng and Chen, 2010). Σύμφωνα με τα παραπάνω, το εκχύλισμα μπορεί να επάγει γενωμική αστάθεια.

Σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα, το εκχύλισμα XTMm245-S4 LAE επάγει τμήματα των μονοπατιών ουβικιτίνης-πρωτεασώματος, αυτοφαγίας-λυσσοσώματος και αντιοξειδωτικής απόκρισης. Επομένως, μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει αντι-γηραντικές ιδιότητες, ωστόσο περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να διεξαχθούν για να αποσαφηνιστεί ο τρόπος δράσης του.

Στη συνέχεια, εξετάστηκε η επίδραση των τεσσάρων εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν από το φυτό *Sonchus tenerrimus* με τέσσερις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης, στα μονοπάτια αντιοξειδωτικής απόκρισης, και στα δύο κύρια πρωτεολυτικά μονοπάτια του κυττάρου. Αρχικά, μετά τη χορήγηση τους σε κύτταρα BJ και HaCaT παρατηρήθηκε μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ROS στα HaCaT, ενώ καμία μεταβολή τους στα BJ. Επίσης, όσον αφορά το μονοπάτι ουβικιίνης-πρωτεασώματος δεν σημειώθηκε μεταβολή της ενεργότητας του πρωτεασώματος με κανέναν από τους τέσσερις τρόπους εκχύλισης, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας των καθεψινών B και L του λυσοσώματος μετά τη χορήγηση των εκχυλισμάτων που απομονώθηκαν με τη μέθοδο εκχύλισης ASE. Επομένως, και τα τέσσερα εκχυλίσματα αυξάνουν το μονοπάτι αντιοξειδωτικής απόκρισης μειώνοντας το επίπεδο των ROS, ενώ τα εκχυλίσματα που απομονώθηκαν με τη μέθοδο εκχύλισης ASE ρυθμίζουν θετικά και το μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος. Σύμφωνα με αυτά τα ευρήματα, τα εκχυλίσματα μπορεί να έχουν αντι-γηραντική δράση, καθώς κατά τη γήρανση μειώνεται η αντιοξειδωτική απόκριση και το πρωτεολυτικό μονοπάτι αυτοφαγίας-λυσοσώματος (Tsakiri et al., 2013).

Συμπεραίνοντας, τα φυσικά προϊόντα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία επηρεάζουν τα κύρια μονοπάτια του δικτύου πρωτεόστασης, δηλαδή τα μονοπάτια ουβικιίνης-πρωτεασώματος, αυτοφαγίας-λυσοσώματος και αντιοξειδωτικής απόκρισης. Ωστόσο, περαιτέρω μελέτες πρέπει να διεξαχθούν όσον αφορά στους συγκεκριμένους μηχανισμούς, προκειμένου να αποσαφηνιστεί πλήρως ο τρόπος μέσω του οποίου μπορούν να καθυστερήσουν την κυτταρική γήρανση.

## 5. Βιβλιογραφία

Adams, J., Palombella, V.J., and Elliott, P.J. (2000). Proteasome inhibition: A new strategy in cancer treatment. *Invest. New Drugs* 18, 109–121.

Alic, N., and Partridge, L. (2011). Death and dessert: Nutrient signalling pathways and ageing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 738–743.

Anckar, J., and Sistonen, L. (2011). Regulation of HSF 1 Function in the Heat Stress Response: Implications in Aging and Disease. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 1089–1115.

Anisimov, V.N., Berstein, L.M., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., Semenchenko, A. V., Tyndyk, M.L., Yurova, M.N., Kovalenko, I.G., et al. (2011). If started early in life, metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice. *Aging (Albany. NY)*. 3, 148–157.

Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Trougkos, I.P., and Skaltsounis, A.L. (2013). Natural compounds with anti-ageing activity. *Nat. Prod. Rep.* 30, 1412–1437.

Arias, E., and Cuervo, A.M. (2011). Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 184–189.

Baird, T.D., and Wek, R.C. (2012). Eukaryotic Initiation Factor 2 Phosphorylation and Translational Control in Metabolism. *Adv. Nutr.* 3, 307–321.

Balchin, D., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science (80-. )*. 353, aac4354.

Bartlett, A.I., and Radford, S.E. (2009). An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 582–588.

Baur, J.A., and Sinclair, D.A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 493–506.

Becks, L., Prince, M., Burson, H., Christophe, C., Broadway, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Mathis, M., Orchard, E., Shi, R., et al. (2010). Aggressive mammary carcinoma progression in Nrf2 knockout mice treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *BMC Cancer* 10.

Belinha, I., Amorim, M.A., Rodrigues, P., De Freitas, V., Moradas-Ferreira, P., Mateus, N., and Costa, V. (2007). Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2446–2451.

Berstein, L.M. (2012). Metformin in obesity, cancer and aging: Addressing controversies. *Aging (Albany. NY)*. 4, 320–329.

Betteridge, D.J. (2000). What is oxidative stress? In *Metabolism: Clinical and Experimental*, (W.B. Saunders), pp. 3–8.

Bitto, A., Lerner, C.A., Nacarelli, T., Crowe, E., Torres, C., and Sell, C. (2014). p62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy, and disease. *Age (Omaha)*. 36, 1123–1137.

Bjedov, I., Toivonen, J.M., Kerr, F., Slack, C., Jacobson, J., Foley, A., and Partridge, L. (2010). Mechanisms of Life Span Extension by Rapamycin in the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab.* 11, 35–46.

Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol.* 15, 713–720.

Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Bravo, R., Parra, V., Gatica, D., Rodriguez, A.E., Torrealba, N., Paredes, F., Wang, Z. V., Zorzano, A., Hill, J.A., Jaimovich, E., et al. (2013). Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response. Dynamics and Metabolic Integration. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier Inc.), pp. 215–290.

Cabreiro, F., and Gems, D. (2013). Worms need microbes too: Microbiota, health and aging in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Mol. Med.* 5, 1300–1310.

Calderwood, S.K., Murshid, A., and Prince, T. (2009). The shock of aging: Molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging - A mini-review. *Gerontology* 55, 550–558.

Campo, E., Muñoz, J., Miquel, R., Palacín, A., Cardesa, A., Sloane, B.F., and Emmert-Buck, M.R. (1994). Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival. *Am. J. Pathol.* 145, 301–309.

Cheng, Q., and Chen, J. (2010). Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. *Cell Cycle* 9, 472–478.

Chiti, F., and Dobson, C.M. (2017). Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 27–68.

Chondrogianni, N., Stratford, F.L.L., Trougakos, I.P., Friguet, B., Rivett, A.J., and Gonos, E.S. (2003). Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts. Induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J. Biol. Chem.* 278, 28026–28037.

Chondrogianni, N., Tzavelas, C., Pemberton, A.J., Nezis, I.P., Rivett, A.J., and Gonos, E.S. (2005). Overexpression of proteasome  $\beta 5$  subunit increases the amount of assembled proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates. *J. Biol. Chem.* 280, 11840–11850.

Chondrogianni, N., Kapeta, S., Chinou, I., Vassilatou, K., Papassideri, I., and Gonos, E.S. (2010). Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. *Exp. Gerontol.* 45, 763–771.

Cohen, E., and Dillin, A. (2008). The insulin paradox: Aging, proteotoxicity and neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 759–767.

Denizot, F., and Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89, 271–277.

DePinho, R.A. (2000). The age of cancer. *Nature* 408, 248–254.

Dimopoulos, M.A., San-Miguel, J.F., and Anderson, K.C. (2011). Emerging therapies for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. *Eur. J. Haematol.* 86, 1–15.

Dimozi, A., Mavrogonatos, E., Skliro, A., and Kleitsas, D. (2015). Oxidative stress inhibits the proliferation, induces premature senescence and promotes a catabolic phenotype in human nucleus pulposus intervertebral disc cells. *Eur. Cells Mater.* 30, 89–103.

Drummond, D.A., and Wilke, C.O. (2008). Mistranslation-Induced Protein Misfolding as a Dominant Constraint on Coding-Sequence Evolution. *Cell* 134, 341–352.

Fahey, J.W., Haristoy, X., Dolan, P.M., Kensler, T.W., Scholtus, I., Stephenson, K.K., Talalay, P., and Lozniewski, A. (2002). Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7610–7615.

Fernández, P.L., Farré, X., Nadal, A., Fernández, E., Peiró, N., Sloane, B.F., Shi, G., Chapman, H.A., Campo, E., and Cardesa, A. (2001). Expression of cathepsins B and S in the progression of prostate carcinoma. *Int. J. Cancer* 95, 51–55.

Gabrijelcic, D., Svetic, B., Spaic, D., Skrk, J., Budihna, M., Dolenc, I., Papovic, T., Cotic, V., and Turk, V. (1992). Cathepsins B, H and L in human breast carcinoma. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30, 69–74.

Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., and Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615–623.

Groll, M., and Clausen, T. (2003). Molecular shredders: How proteasomes fulfill their role. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 665–673.

- Gumeni, S., Evangelakou, Z., Gorgoulis, V.G., and Trougakos, I.P. (2017). Proteome stability as a key factor of genome integrity. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., et al. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* *460*, 392–395.
- Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* *475*, 324–332.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* *25*, 585–621.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). THE UBIQUITIN SYSTEM. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 425–479.
- Houghton, C.A., Fassett, R.G., and Coombes, J.S. (2016). Sulforaphane and Other Nutrigenomic Nrf2 Activators: Can the Clinician's Expectation Be Matched by the Reality? *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2016*.
- Houtkooper, R.H., Williams, R.W., and Auwerx, J. (2010). Metabolic Networks of Longevity. *Cell* *142*, 9–14.
- Hsu, A.L., Murphy, C.T., and Kenyon, C. (2003). Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* (80-. ). *300*, 1142–1145.
- Iyer, L.M., Burroughs, A.M., and Aravind, L. (2006). The prokaryotic antecedents of the ubiquitin-signaling system and the early evolution of ubiquitin-like beta-grasp domains. *Genome Biol.* *7*, R60.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* *461*, 1071–1078.
- Jung, K.A., and Kwak, M.K. (2010). The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules* *15*, 7266–7291.
- Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R.F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P., and Wätjen, W. (2008). Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* *149*, 314–323.
- Kapeta, S., Chondrogianni, N., and Gonos, E.S. (2010). Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *285*, 8171–8184.
- Katsiki, M., Chondrogianni, N., Chinou, I., Rivett, A.J., and Gonos, E.S. (2007). The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. *Rejuvenation Res.* *10*, 157–172.
- Katsuragi, Y., Ichimura, Y., and Komatsu, M. (2015). P62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* *282*, 4672–4678.
- Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2015). Proteostasis and aging. *Nat. Med.* *21*, 1406–1415.
- Kenyon, C.J. (2010). The genetics of ageing. *Nature* *464*, 504–512.
- Khor, T.O., Huang, M.T., Prawan, A., Liu, Y., Hao, X., Yu, S., Cheung, W.K.L., Chan, J.Y., Reddy, B.S., Yang, C.S., et al. (2008). Increased susceptibility of Nrf2 knockout mice to colitis-associated colorectal cancer. *Cancer Prev. Res.* *1*, 187–191.
- Kirkegaard, T., and Jäättelä, M. (2009). Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1793*, 746–754.
- Klaips, C.L., Jayaraj, G.G., and Hartl, F.U. (2018). Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J. Cell Biol.* *217*, 51–63.
- Klionsky, D.J., and Emr, S.D. (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* (80-. ). *290*, 1717–1721.
- Kos, J., Krasovec, M., Svetic, B., Lenarcic, B., Turk, V., Smid, A., Vrhovc, I., and Skrk, J. (1995). Lysosomal Proteases Cathepsins D, B, H, L and Their Inhibitors Stefins

- A and B in Head and Neck Cancer. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 376, 401–406.
- Kourtis, N., and Tavernarakis, N. (2011). Cellular stress response pathways and ageing: Intricate molecular relationships. *EMBO J.* 30, 2520–2531.
- Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., and Peter, M. (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat. Cell Biol.* 10, 602–610.
- Kulak, N.A., Geyer, P.E., and Mann, M. (2017). Loss-less nano-fractionator for high sensitivity, high coverage proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 16, 694–705.
- Kunjappu, M.J., and Hochstrasser, M. (2014). Assembly of the 20S proteasome. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843, 2–12.
- Kwak, M.K., Wakabayashi, N., Itoh, K., Motohashi, H., Yamamoto, M., and Kensler, T.W. (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway: Identification of novel gene clusters for cell survival. *J. Biol. Chem.* 278, 8135–8145.
- Lee, J.M., Calkins, M.J., Chan, K., Kan, Y.W., and Johnson, J.A. (2003). Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J. Biol. Chem.* 278, 12029–12038.
- Lee, J.W., Beebe, K., Nangle, L.A., Jang, J., Longo-Guess, C.M., Cook, S.A., Davisson, M.T., Sundberg, J.P., Schimmel, P., and Ackerman, S.L. (2006). Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature* 443, 50–55.
- Lee, K.S., Lee, B.S., Semnani, S., Avanesian, A., Um, C.Y., Jeon, H.J., Seong, K.M., Yu, K., Min, K.J., and Jafari, M. (2010). Curcumin extends life span, improves health span, and modulates the expression of age-associated aging genes in *drosophila melanogaster*. *Rejuvenation Res.* 13, 561–570.
- Leestemaker, Y., and Ova, H. (2017). Tools to investigate the ubiquitin proteasome system. *Drug Discov. Today Technol.* 26, 25–31.
- Levine, B., and Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* 6, 463–477.
- Li, W., Li, J., and Bao, J. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1125–1136.
- Liao, V.H.C., Yu, C.W., Chu, Y.J., Li, W.H., Hsieh, Y.C., and Wang, T.T. (2011). Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* 132, 480–487.
- Liu, C.W., and Jacobson, A.D. (2013). Functions of the 19S complex in proteasomal degradation. *Trends Biochem. Sci.* 38, 103–110.
- Long, D.J., Waikel, R.L., Wang, X.J., Roop, D.R., and Jaiswal, A.K. (2001). NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 deficiency and increased susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis in mouse skin. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1166–1170.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194.
- Madeo, F., Eisenberg, T., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., and Kroemer, G. (2010a). Spermidine: A novel autophagy inducer and longevity elixir. *Autophagy* 6, 160–162.
- Madeo, F., Tavernarakis, N., and Kroemer, G. (2010b). Can autophagy promote longevity? *Nat. Cell Biol.* 12, 842–846.
- Mair, W., and Dillin, A. (2008). Aging and Survival: The Genetics of Life Span Extension by Dietary Restriction. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 727–754.
- Manasanch, E.E., and Orlowski, R.Z. (2017). Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 417–433.
- Mehta, J., Rayalam, S., and Wang, X. (2018). Cytoprotective effects of natural compounds against oxidative stress. *Antioxidants* 7.
- von Mikecz, A. (2006). The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J. Cell Sci.* 119, 1977–1984.

Morimoto, R.I., and Cuervo, A.M. (2014). Proteostasis and the aging proteome in health and disease. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* *69 Suppl 1*, S33-8.

Morrow, G., Samson, M., Michaud, S., and Tanguay, R.M. (2004). Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *FASEB J.* *18*, 598–599.

Niforou, K., Cheimonidou, C., and Trougakos, I.P. (2014). Molecular chaperones and proteostasis regulation during redox imbalance. *Redox Biol.* *2*, 323–332.

Nijman, S.M.B., Huang, T.T., Dirac, A.M.G., Brummelkamp, T.R., Kerkhoven, R.M., D'Andrea, A.D., and Bernards, R. (2005). The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the fanconi anemia pathway. *Mol. Cell* *17*, 331–339.

Panier, S., and Boulton, S.J. (2014). Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 7–18.

Papaevgeniou, N., Sakellari, M., Jha, S., Tavernarakis, N., Holmberg, C.I., Gonos, E.S., and Chondrogianni, N. (2016). 18 $\alpha$ -Glycyrrhetic acid proteasome activator decelerates aging and Alzheimer's disease progression in *Caenorhabditis elegans* and neuronal cultures. *Antioxidants Redox Signal.* *25*, 855–869.

Parzych, K.R., and Klionsky, D.J. (2014). An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants Redox Signal.* *20*, 460–473.

Pathare, G.R., Nagy, I., Bohn, S., Unverdorben, P., Hubert, A., Körner, R., Nickell, S., Lasker, K., Sali, A., Tamura, T., et al. (2012). The proteasomal subunit Rpn6 is a molecular clamp holding the core and regulatory subcomplexes together. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 149–154.

Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M., and Codogno, P. (2008). Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* *90*, 313–323.

Pazdro, R., and Burgess, J.R. (2012). The antioxidant 3H-1,2-dithiole-3-thione potentiates advanced glycation end-product-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells. *Exp. Diabetes Res.* *2012*.

Pyo, J.-O., Yoo, S.-M., Ahn, H.-H., Nah, J., Hong, S.-H., Kam, T.-I., Jung, S., and Jung, Y.-K. (2013). Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat. Commun.* *4*, 2300.

Ravanan, P., Srikumar, I.F., and Talwar, P. (2017). Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sci.* *188*, 53–67.

Reggiori, F., and Klionsky, D.J. (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot. Cell* *1*, 11–21.

Richter-Landsberg, C., and Leyk, J. (2013). Inclusion body formation, macroautophagy, and the role of HDAC6 in neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* *126*, 793–807.

Robida-Stubbs, S., Glover-Cutter, K., Lamming, D.W., Mizunuma, M., Narasimhan, S.D., Neumann-Haefelin, E., Sabatini, D.M., and Blackwell, T.K. (2012). TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell Metab.* *15*, 713–724.

Sala, A.J., Bott, L.C., and Morimoto, R.I. (2017). Shaping proteostasis at the cellular, tissue, and organismal level. *J. Cell Biol.* *216*, 1231–1241.

Salminen, A., Kaarniranta, K., and Kauppinen, A. (2013). Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: Impact on the aging process. *Ageing Res. Rev.* *12*, 520–534.

Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., Saunders, T., Bonner-Weir, S., and Kaufman, R.J. (2001). Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol. Cell* *7*, 1165–1176.

Shalgi, R., Hurt, J.A., Krykbaeva, I., Taipale, M., Lindquist, S., and Burge, C.B. (2013). Widespread Regulation of Translation by Elongation Pausing in Heat Shock. *Mol. Cell* *49*, 439–452.

Shi, W.Y., Xiao, D., Wang, L., Dong, L.H., Yan, Z.X., Shen, Z.X., Chen, S.J., Chen, Y., and Zhao, W.L. (2012). Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death Dis.*

3.

Skirou, A., Papanagnou, E.D., Fokialakis, N., and Trougakos, I.P. (2018). Cancer chemoprevention via activation of proteostatic modules. *Cancer Lett.* 413, 110–121.

Sykiotis, G.P., and Bohmann, D. (2010). Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci. Signal.* 3, re3.

Thimmulappa, R.K., Mai, K.H., Srisuma, S., Kensler, T.W., Yamamoto, M., and Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* 62, 5196–5203.

Tomaru, U., Takahashi, S., Ishizu, A., Miyatake, Y., Gohda, A., Suzuki, S., Ono, A., Ohara, J., Baba, T., Murata, S., et al. (2012). Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am. J. Pathol.* 180, 963–972.

Tonelli, C., Chio, I.I.C., and Tuveson, D.A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 1727–1745.

Torres, C., Lewis, L., and Cristofalo, V.J. (2006). Proteasome inhibitors shorten replicative life span and induce a senescent-like phenotype of human fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* 207, 845–853.

Trougakos, I.P., Sesti, F., Tsakiri, E., and Gorgoulis, V.G. (2013). Non-enzymatic post-translational protein modifications and proteostasis network deregulation in carcinogenesis. *J. Proteomics* 92, 274–298.

Tsakiri, E.N., and Trougakos, I.P. (2015). The amazing ubiquitin-proteasome system: Structural components and implication in aging. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 314, 171–237.

Tsakiri, E.N., Sykiotis, G.P., Papassideri, I.S., Terpos, E., Dimopoulos, M.A., Gorgoulis, V.G., Bohmann, D., and Trougakos, I.P. (2013). Proteasome dysfunction in *Drosophila* signals to an Nrf2-dependent regulatory circuit aiming to restore proteostasis and prevent premature aging. *Aging Cell* 12, 802–813.

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., Koonin, E. V., and Deshaies, R.J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* (80-. ). 298, 611–615.

Wedel, S., Manola, M., Cavinato, M., Trougakos, I.P., and Jansen-D r, P. (2018). Targeting protein quality control mechanisms by natural products to promote healthy ageing. *Molecules* 23.

Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., and Hannun, Y.A. (2018). Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. *Nat. Commun.* 9.



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

Ιωάννα Λώλου